

CHARAKTERISIERUNG DER MIKROSOMALEN
REDUKTION *N*-HYDROXYLIERTER
VERBINDUNGEN



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

vorgelegt von
STEPHANIE KANZOW

Kiel
2007

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. E. Beitz

Tag der mündlichen Prüfung:

04. Februar 2008

Zum Druck genehmigt:

06. Februar 2008

Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer

(Dekan)

Meiner Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------------------|--|
| 2D-PAGE | zweidimensionale Gelelektrophorese |
| 3 rd | mikrosomale N-reduktive Komponente |
| 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 |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| <i>Aqua bidest.</i> | Zweifach destilliertes Wasser |
| b ₅ | Cytochrom b ₅ |
| b ₅ R | NADH Cytochrom b ₅ Reduktase |
| BAC | Benzyltrimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid |
| BCA | 2,2'-Bis(4-aminophenyl)propan-1,3-dicarbonsäure |
| BfArM | Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| <i>c</i> | Konzentration |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propansulfonat |
| CID | collision induced decay |
| CO | Kohlenmonoxid |
| CoA | Coenzym A |
| CPMP | <i>Committee for Proprietary Medicinal Products</i> |
| CYP | Cytochrom P450 |
| Cyt b ₅ | Cytochrom b ₅ |
| δ | chemische Verschiebung |
| DHP | Dihydropyran |
| DIPEA | N,N-Diisopropylethylamin |
| DLPC | 1,3-Bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol-3-cholin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |

| | |
|---------------------------------|---|
| DMSO- d_6 | vollständig deuteriertes DMSO |
| DOPC | L- α -Dioleylphosphatidylcholin |
| DTD | DT- Diaphorase (NADPH Chinonoxidoreduktase 1) |
| DTT | Dithiothreitol |
| ϵ | spezifischer Absorptionskoeffizient |
| EC | <i>enzyme commission number</i> |
| <i>E. Coli</i> | <i>Escherichia Coli</i> |
| ECL | Enhanced chemoluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMA | <i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i> |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase |
| ESI | Elektrospray Ionisierung |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FMO | Flavinhaltige Monooxygenase |
| g | Erdbeschleunigung |
| GST | Gluthathion-S-Transferase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HEPES | <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure) |
| HLMs | humane Lebermikrosomen |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| Hz | Hertz |
| IC ₅₀ | für eine halbmaximale Hemmung nötige Konzentration |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| IgG | Immunglobulin G |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase |
| IPG | immobilisierter pH-Gradient |
| J | Kopplungskonstante |
| K _{diss} | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| λ | Wellenlänge |
| LC | Flüssigchromatographie |

| | |
|----------------------|--|
| M | mol/l |
| <i>M</i> | Molekulargewicht |
| MALDI | Matrix-assisted laser desorption and ionisation |
| MALDI-TOF | Matrix-assisted laser desorption and ionisation – time of flight |
| MAO | Monoaminoxidase |
| mARC | <i>mitochondrial Amidoxime Reducing Compound</i> |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MHz | Megahertz |
| min | Minute |
| Moco | Molybdäncofaktor |
| MP8 | Microperoxidase 8 |
| MPT | Molybdopterin |
| MS | Massenspektrometrie |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form) |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form) |
| Na ₂ EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaVO ₃ | Natriummetavanadat |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ND | nicht detektierbar |
| nd | nicht bestimmt |
| nHPLC | nano HPLC |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz) |
| nNOS | neuronale Stickstoffmonoxidsynthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOHA | <i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin |
| NOHG | <i>N</i> -Hydroxyguanidin |
| NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |
| OMV | äußere Mitochondrienmembran (<i>outer membrane vesicles</i>) |
| P450 | Cytochrom P450 |
| P450R | NADPH Cytochrom P450 Reduktase |
| ppm | <i>parts per million</i> |

| | |
|------------|--|
| PPTS | <i>p</i> -Toluolsulfonat |
| PS | 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphatidylserin |
| RLM | Rattenlebermikrosomen |
| RLM (Dexa) | Dexamethason CYP-induzierte Rattenlebermikrosomen |
| RLM (PB) | Phenobarbital CYP-induzierte Rattenlebermikrosomen |
| RP | Umkehrphase (reversed phase) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| R_t | Retentionszeit |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SLMs | Schweinelebermikrosomen |
| Std | Molekulargewichtsstandards |
| <i>t</i> | Zeit |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | <i>Tris buffered saline</i> |
| TBST | TBS mit Tween-20 |
| TBSTXS | TBS mit Triton [®] X-100 |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin |
| THP | Tetrahydropyran |
| TMS | Tetramethylsilan |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | unit |
| <i>U</i> | Spannung |
| UDP | Uridindiphosphat |
| V | Volt |
| VDAC | <i>Voltage Dependent Anion Channel</i> |
| ΩGST | Ω-Gluthathion-S-Transferase |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINFÜHRUNG | 1 |
| 1.1 | BIOTRANSFORMATION | 1 |
| 1.1.1 | Definition und Bedeutung..... | 1 |
| 1.1.2 | Biotransformationsstudien..... | 4 |
| 1.1.3 | Enzyme der Biotransformation | 5 |
| 1.1.4 | Biotransformationsreaktionen..... | 6 |
| 1.1.4.1 | Oxidationen | 6 |
| 1.1.4.2 | Reduktionen | 9 |
| 1.1.4.3 | Hydrolysen..... | 10 |
| 1.1.4.4 | Phase II-Reaktionen..... | 11 |
| 1.2 | REDUKTION <i>N</i> -HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN..... | 11 |
| 1.2.1 | Physiologische Relevanz | 11 |
| 1.2.2 | <i>N</i> -Hydroxylierung als Prodrug-Prinzip | 11 |
| 1.2.3 | Enzymatische Grundlagen..... | 14 |
| 1.3 | THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT..... | 18 |
| 2 | REDUKTION VON <i>N</i>-HYDROXYGUANIDINEN (NOHG) | 21 |
| 2.1 | EINLEITUNG | 21 |
| 2.1.1 | Therapeutische Bedeutung der NOHG | 21 |
| 2.1.1.1 | NO-Donoren | 21 |
| 2.1.1.2 | Zytotoxische NOHG..... | 23 |
| 2.1.1.3 | NOHG als Prodrugs von Guanidinen | 24 |
| 2.1.2 | Bisherige Untersuchungen zum Metabolismus von NOHG..... | 26 |
| 2.1.3 | Thema und Zielsetzung..... | 28 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2 | METHODEN | 31 |
| 2.2.1 | Materialien und Geräte..... | 31 |
| 2.2.2 | Enzympräparationen | 31 |
| 2.2.2.1 | Lebermikrosomen unterschiedlicher Spezies | 31 |
| 2.2.2.2 | Mikrosomales <i>N</i> -reduktives Enzymsystem | 32 |
| 2.2.3 | Reduktion von NOHG zu Guanidinen..... | 32 |
| 2.2.3.1 | Charakterisierung der Enzymquellen..... | 32 |
| 2.2.3.1.1 | Proteingehaltsbestimmung..... | 32 |
| 2.2.3.1.2 | Cytochrom P450 Gehaltsbestimmung..... | 32 |
| 2.2.3.1.3 | Cytochrom b ₅ Gehaltsbestimmung | 33 |
| 2.2.3.1.4 | NADH Cytochrom b ₅ Reduktase Aktivitätsbestimmung..... | 33 |
| 2.2.3.2 | <i>In vitro</i> Biotransformationsansätze | 34 |
| 2.2.3.2.1 | Inkubationen mit Mikrosomen unterschiedlicher Spezies..... | 34 |
| 2.2.3.2.2 | Inkubationen mit dem gereinigten mikrosomalen <i>N</i> -reduktiven Enzymsystem | 34 |
| 2.2.3.3 | HPLC-Analytik | 35 |
| 2.2.3.4 | LC/MS-Analytik | 37 |
| 2.2.3.5 | Substratbindungsspektren | 39 |
| 2.3 | ERGEBNISSE..... | 39 |
| 2.3.1 | <i>In vitro</i> Studien mit Mikrosomen unterschiedlicher Spezies..... | 39 |
| 2.3.2 | <i>In vitro</i> Studien mit dem gereinigten mikrosomalen <i>N</i> -reduktiven Enzymsystem..... | 41 |
| 2.3.3 | <i>In vitro</i> Studien unterschiedlicher <i>para</i> -substituierter NOHG..... | 43 |
| 2.3.4 | Identifizierung der gebildeten Guanidin-Metaboliten | 45 |
| 2.3.5 | Substratbindungsspektren mit Mikrosomen unterschiedlicher Spezies | 47 |
| 2.4 | DISKUSSION | 49 |
| 2.5 | ZUSAMMENFASSUNG | 54 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3 | TESTUNG VON GEREINIGTEN UND REKOMBINANTEN ENZYMEN UND DEM HÄM-MODELL MICROPEROXIDASE 8 AUF BENZAMIDOXIM REDUKTASE AKTIVITÄT | 56 |
| 3.1 | EINFÜHRUNG | 56 |
| 3.1.1 | Fremdstoffmetabolisierende Enzyme..... | 56 |
| 3.1.1.1 | Cytochrom P450 Isoenzyme 2A6 und 3A4 (CYP2A6 und CYP3A4) | 57 |
| 3.1.1.2 | Flavinhaltige Monooxygenase 3 (FMO3) | 59 |
| 3.1.1.3 | NAD(P)H Chinonoxidoreduktase 1 (DT Diaphorase, DTD)..... | 59 |
| 3.1.1.4 | Ω -Gluthathion-S-Transferase (Ω GST)..... | 61 |
| 3.1.2 | Microperoxidase 8 (MP8) | 62 |
| 3.1.3 | Rekonstitution von membranständigen Enzymen | 63 |
| 3.1.4 | Bisherige Untersuchungen zur Identifizierung der mikrosomalen N-reduktiven Komponente..... | 64 |
| 3.1.5 | Thema und Zielsetzung..... | 67 |
| 3.2 | METHODEN | 69 |
| 3.2.1 | Materialien und Geräte..... | 69 |
| 3.2.2 | Enzympräparationen | 70 |
| 3.2.3 | Charakterisierung der Enzymquellen | 71 |
| 3.2.3.1 | Photometrische Assays | 71 |
| 3.2.3.1.1 | NADPH Cytochrom P450 Reduktase | 71 |
| 3.2.3.1.2 | Gehaltsbestimmung der MP8..... | 71 |
| 3.2.3.1.3 | Substratbindung an MP8..... | 72 |
| 3.2.3.1.4 | DTD | 72 |
| 3.2.3.2 | <i>In vitro</i> Biotransformationsansätze | 73 |
| 3.2.3.2.1 | Inkubationsansätze zur Bestimmung der CYP2A6 Markerenzymaktivität Cumarin-7-Hydroxylierung | 73 |
| 3.2.3.2.2 | Inkubationsansätze zur Bestimmung der CYP3A4 Markerenzymaktivität Testosteron-6- β -Hydroxylierung..... | 73 |
| 3.2.4 | Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin..... | 74 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.2.4.1 | Inkubationen mit gereinigten bzw. rekombinanten Cytochrom P450 Enzymen | 74 |
| 3.2.4.2 | Inkubationen mit anderen rekombinanten Enzymen..... | 75 |
| 3.2.4.3 | Inkubationen mit MP8 bzw. hitzedenaturierten Proteinen | 75 |
| 3.2.5 | HPLC-Analytik..... | 76 |
| | HPLC-Analytik zur Trennung von Cumarin und 7-Hydroxy-Cumarin..... | 76 |
| 3.2.5.2 | HPLC-Analytik zur Trennung von Testosteron und 6- β -Hydroxytestosteron..... | 77 |
| 3.2.5.3 | HPLC-Analytik zur Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin 78 | |
| 3.3 | ERGEBNISSE..... | 80 |
| 3.3.1 | Charakterisierung der Enzymquellen | 80 |
| 3.3.1.1 | CYP2A6 | 80 |
| 3.3.1.2 | CYP3A4 | 81 |
| 3.3.1.3 | DTD | 82 |
| 3.3.1.4 | Rekombinante humane NADH Cytochrom b ₅ Reduktase..... | 83 |
| 3.3.1.5 | MP8..... | 84 |
| 3.3.2 | Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin..... | 85 |
| 3.3.2.1 | <i>In vitro</i> Studien mit Cytochrom P450 Isoenzymen | 85 |
| 3.3.2.2 | <i>In vitro</i> Studien mit weiteren Enzymquellen..... | 87 |
| 3.3.2.3 | <i>In vitro</i> Studien mit hitzedenaturierten Proteinen und dem Häm-Modell Microperoxidase 8..... | 89 |
| 3.3.2.3.1 | <i>In vitro</i> Studien mit hitzedenaturierten Proteinen | 89 |
| 3.3.2.3.2 | <i>In vitro</i> Studien unter Austausch von Cytochrom b ₅ durch das Häm-Modell Microperoxidase 8 | 91 |
| 3.3.2.3.3 | <i>In vitro</i> Studien unter Austausch der dritten Komponente durch das Häm-Modell Microperoxidase 8 | 93 |
| 3.4 | DISKUSSION | 94 |
| 3.5 | ZUSAMMENFASSUNG | 97 |

| | |
|---|-----------|
| 4 CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN MIKROSOMALEN N-REDUKTIVEN KOMPONENTE | 99 |
| 4.1 EINFÜHRUNG | 99 |
| 4.1.1 Charakterisierung von gereinigten Enzymen..... | 99 |
| 4.1.2 Bisherige Untersuchungen zur Charakterisierung der mikrosomalen <i>N</i> -reduktiven Komponente..... | 101 |
| 4.1.3 Thema und Zielsetzung..... | 102 |
| 4.2 METHODEN | 103 |
| 4.2.1 Materialien und Geräte..... | 103 |
| 4.2.2 Isolierung der <i>N</i> -reduktiven Komponente aus Schweineleber- mikrosomen | 103 |
| 4.2.2.1 Gewinnung von Schweinelebermikrosomen..... | 103 |
| 4.2.2.2 Isolierung der mikrosomalen <i>N</i> -reduktiven Komponente | 103 |
| 4.2.3 Charakterisierung der mikrosomalen <i>N</i> -reduktiven Komponente | 104 |
| 4.2.3.1 Benzamidoxim Reduktase Aktivitätsbestimmung..... | 104 |
| 4.2.3.2 CYP2D Markerenzymaktivitätsbestimmung: Dextromethorphan-O- Demethylierung..... | 104 |
| 4.2.4 HPLC-Analytik zur Trennung von Dextromethorphan und Dextrophan..... | 105 |
| 4.2.5 Proteinanalytik der mikrosomalen <i>N</i> -reduktiven Komponente..... | 106 |
| 4.2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 106 |
| 4.2.5.1.1 Coomassiefärbung..... | 108 |
| 4.2.5.1.2 Silberfärbung..... | 108 |
| 4.2.5.1.3 Molekulargewichtsbestimmung..... | 109 |
| 4.2.5.2 Elektrophorese-Automat Experion™ | 109 |
| 4.2.5.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese | 109 |
| 4.2.5.3.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 110 |
| 4.2.5.3.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE | 111 |
| 4.2.5.4 16-BAC-SDS-PAGE..... | 112 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.5.4.1 | Erste Dimension: 16-BAC-PAGE | 113 |
| 4.2.5.4.2 | Zweite Dimension: SDS-PAGE | 115 |
| 4.2.5.5 | Massenspektrometrische Analyse..... | 116 |
| 4.3 | ERGEBNISSE..... | 116 |
| 4.3.1 | Charakterisierung der gereinigten mikrosomalen <i>N</i> -reduktiven Komponente | 116 |
| 4.3.1.1 | Benzamidoxim Reduktase Aktivitätsbestimmung..... | 117 |
| 4.3.1.2 | Cytochrom P450 Gehaltsbestimmung | 117 |
| 4.3.1.3 | Dextromethorphan-O-Demethylierung..... | 119 |
| 4.3.2 | Proteinanalytik | 119 |
| 4.3.2.1 | SDS-Gelelektrophorese | 119 |
| 4.3.2.2 | Elektrophorese-Automat Experion™ | 122 |
| 4.3.2.3 | Zweidimensionale Gelelektrophorese | 123 |
| 4.3.2.4 | 16-BAC-SDS-Gelelektrophorese | 124 |
| 4.3.2.5 | LC/MS-Analytik der Proteinspots..... | 125 |
| 4.4 | DISKUSSION | 127 |
| 4.5 | ZUSAMMENFASSUNG | 130 |
| 5 | DIE MIKROSOMALE <i>N</i>-REDUKTIVE KOMPONENTE – EIN MOLYBDOENZYM? | 126 |
| 5.1 | EINFÜHRUNG | 132 |
| 5.1.1 | Molybdoenzyme | 132 |
| 5.1.2 | <i>N</i> -reduktiver Arzneistoffmetabolismus durch Molybdoenzyme..... | 135 |
| 5.1.3 | Bisherige Untersuchungen zur Benzamidoxim Reduktion durch Molybdoenzyme | 135 |
| 5.1.4 | Thema und Zielsetzung..... | 136 |
| 5.2 | METHODEN | 138 |
| 5.2.1 | Materialien und Geräte..... | 138 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.2.2 | <i>Nit-1</i> Rekonstitutions Assay | 139 |
| 5.2.3 | Immunoblot-Analyse..... | 139 |
| 5.2.3.1 | Anti-ABA3..... | 139 |
| 5.2.3.1.1 | SDS-PAGE..... | 139 |
| 5.2.3.1.2 | Immunoblot | 140 |
| 5.2.3.2 | Anti-VDAC | 141 |
| 5.2.3.2.1 | SDS-PAGE..... | 141 |
| 5.2.3.2.2 | Immunoblot | 141 |
| 5.2.4 | Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin..... | 143 |
| 5.2.4.1 | Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen | 143 |
| 5.2.4.2 | Inkubationen mit der gereinigten mikrosomalen Komponente..... | 143 |
| 5.2.4.3 | Inhibitorstudien mit Natriumvanadat..... | 143 |
| 5.3 | ERGEBNISSE..... | 144 |
| 5.3.1 | Messung der „Molybdäncofaktor Aktivität“..... | 144 |
| 5.3.2 | Western Blot | 145 |
| 5.3.3 | Inhibitorstudien..... | 146 |
| 5.3.4 | Prüfung auf Kontamination mit der äußeren Mitochondrienmembran.. | 148 |
| 5.4 | DISKUSSION | 150 |
| 5.5 | ZUSAMMENFASSUNG | 154 |
| 6 | AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEN ARYL-AMIDOXIMEN | 156 |
| 6.1 | EINFÜHRUNG | 156 |
| 6.1.1 | Affinitätschromatographie..... | 156 |
| 6.1.1.1 | Trägermaterialien | 157 |
| 6.1.1.2 | Liganden..... | 158 |
| 6.1.1.3 | Immobilisierung..... | 158 |
| 6.1.2 | Thema und Zielsetzung..... | 159 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 6.2 | METHODEN | 160 |
| 6.2.1 | Materialien und Geräte..... | 160 |
| 6.2.2 | Liganden für die Immobilisierung..... | 160 |
| 6.2.2.1 | <i>Para</i> -substituierte Benzamidoximderivate, 4-Aminobenzamidin und 4-Aminomethylbenzotrifil..... | 160 |
| 6.2.2.2 | Benzamidoxime mit geschützten Amidoximfunktionen..... | 162 |
| 6.2.3 | Modellkupplung der Liganden an <i>N</i> -Succinimidylpalmitat..... | 162 |
| 6.2.3.1 | Kupplung von 4-Aminobenzamidoxim (1), 4-Aminobenzamidin (3), Benzamidoxim (4), 4-Hydroxybenzamidoxim (2), 4-Aminomethyl- benzamidoxim (6) und 4-Aminomethylbenzotrifil (7)..... | 163 |
| 6.2.3.2 | Kupplung von 1,4-Terephthaldiamidoxim (5)..... | 163 |
| 6.2.3.3 | 2-Stufen-Synthese: Amidoximsynthese nach Kupplung des 4-Aminobenzotrifils an <i>N</i> -Succinimidylpalmitat | 163 |
| 6.2.4 | NMR-Spektroskopie..... | 164 |
| 6.2.5 | Trägermaterial..... | 164 |
| 6.2.6 | Kupplungsreaktion..... | 165 |
| 6.2.7 | HPLC-Analytik zur quantitativen Bestimmung von 4-Aminomethylbenzotrifil | 167 |
| 6.2.8 | Batch-Serienversuche | 168 |
| 6.2.8.1 | Variation des pH-Wertes | 168 |
| 6.2.8.2 | Bestimmung der Bindungskapazität | 169 |
| 6.2.8.3 | Variation der Konzentration an kompetitivem Liganden..... | 169 |
| 6.2.8.4 | Variation der Natriumchlorid-Konzentration..... | 170 |
| 6.2.9 | Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität..... | 170 |
| 6.2.9.1 | <i>In vitro</i> Inkubationsansatz mit mikrosomalen Präparationen..... | 170 |
| 6.2.9.2 | <i>In vitro</i> Inkubationsansatz des rekonstituierten Enzymsystems..... | 171 |
| 6.2.10 | Affinitätschromatographie an immobilisiertem Arylamidoxim..... | 171 |
| 6.2.11 | Überprüfung des Reinigungsverlaufes | 172 |
| 6.2.11.1 | Monitoring der <i>N</i> -reduktiven Aktivität..... | 172 |
| 6.2.11.2 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 172 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6.3 | ERGEBNISSE..... | 172 |
| 6.3.1 | Strukturaufklärung der Ligandenkupplung an die Modellverbindung <i>N</i> -Succinimidylpalmitat..... | 172 |
| 6.3.2 | Synthesestrategie zur Einführung von Schutzgruppen für den Sauerstoff der Amidoximfunktion..... | 178 |
| 6.3.3 | Ligandenkupplung unter Erhalt der Amidoximfunktion..... | 179 |
| 6.3.4 | Ligandendichte des Trägermaterials..... | 181 |
| 6.3.5 | Isolierung der <i>N</i> -reduktiven Komponente | 182 |
| 6.3.5.1 | Methodenentwicklung mittels Batch-Verfahren..... | 182 |
| 6.3.5.2 | Reinigung der <i>N</i> -reduktiven Komponente durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Arylamidoxim..... | 187 |
| 6.3.6 | Charakterisierung der aufgetrennten Enzymfraktionen..... | 188 |
| 6.3.6.1 | Spezifische <i>N</i> -reduktive Aktivität | 188 |
| 6.3.6.2 | Reinheitsüberprüfung mittels SDS-PAGE..... | 189 |
| 6.4 | DISKUSSION | 191 |
| 6.5 | ZUSAMMENFASSUNG | 198 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 200 |
| 8 | MATERIALIEN UND GERÄTE | 205 |
| 8.1 | SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN..... | 205 |
| 8.2 | GERÄTE..... | 207 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS | 209 |

1 EINFÜHRUNG

1.1 BIOTRANSFORMATION

1.1.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG

Der Begriff Biotransformation (Metabolismus) bezeichnet die Umwandlung von körperfremden und körpereigenen Substanzen durch den Organismus (Mutschler *et al.*, 2001). Die entstehenden Produkte werden Metabolite genannt. Zu den körpereigenen Verbindungen zählen unter anderem Steroidhormone oder Gallensäuren. Körperfremde Substanzen (Xenobiotika) sind neben Arzneistoffen auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, Chemikalien, Nahrungszusätze, Umweltgifte und andere Schadstoffe (Testai, 2001). Biotransformation kann zu Veränderungen der pharmakologischen oder toxikologischen Eigenschaften dieser Verbindungen führen (Mabic, 1999).

Die Leber ist das Hauptorgan der Biotransformation. Extrahepatischer Metabolismus findet in Dünndarm, Niere, Lunge, Gehirn, Plazenta und Milz, sowie in Haut, Muskeln und im Blut statt (Krishna und Klotz, 1994).

Man kann die Biotransformation nach den drei möglichen Effekten des entstehenden Metaboliten einteilen (Testa, 1995). Am häufigsten führt eine Umwandlung zu einer teilweisen oder vollständigen Inaktivierung eines Fremdstoffes (inaktiver Metabolit). Eine Bioaktivierung (pharmakologisch aktiver Metabolit) ist aber ebenso möglich wie eine Biotoxifizierung (toxischer Metabolit), der am wenigsten erwünschte Effekt eines Biotransformations-Prozesses (Abb. 1.1; Guengerich, 2006; Yengi *et al.*, 2007).

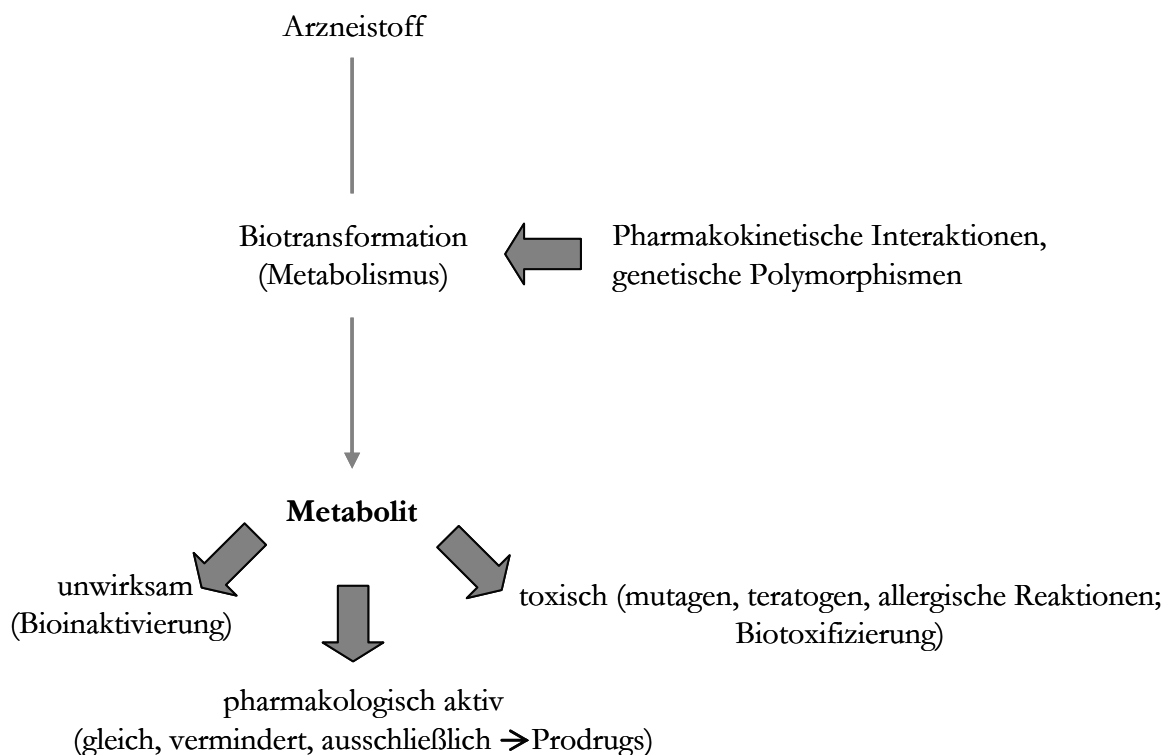


Abb. 1.1 Bedeutung des Fremdstoffwechsels für die Arzneimitteltherapie

Biotransformationsprozesse können in Phase I- und Phase II-Reaktionen unterteilt werden (Yengi *et al.*, 2007; Josephy *et al.*, 2005). Phase I-Reaktionen, die man auch als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet, sind Oxidationen, Reduktionen oder Hydrolysen. Sie dienen der Einführung funktioneller Gruppen in das Arzneistoffmolekül, die in den meisten Fällen zu einer stärkeren Polarität und damit besseren Eliminierung führen. Das Produkt des Phase I-Metabolismus bildet häufig das Substrat für Phase II-metabolisierende Enzyme (Testai, 2001).

In den Phase II-Reaktionen werden Substanzen oder Metabolite mit endogenen Molekülen konjugiert, weshalb diese auch als Konjugationsreaktionen bezeichnet werden. Auch sie führen generell zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit, Polarität und Eliminierung. Wichtige Beispiele für konjugierende Komponenten sind Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren und Gluthathion (Testai, 2001). Meistens entstehen untoxische, leicht eliminierbare Verbindungen (Guengerich, 2001). Allerdings sind auch viele Ausnahmen beschrieben, bei denen Phase II-Reaktionen zu einer Toxifizierung führen (Guengerich, 2006; Josephy *et al.*, 2005).

Der Arzneistoffmetabolismus eines Einzelnen wird in hohem Ausmaß durch genetische Polymorphismen, kulturelle Unterschiede, Alter, Geschlecht, Krankheiten oder Umweltbedingungen beeinflusst (Ingelman-Sundberg, 2004; Benedetti *et al.*, 2007). Selbst Nahrungs-, Rauch- und Trinkgewohnheiten beeinträchtigen die Art und das Ausmaß der Biotransformation (Testai, 2001).

Genetische Polymorphismen können in speziellen Populationen als eine Folge von Gendefekten auftreten (Daly *et al.*, 1993). Bestimmte Enzyme werden gar nicht, nur in geringem Ausmaß oder falsch exprimiert. Demzufolge können manche Biotransformationsreaktionen nur langsam oder gar nicht katalysiert werden (Ingelman-Sundberg und Rodriguez-Antona, 2005; Kirchheiner und Seeringer, 2007). Populationen, die dieses Phänomen zeigen, bezeichnet man als „poor metabolizer“ (Ingelman-Sundberg, 2004; Daly *et al.*, 1993). Auch das Gegenteil ist beschrieben, was als „ultrarapid“ oder „extensive metabolizer“ bezeichnet wird (Ingelman-Sundberg, 2001).

Neben den genetischen Polymorphismen können weitere Mechanismen für unerwünschte Plasmaspiegel eines Arzneimittels verantwortlich sein. Hierzu zählen die Induktion und die Inhibition der an der Biotransformation beteiligten Enzyme, die zu pharmakokinetischen Wechselwirkungen führen (Hollenberg, 2002; Klotz *et al.*, 2003). Beispielsweise wird eine Arzneimittelinteraktion zweier gleichzeitig applizierter Arzneistoffe dadurch verursacht, dass ein Arzneistoff das fremdstoffmetabolisierende Enzym hemmt, welches für die Umwandlung des anderen verantwortlich ist. Dieser wird dann verzögert abgebaut und es entsteht ein toxischer Plasmaspiegel (Hollenberg, 2002).

Enzyminduktion wird durch einen Arzneistoff verursacht, der nach Reaktion mit einem intrazellulären Rezeptor die Transkription des für das entsprechende Enzym codierenden Gens steigert oder die mRNA stabilisiert (Klotz *et al.*, 2003; Ingelman-Sundberg, 2004). Diese Stimulation der Expression eines fremdstoffmetabolisierenden Enzyms kann zu einer schnelleren Inaktivierung eines applizierten Arzneistoffes führen und damit zu einer Einschränkung seines pharmakologischen Effekts (Klotz *et al.*, 2003; Hollenberg, 2002).

1.1.2 BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN

Biotransformationsstudien werden besonders in frühen Phasen der Arzneistoffentwicklung mit vereinfachten *in vitro*-Modellen durchgeführt. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen erfordern entsprechende *in vivo*-Untersuchungen Tiermodelle. Um diese aufgrund ihrer ethischen Problematik zu rechtfertigen, muss ihre Notwendigkeit belegt werden. Zum anderen bestehen diverse Speziesunterschiede in den Biotransformationsreaktionen. Die Daten, die mit Versuchstieren gewonnen werden können, sind nicht immer auf den Menschen übertragbar (Testai, 2001). Der Einsatz von menschlichem Gewebe, Zellkultur-Modellen und rekombinanten Systemen für *in vitro*-Studien ist sowohl für die Extrapolation der Bedingungen im Menschen als auch für eine bessere Auswahl der Tierspezies für eine spätere *in vivo*-Untersuchung nützlich. Ein weiterer Vorteil von *in vitro*-Studien ist die Möglichkeit, einzelne Stufen des Metabolismus und instabile Metabolite isolieren zu können. Dies ermöglicht die detaillierte Aufklärung der Biotransformationswege.

Für *in vitro*-Studien werden perfundierte Organe, Leberstücke, Hepatozyten-Zellkulturen, subzelluläre Hepatozyten-Organellen oder rekonstituierte Enzymsysteme verwendet (Wrighton *et al.*, 1993). Etabliert ist die Untersuchung der subzellulären Hepatozyten-Organellen Mikrosomen oder Mitochondrien (Testai, 2001). Die Auswahl des *in vitro*-Testsystems ist dabei abhängig von der Fragestellung. Die unterschiedlich komplexen Systeme haben ihre jeweiligen Vorteile, ihre Anwendbarkeit ist jedoch begrenzt (Wrighton *et al.*, 1993; Testai, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *in vitro*-Biotransformationsstudien mit Lebermikrosomen und rekonstituierten Enzymsystemen durchgeführt. Mikrosomen stellen künstliche Membranvesikel des Endoplasmatischen Retikulums dar, auf denen eine Vielzahl von Enzymen, insbesondere die der Phase I-Biotransformation, lokalisiert sind. Sie entstehen durch physikalisches Zerreißen der Hepatozyten und können durch Ultrazentrifugation isoliert werden (Clement *et al.*, 1996; Omura und Sato, 1964). Untersuchungen mit Mikrosomen sind üblich, weil diese einfach gewonnen werden können und leicht zu handhaben sind. Allerdings ist von Nachteil, dass sie aufgrund ihrer Vielzahl von Enzymen keine eindeutige Aussage über die Beteiligung einzelner Proteine an der zu

untersuchenden Reaktion ermöglichen (Testai, 2001). Rekonstituierte Enzymsysteme hingegen sind wesentlich spezifischer, ihre Komponenten müssen aber separat gereinigt und anschließend rekonstituiert werden (Wrighton *et al.*, 1993).

Die in dieser Arbeit verwendeten rekonstituierten Enzyme wurden entweder aus Lebermikrosomen gereinigt oder rekombinant exprimiert.

Das Ziel von Biotransformationsstudien ist die Eignung neuer Arzneistoffkandidaten und mögliche Arzneimittelinteraktionen vorherzusagen, die Ansprechrate auf einen Arzneistoff zu erhöhen und die Zahl der Arzneimittelnebenwirkungen zu erniedrigen.

Nur ca. 30 – 60 % der derzeitigen Arzneimitteltherapien sind erfolgreich. Darüber hinaus verursachen Arzneimittelneben- und wechselwirkungen 7 % aller Krankenhauseinweisungen und führen zu 4 % der Marktrücknahmen neuer Arzneimittel. Die hierbei entstehenden Kosten sind ebenso hoch wie die der eigentlichen Arzneimitteltherapie (Ingelman-Sundberg und Rodriguez-Antona, 2005; Phillips *et al.*, 2001).

1.1.3 ENZYME DER BIOTRANSFORMATION

Der Fremdstoffmetabolismus ist hauptsächlich enzymatisch katalysiert. Rein chemische Reaktionen, z. B. Hydrolysen, kommen zwar vor, spielen jedoch keine große Rolle. Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind wenig substratspezifisch und somit in der Lage, viele verschiedene Fremdstoffe umzuwandeln (Testa, 1995).

Oral applizierte Arzneistoffe müssen zuerst die Leber passieren und werden damit sofort im Anschluss an ihre Resorption einem bedeutenden Biotransformationsprozess unterworfen (Klotz *et al.*, 2003).

Wie bereits beschrieben, sind die Enzyme des Phase I-Metabolismus hauptsächlich an bzw. in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Einige befinden sich jedoch auch membrangebunden in Mitochondrien oder löslich im Cytosol (Beedham, 1997). Die wichtigsten Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums sind die Cytochrom P450 Monooxygenasen (EC 1.14.14.1). Diese katalysieren die Phase I-Biotransformation von mehr als 75 % aller Arzneistoffe

(Ingelman-Sundberg, 2004). Cytochrom P450 Enzyme gehören zu einer Supergenfamilie mit mehr als 7000 verschiedenen Isoenzymen in den unterschiedlichen Organismen (Nelson, 2007). Die Klassifikation der Enzyme erfolgt anhand ihrer Aminosäuresequenzen. Die gängige Nomenklatur (Nelson *et al.*, 1996) verwendet die Abkürzung CYP. Darauf folgen für die Kennzeichnung der Familie eine arabische Ziffer und ein Großbuchstabe für die Subfamilie. Eine weitere arabische Ziffer bezeichnet das jeweilige Isoenzym. Cytochrom P450 Enzyme einer Familie haben eine Homologie von mehr als 40 % der Aminosäuresequenz, innerhalb der Subfamilien sind es mehr als 55 % (Ingelman-Sundberg, 2004).

Weitere wichtige Enzyme der mikrosomalen Phase I-Biotransformation sind Epoxidhydrolase (EC 4.2.1.63), flavinhaltige Monooxygenasen (EC 1.14.13.8) und NADPH Cytochrom P450 Reduktase (EC 1.6.2.4). Im Cytosol lokalisiert sind noch die Alkohol- (EC 1.1.1.1) und Aldehyd- Dehydrogenasen (EC 1.2.1.3), Xanthinoxidase (EC 1.2.3.2), andere Esterasen und Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4; Beedham, 1997).

Phase II-metabolisierende Enzyme sind entweder membranständig im Endoplasmatischen Retikulum, wie die UDP-Glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17), oder löslich im Cytosol, wie *N*-Acetyl-Transferasen (EC 2.3.1.-), Sulfotransferasen (EC 2.8.2.-) oder Gluthathion-S-Transferasen (EC 2.5.1.18; Testai, 2001).

1.1.4 BIOTRANSFORMATIONSREAKTIONEN

1.1.4.1 Oxidationen

Oxidationsreaktionen laufen bei Kohlenstoffatomen oder Kohlenstoff-Sauerstoff-Gruppen bevorzugt ab. Für stickstoffhaltige funktionelle Gruppen ist die Situation komplexer, häufig spielen metabolische Zyklen aus Oxidation und Reduktion eine Rolle (Clement, 2002; Hlavica, 2002).

Die Oxidationen werden üblicherweise von Monooxygenasen (CYP450, FMO) katalysiert (Guengerich, 2001). Bei einer Monooxygenase-Reaktion wird ein

Sauerstoffatom in das Substrat eingebracht und das zweite Sauerstoffatom des molekularen Sauerstoffs zu Wasser reduziert (Abb. 1.2; Testai, 2001).

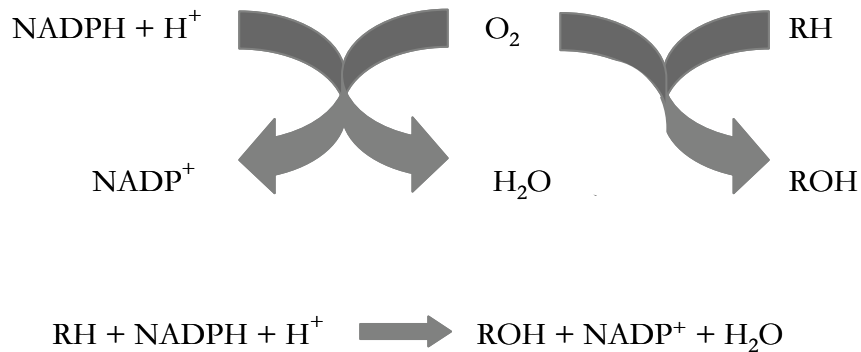


Abb. 1.2 Oxidative Biotransformationsreaktion: Monoxygenasereaktion

Bei Cytochrom P450-katalysierten Reaktionen (Abb. 1.3; Porter und Coon, 1991; Ortiz de Montellano, 1999) erfolgt eine Substratbindung an das Hämprotein (1). Durch Aufnahme des ersten Elektrons wird das Häm-Eisen zur zweiwertigen Form reduziert (2). Für die sukzessive Elektronenübertragung vom NADPH ist die NADPH Cytochrom P450 Reduktase zuständig. Alternativ können die Elektronen aber auch vom NADH geliefert werden, die dann über die NADH Cytochrom b_5 Reduktase und Cytochrom b_5 sukzessiv übertragen werden. Anschließend erfolgt die Bindung von Sauerstoff (3). Durch einen intramolekularen Elektronentransfer wird das Häm-Eisen oxidiert und es entsteht ein Superoxidradikal-Anion (4). Die Übertragung des zweiten Elektrons reduziert den gebundenen Sauerstoff zum Peroxid (5) und aktiviert somit den Komplex. Das Sauerstoffmolekül wird gespalten, ein Atom reagiert mit zwei Protonen zu Wasser (6), das zweite wird auf das Substrat übertragen. Das oxidierte Substrat dissoziiert vom Enzym ab (7) und das Enzym kehrt in den Ausgangszustand zurück (Abb. 1.3)

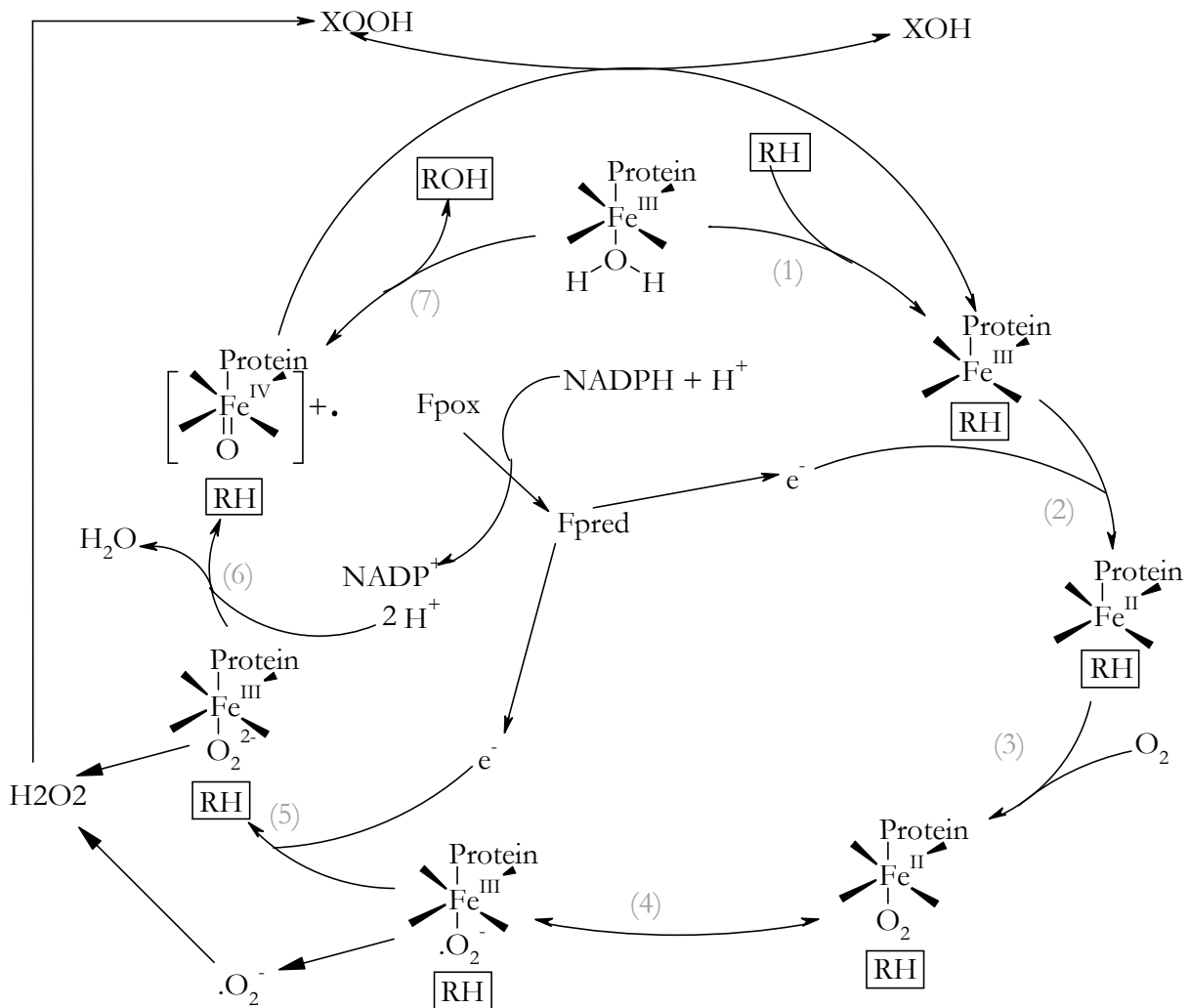


Abb. 1.3 Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsatzung durch Cytochrom P450 (modifiziert nach Porter und Coon, 1991)

Fe, Häm-Eisen im katalytischen Zentrum; *Fp*, Flavoprotein (NADPH Cytochrom P450 Reduktase); *RH*, Substrat; *ROH*, monooxygeniertes Produkt

Zu den Cytochrom P450 vermittelten Oxygenierungen am Kohlenstoff zählen unter anderem Hydroxylierungsreaktionen und oxidative Desalkylierungen an Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoffatomen (Ortiz de Montellano, 1999; Guengerich, 2001).

Die Oxygenierungen an Heteroatomen können sowohl durch Cytochrom P450 als auch durch die flavinhaltige Monooxygenase katalysiert werden (Furnes und Schlenk, 2004; Hlavica, 2002; Ziegler, 2002). Insbesondere die Oxygenierung stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen, die zur Bildung *N*-hydroxylierter

Metabolite führt, ist als eine Biotoxifizierungsreaktion anzusehen (Hlavica, 2002; Clement, 1998). Die *N*-hydroxylierten Metabolite besitzen häufig ein genotoxisches Potential. Bei Vorliegen von primären aromatischen Aminen werden nach *N*-Hydroxylierung Hydroxylamine gebildet. Diese werden in Phase II-Reaktionen an zahlreiche Ester konjugiert und es können instabile Produkte entstehen, die zu Arylnitreniumionen zerfallen (Abb. 1.4). Letztere können DNA-Addukte bilden (Clement, 1998).

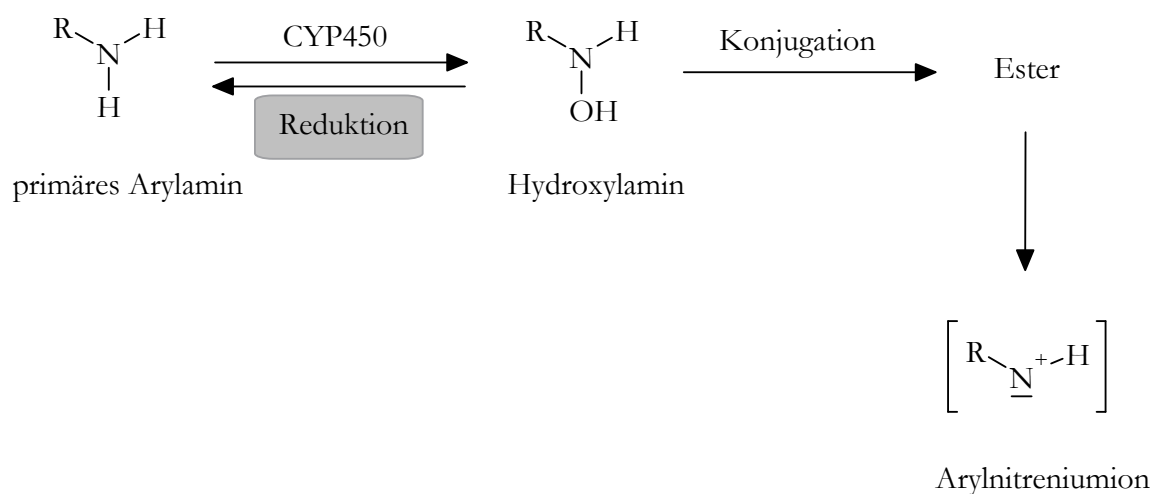


Abb. 1.4 Metabolische Aktivierung von mutagenen und karzinogenen primären Arylaminen (Clement, 1998)

Neben den Monooxygenasen können Oxidationen auch von Oxidasen oder Dehydrogenasen katalysiert werden. Hierzu zählen Monoamin-, Xanthin- und Aldehydoxidase bzw. Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase (Beedham, 1997). Diese Enzyme können teilweise auch die entsprechenden Rückreaktionen vermitteln.

1.1.4.2 Reduktionen

Reduktionen an Kohlenstoffatomen spielen im Vergleich zum oxidativen Metabolismus nur eine untergeordnete Rolle. Beschrieben sind Reduktionen von

Aldehyden und Ketonen durch Aldehyd-Dehydrogenase, Aldehydreduktase oder Ketoreduktasen (Hoffmann und Maser, 2007).

Von größerer Bedeutung sind Reduktionen stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen, auch wenn die enzymatischen Grundlagen bisher weniger gut aufgeklärt werden konnten als die der Oxidationen (Hewick, 1982; Clement, 1998; Clement, 2002). Nitroverbindungen werden durch Cytochrom P450 (Chae *et al.*, 1999; Isin und Guengerich, 2007; Guengerich, 2001) sowie durch Xanthinoxidase (Ueda *et al.*, 2005), Aldehydoxidase (Dick *et al.*, 2006) und andere Reduktasen reduziert (Hewick, 1982), aromatische Azoverbindungen ebenfalls durch Cytochrom P450, Xanthinoxidase und Aldehydoxidase (Stoddart und Levine, 1992; Kitamura und Tatsumi, 1983) und durch NADPH Chinonoxidoreduktase (DT Diaphorase; Horie, 1990).

N-Oxide und N-hydroxylierte Verbindungen werden generell leicht in ihre korrespondierenden Funktionen rückreduziert. Die katalysierenden Enzyme für N-Oxide sind Cytochrom P450 (Guengerich, 2001; Kato *et al.*, 1978) und Aldehydoxidase (Sugihara *et al.*, 1996; Kitamura *et al.*, 2001). Die Reduktion N-hydroxylierter Verbindungen wird in Kapitel 1.2 ausführlich besprochen.

1.1.4.3 Hydrolysen

Als Hydrolysen werden alle Reaktionen bezeichnet, die ohne eine Veränderung der Oxidationszahl einhergehen (Testa und Mayer, 2003). Hydrolysiert werden können Epoxide, Ester, Amide, Carbamate, Hydrazide, Oximester, Phosphorsäureester und Salpetersäureester. Die verantwortlichen Enzyme sind zahlreiche cytosolische oder auch mikrosomale Esterasen und Epoxidhydrolasen (Testa und Mayer, 2003).

Die Hydrolysen führen häufig zu einer Inaktivierung, aber auch zur Bildung der aktiven Wirkform bei Ester-Prodrugs (Testa und Mayer, 2003; Ettmayer *et al.*, 2004).

1.1.4.4 Phase II-Reaktionen

Zum Phase II-Metabolismus zählen Konjugationsreaktionen von Hydroxy-, Amino-, Thiol- oder Säurefunktionen der Xenobiotika mit körpereigenen Substanzen (Testa, 1995).

Zu den Konjugationsreaktionen, die durch Transferasen katalysiert werden, zählen die Reaktionen mit aktivierter Glucuronsäure, aktivierter Essigsäure, aktiviertem Sulfat, den Aminosäuren Glycin und Glutamin, Gluthathion und S-Adenosylmethionin (Testai, 2001).

1.2 REDUKTION *N*-HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN

1.2.1 PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ

Reduktive Biotransformation *N*-hydroxylierter Verbindungen ist von großer pharmakologischer und toxikologischer Bedeutung.

Wie bereits unter 1.1.4.1 erläutert, besitzen *N*-hydroxylierte Verbindungen häufig genotoxisches Potential. Ihre Rückreduktion in die untoxische Ausgangsverbindung bedeutet demnach eine hocheffiziente Möglichkeit der Detoxifizierung (s. auch Abb. 1.4), weil ihre reduzierten Metabolite kein toxisches Potential besitzen (Clement, 1998).

1.2.2 *N*-HYDROXYLIERUNG ALS PRODRUG-PRINZIP

Darüber hinaus können *N*-hydroxylierte Verbindungen als Prodrugs betrachtet werden (Clement, 2002). Ein Prodrug ist ein inaktiver Arzneistoff, der durch Biotransformation in eine aktive Form überführt wird. Die Entwicklung von Prodrugs dient der Verbesserung der Pharmakokinetik oder –dynamik (Testa und Mayer, 2003; Ettmayer *et al.*, 2004).

6,9% der in Deutschland auf dem Markt befindlichen Arzneimittel sind Prodrugs, darunter das Virustatikum Aciclovir (Zovirax[®]), der Lipidsenker Simvastatin

(Zocor[®]), der Protonenpumpenhemmer Omeprazol (Antra MUPS[®]) und das Antihypertonikum Enalapril (Reniten[®]).

Sowohl Amidin- als auch Guanidinfunktionen sind häufig unverzichtbar und in zahlreichen Arzneistoffklassen vertreten (Clement, 1996; Mutschler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2003). Ihre durch Protonierung gebildeten Kationen (Abb. 1.5) sind meist für die Interaktion mit negativ geladenen Carboxylfunktionen der Targetmoleküle verantwortlich. Ferner imitiert die Amidin- bzw. Guanidingruppe die Teilstruktur des Arginins (Kapitel 2.1.1.1). Die permanente Ladung bei physiologischem pH-Wert bedingt aber gleichzeitig eine schlechte orale Bioverfügbarkeit. Durch die Einführung einer Hydroxygruppe und Bildung entsprechender Amidoxime bzw. *N*-Hydroxyguanidine wird ihre Basizität jedoch signifikant erniedrigt (Clement, 2002). Die Prodrugs können dann im Gegensatz zu den intravenös zu applizierenden aktiven Metaboliten auch in Form einer Tablette eingenommen werden.

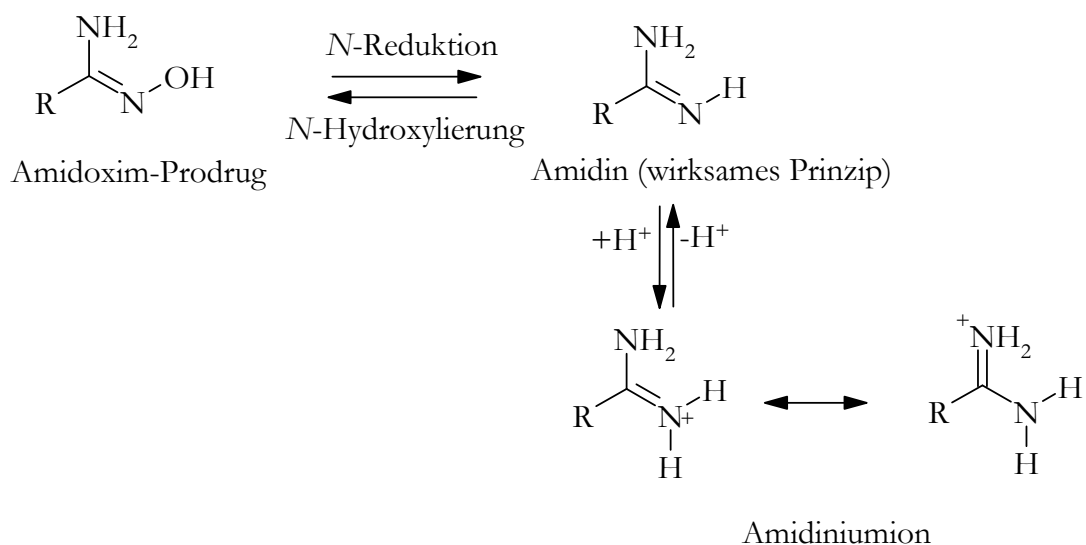


Abb. 1.5 Prodrug-Konzept *N*-hydroxylierter Verbindungen

Arzneistoffe mit Guanidinfunktionen findet man z.B. in der antihypertensiven, antimikrobiellen, antihistaminergen, antiviralen und antidiabetischen Therapie (Mutschler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2003). Amidinfunktionen sind in antikoagulativen, leishmaniziden und antiviralen Wirkstoffen vertreten (Peterlin-Masic *et al.*, 2006; Clement, 2002; Lam *et al.*, 2003).

Das von Clement (1993a) für den trypanoziden und leishmaniziden Wirkstoff Pentamidin entwickelte Prodrug-Prinzip beruht auf der Hydroxylierung von basischen Amidinfunktionen zu den korrespondierenden Amidoximen (Abb. 1.6).

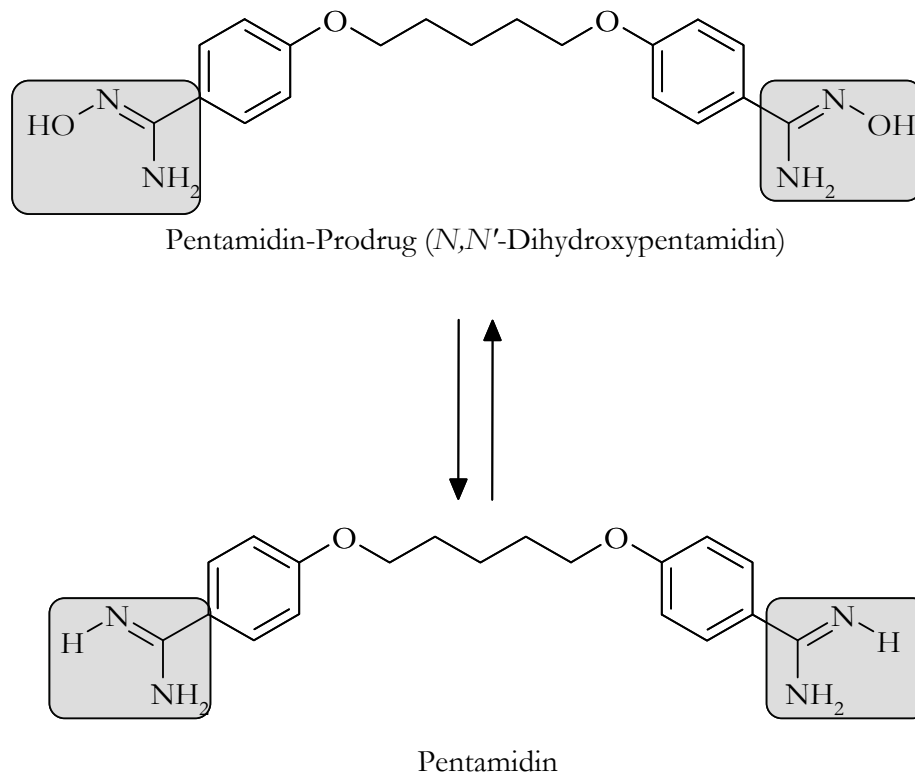


Abb. 1.6 Prodrug und Wirkform des antiparasitären Pentamidin (Clement, 1993a)

Sowohl für die Beurteilung der Pharmakokinetik und der daraus resultierenden Arzneimittelinteraktionspotentiale, als auch der genetischen Variabilität sind die Kenntnisse über die enzymatischen Grundlagen des *N*-reduktiven Metabolismus von *N*-hydroxylierten Prodrugs und genotoxischen *N*-hydroxylierten Metaboliten von großer Bedeutung.

1.2.3 ENZYMATISCHE GRUNDLAGEN

Tab. 1.1 Aerobe Reduktion N-hydroxylierter Verbindungen

| N-hydroxylierte Verbindung | N-reduktive Enzyme | Literatur |
|---|---|---|
| $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N}-\text{OH} \\ \\ \text{R} \end{array}$ Hydroxylamin | Mikrosomen (Cyt b ₅ , NADH Cyt b ₅ Reduktase, 3 rd) Mitochondrien Lösliches Cyt b ₅ und NADH Cyt b ₅ Reduktase Cytosol (Xanthinoxidase) | Kadlubar und Ziegler, 1974 Clement <i>et al.</i> , 2005a Bernheim, 1969 Kurian <i>et al.</i> , 2004 Clement und Kunze, 1992 |
| $\begin{array}{c} \text{N}-\text{OH} \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \\ \text{R}' \end{array}$ Oxim | Mikrosomen (Cyt b ₅ , NADH Cyt b ₅ Reduktase, 3 rd) | Heberling <i>et al.</i> , 2006 |
| $\begin{array}{c} \text{N}-\text{OH} \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Amidoxim | Mikrosomen (Cyt b ₅ , NADH Cyt b ₅ Reduktase, 3 rd) Mitochondrien Lösliches Cyt b ₅ und NADH Cyt b ₅ Reduktase | Clement <i>et al.</i> , 1997 Clement und Lopian, 2003 Havemeyer <i>et al.</i> , 2006 Kurian <i>et al.</i> , 2004 |
| $\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{N}-\text{OH} \\ \diagdown \quad // \\ \text{N} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \\ \text{R}' \quad \text{NH}_2 \end{array}$ N-Hydroxyguanidin | Mikrosomen (Cyt b ₅ , NADH Cyt b ₅ Reduktase, 3 rd) | Clement <i>et al.</i> , 2006a Clement <i>et al.</i> , 1993b |
| $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{N}-\text{OH} \\ \diagdown \quad // \\ \text{H} \quad \text{N} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \\ \text{R} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ N-Hydroxyamidino- hydrazon | Mikrosomen (Cyt b ₅ , NADH Cyt b ₅ Reduktase, 3 rd) Mitochondrien Cytosol (Xanthinoxidase) | Clement <i>et al.</i> , 1997 Clement <i>et al.</i> , 2005b Dambrova <i>et al.</i> , 1998 |

Reduktiver Fremdstoffmetabolismus wurde bislang im Vergleich zu oxidativem weniger intensiv untersucht. Die aeroben Bedingungen und das hohe Redoxpotential in Zellen begünstigen generell Oxidationsreaktionen, so dass viele der beschriebenen Reduktionen nur unter anaeroben Bedingungen stattfinden (Testa, 1995). Ihre Relevanz für *in vivo*- Prozesse ist fragwürdig, da die Leber mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird (Clement, 2002).

Eine Cytochrom P450 vermittelte Reduktion stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen ist ebenfalls üblicherweise unter Sauerstoffausschluss beschrieben (Guengerich, 2001). Eine Ausnahme stellt die Reduktion von Nitroverbindungen durch CYP1A2 dar. Diese findet auch unter aeroben Bedingungen statt (Stiborova *et al.*, 2001; Isin und Guengerich, 2007).

Kadlubar und Ziegler (1974) beschrieben eine mikrosomale Hydroxylamin Reduktase (Tab. 1.1), die sich aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und einer dritten, nicht identifizierten Komponente zusammensetzt. Die von diesem Enzymsystem katalysierte Reaktion ist sauerstoff- und kohlenmonoxid-insensitiv, NADH-abhängig und besitzt ein pH-Optimum im schwach sauren Milieu (Kadlubar *et al.*, 1973).

Die gleichen Charakteristika zeigt ein von Clement *et al.* (1997) aus Schweinelebermikrosomen isoliertes Enzymsystem für die Reduktion einer Vielzahl *N*-hydroxylierter Verbindungen. Amidoxime, *N*-Hydroxyguanidine, *N*-Hydroxyamidinohydrazone und *N*-Methylhydroxylamin werden durch dasselbe Enzymsystem aus Schweinelebermikrosomen reduziert (Tab. 1.1).

Dieses wurde von Lomb (1995) und Möller (1997) isoliert und als Benzamidoxim Reduktase bezeichnet (Clement *et al.*, 1997). Es besteht ebenfalls aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und einer dritten Komponente, vermutlich einem porcinen Cytochrom P450 Enzym der 2D-Familie. Für das verantwortliche humane Enzym wird eine Beteiligung des Cytochrom P450 Isoenzym 2A6 postuliert (Karhan, 2002; Lopian, 2002).

Als Mechanismus für diese Reaktion wird eine Komplexbildung zwischen dem *N*-hydroxylierten Substrat und dem Häm-Eisen des Cytochrom P450 angenommen, die zu einer Modulation des Redoxpotentials des Enzyms führt (Clement, 2002).

Nur so wäre eine Elektronenübertragung von Cytochrom b_5 mit einem Redoxpotential von 0 mV auf ein Cytochrom P450 Enzym, das ohne Substrat ein Redoxpotential von -300 mV besitzt (Guengerich, 2001), denkbar (Abb. 1.7).

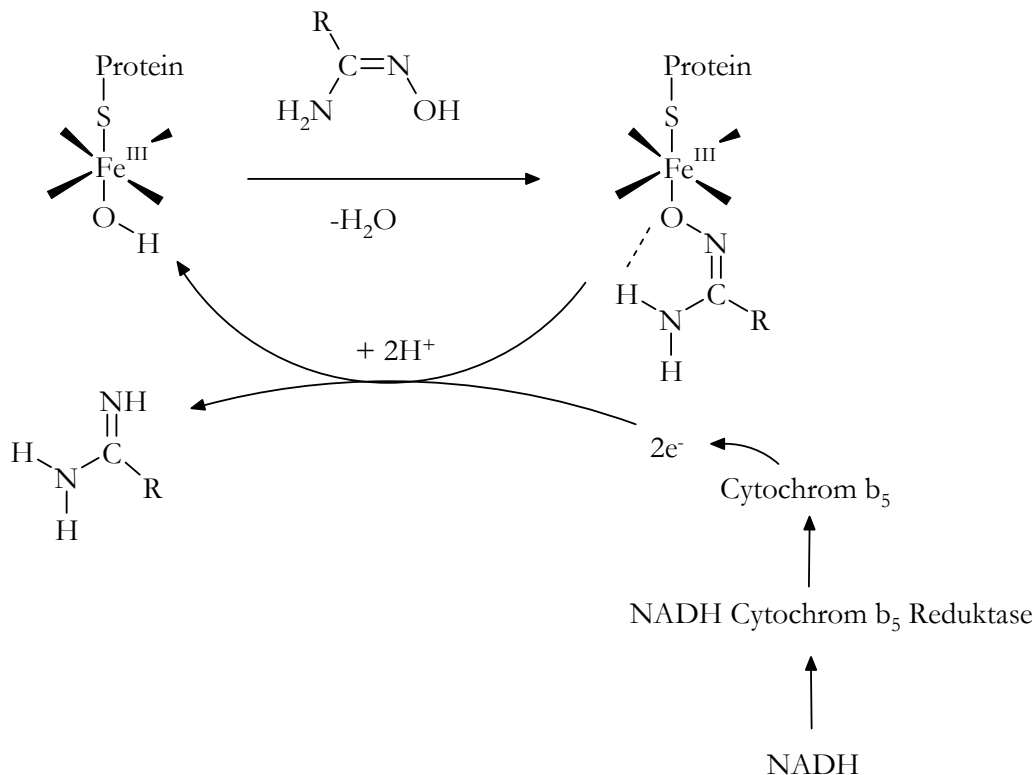


Abb. 1.7 Postulierter Mechanismus der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktion (Clement, 2002)

Die Elektronen werden dann sukzessiv vom NADH über die NADH Cytochrom b_5 Reduktase und Cytochrom b_5 auf die *N*-hydroxylierte Verbindung übertragen, die dadurch reduziert wird.

Die Reduktion wird auch von den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase allein katalysiert, wenn auch mit niedrigeren Umsetzungsraten (Kurian *et al.*, 2004; Clement *et al.*, 2005a). Es ist hierbei aber von großer Bedeutung, ob es sich um die löslichen oder membranständigen Enzyme handelt.

Sowohl Cytochrom b_5 als auch NADH Cytochrom b_5 Reduktase existieren in einer löslichen und einer membrangebundenen Form. Lösliches Cytochrom b_5 kommt in Erythrozyten vor und unterscheidet sich vom membranständigen mikrosomalen in

der C-terminalen Aminosäuresequenz (Lloyd *et al.*, 2004). Sie werden aus verschiedenen mRNAs gebildet, die durch alternatives Splicing desselben Gens oder aus zwei eng verwandten, aber verschiedenen Genen entstehen (Abe *et al.*, 1985). Ebenfalls in Erythrozyten lokalisiert ist die lösliche NADH Cytochrom b_5 Reduktase, der im Unterschied zur membranständigen Form ein kurzer Myristyl-Anker am N-Terminus fehlt. Die sonst identischen Proteine sind Produkte desselben Gens (Shirabe *et al.*, 1995).

Während die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin auch durch die beiden löslichen oder membranständigen Elektronentransportproteine allein katalysiert wird (Kurian *et al.*, 2004), kann eine Umsetzung der membranständigen Formen durch Zugabe der mikrosomalen dritten Komponente um ein Vielfaches gesteigert werden (Clement *et al.*, 2005a; Amschler, 2004).

Basierend auf diesen neueren Erkenntnissen wird der dritten Komponente eine alternative Rolle als Modulator der Wechselwirkung von Cytochrom b_5 und seiner Reduktase diskutiert (Clement *et al.*, 2005a), wie sie auch für Cytochrom b_5 bei Cytochrom P450 katalysierten Oxidationsreaktionen beschrieben ist (Guengerich, 2001).

Oxime werden ebenfalls in Mikrosomen reduktiv metabolisiert. Hier erfolgt die Reduktion jedoch auch bei den membranständigen Formen der Elektronentransportproteine allein durch Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase (Tab. 1.1). Die Zugabe der mikrosomalen dritten Komponente besitzt hierfür keinen signifikanten Einfluss, was auf eine schlechtere Komplexierung bedingt durch die fehlende intramolekulare Wasserstoffbrücke (Abb. 1.7) zurückgeführt werden kann (Heberling *et al.*, 2006).

Darüber hinaus sind vergleichbare reduktive Reaktionen in Fraktionen anderer Organe zu finden. Insbesondere Mitochondrien sind in hohem Maß in der Lage, diese Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen zu katalysieren (Tab. 1.1; Clement *et al.*, 2005b). Das in dieser subzellulären Fraktion verantwortliche Enzymsystem wurde von Havemeyer (2006) isoliert und erstmals alle Komponenten identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006). Auch hier sind Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase beteiligt. Neben diesen beiden Elektronentransportproteinen konnte ein molybdänhaltiges, bislang unbekanntes Protein identifiziert werden. Dieses wird heute als mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC, *mitochondrial Amidoxime Reducing Compound*) bezeichnet und weist eine hohe

Sequenzhomologie zum C-Terminus der pflanzlichen Moco-Sulfurase auf. Eine Beteiligung dieses Proteins an der mitochondrialen Reduktion von Benzamidoxim konnte eindeutig bewiesen werden.

Auch für cytosolische Enzyme sind Reduktionen *N*-hydroxylierter Strukturen unter aeroben Bedingungen beschrieben worden. Das Amidinohydrazonderivat Guanoxabenz und 6-*N*-Hydroxylaminopurin werden durch die ebenfalls molybdänhaltige Xanthinoxidase reduziert (Tab. 1.1; Dambrova et al., 1998; Clement und Kunze, 1992).

1.3 THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der mikrosomalen Reduktion stark basischer *N*-hydroxylierter Amidin- und Guanidin-Strukturen. Wie unter 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben, ist ihre Reduktion von großer pharmakologischer und toxikologischer Relevanz.

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Reduktion verschiedener Arylamidoxime durch mikrosomale Enzyme bereits untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des reduktiven Metabolismus der zu den Arylamidoximen analogen *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine (Abb. 1.8).

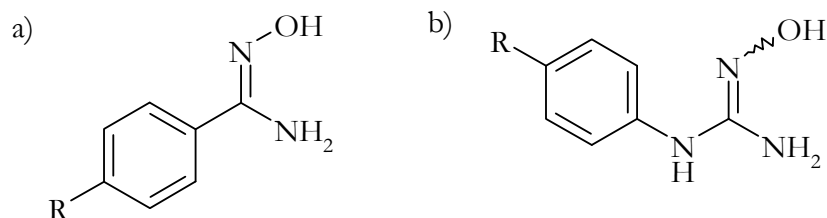


Abb. 1.8 Stark basische *N*-hydroxylierte Verbindungen a) Arylamidoxime, b) *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine

Für diese ist bislang nur ein oxidativer Metabolismus durch Cytochrom P450 und Stickstoffmonoxidsynthasen beschrieben. *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine sind von

pharmakolo-gischem Interesse, weil es sich um Verbindungen handelt, die durch oxidative Metabolisierung Stickstoffmonoxid, einen bedeutenden Signalstoff im Herz-Kreislaufsystem, bei der Bekämpfung von Infektionen und der Steuerung des Nervensystems, generieren können. Reduktive Biotransformation dieser Verbindungen würde eine Konkurrenzreaktion zu dem beschriebenen, für die Wirksamkeit erforderlichen, oxidativen Metabolismus bedeuten.

Zur Aufklärung der enzymatischen Grundlagen soll überprüft werden, ob das für die Benzamidoxim-Reduktion verantwortliche mikrosomale Enzymsystem auch die Reduktion dieser Verbindungen katalysiert.

Im Gegensatz zu Oximen können *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine ebenso wie Arylamidoxime eine intramolekulare Wasserstoffbrücke bilden, welche eine Komplexierung des Enzyms durch Bildung eines fünfgliedrigen Übergangszustands (s. Abb. 1.7) stabilisiert. Die Umsetzung von Oximfunktionen zu den entsprechenden Iminen wird bereits durch die beiden an der Reduktion beteiligten Transportproteine Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase katalysiert. Eine Zugabe der mikrosomalen dritten Komponente zeigt hier keinen steigernden Einfluss auf die Reduktionsraten.

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob der aktivitätssteigernde Effekt der mikrosomalen dritten Komponente bei den *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen vorliegt, welche Rolle dieses Protein also bei der Reduktion der unterschiedlichen *N*-hydroxylierten Strukturen spielt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht darin, die entsprechende mikrosomale Komponente zu identifizieren. Hierfür sollen zunächst die zuvor gefundenen Cytochrom P450 Enzyme, sowie weitere in Frage kommende Enzyme des Fremdstoffmetabolismus auf eine Beteiligung an der mikrosomalen Benzamidoxim-Reduktion getestet werden.

Die bislang getesteten rekombinanten Präparationen weisen keine Benzamidoxim Reduktase Aktivität auf. Als mögliche Ursache wird eine mangelnde Rekonstitution mit den Coenzymen angenommen.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst anhand einer Enzym-Markerreaktion überprüft werden, ob eine erfolgreiche Rekonstitution des rekombinanten Enzyms stattfindet. Im Anschluss werden dann die erforderlichen Rekonstitutionsbedingungen auf die Benzamidoxim-Inkubation übertragen und die entsprechende rekombinante Präparation auf ihre *N*-reduktive Aktivität überprüft.

Zudem soll eine bessere Identifizierung der in der *N*-reduktiven Komponente vorhandenen Proteine ermöglicht werden durch eine Verbesserung der Proteinanalytik, z. B. unter Verwendung sensiblerer Färbemethoden und zweidimensionaler Elektrophoresetechniken.

Darüber hinaus wurden während der Fertigstellung dieser Arbeit neue Erkenntnisse bezüglich des in Mitochondrien für die *N*-reduktive Biotransformation verantwortlichen Proteins gewonnen. Das zuvor in Säugetieren unbekanntes Protein wurde identifiziert und wird heute als mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC, *mitochondrial Amidoxime Reducing Compound*) bezeichnet. Ziel ist es zu überprüfen, ob das in Mitochondrien gefundene Protein auch in der mikrosomalen Fraktion vorhanden und für deren Benzamidoxim Reduktase Aktivität verantwortlich ist.

Bei den in vorangegangenen Arbeiten gereinigten mikrosomalen Fraktionen handelt es sich stets noch um eine Mischung mehrerer Proteine. Um aus dieser vorgereinigten Fraktion schließlich das für die Benzamidoxim Reduktion verantwortliche Protein zu isolieren, soll in dieser Arbeit eine Affinitätschromatographie als „polishing step“ der literaturbekannten Reinigung nachgeschaltet werden. Über die Immobilisierung des Substrates Benzamidoxim soll damit spezifisch die substratbindende Komponente aus der *N*-reduktiven mikrosomalen Fraktion an das Säulenmaterial gebunden und von den Begleitproteinen abgetrennt werden.

2 REDUKTION VON *N*-HYDROXYGUANIDINEN (NOHG)

2.1 EINLEITUNG

2.1.1 THERAPEUTISCHE BEDEUTUNG DER NOHG

2.1.1.1 NO-Donoren

Stickstoffmonoxid (NO) ist nicht nur ein sehr bedeutender Signalstoff im Herz-Kreislaufsystem, sondern spielt auch wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen und der Steuerung des Nervensystems.

In den letzten Jahren wuchs das Interesse an *N*-Hydroxyguanidinen (NOHG), weil diese als Substrate der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) in der Lage sind NO freizusetzen (Cai *et al.*, 2005; Mansuy und Boucher, 2004). Sie imitieren hierbei das während der Oxidation von L-Arginin, welches der physiologische Ausgangsstoff der NO-Produktion ist, entstehende Schlüssel-Intermediat *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA, Abb. 2.1).

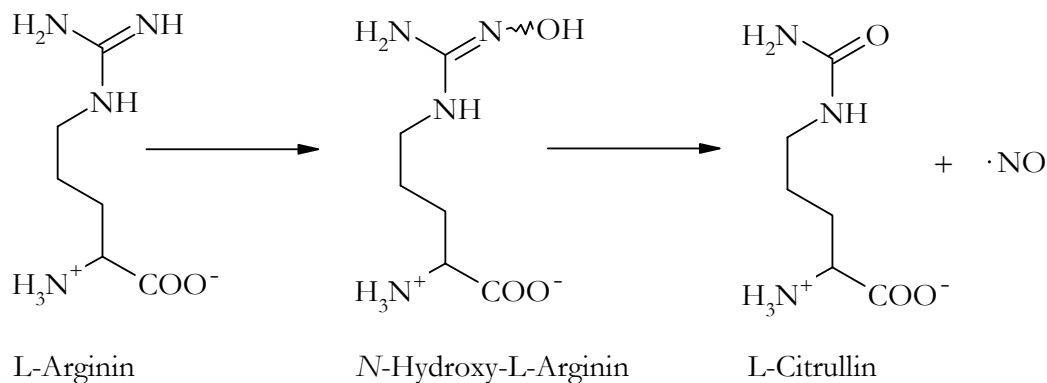


Abb. 2.1 NOS-katalysierte Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid über das Intermediat *N*^ω-Hydroxy-L-arginin

Man unterscheidet drei Isoenzyme der NO-Synthase (Stuehr, 1999): die hauptsächlich in Endothelzellen exprimierte endotheliale NOS (eNOS), die in zentralen und peripheren Nervenzellen vorhandene neuronale NOS (nNOS) und die zuerst in murinen Makrophagen beschriebene, aber in vielen Zelltypen induzierbare NOS (iNOS). Eine eNOS vermittelte NO-Freisetzung führt zu einer Vasodilatation (Müller *et al.*, 2002), die als physiologische Gegenregulation zur Vasokonstriktion des sympathischen Nervensystems sowie des Renin-Angiotensin-Systems für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase von großer Bedeutung ist (Li und Förstermann, 2000). Aber auch die beiden anderen Isoenzyme haben physiologischen und pathophysiologischen Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Sowohl die Regulation der lokalen Durchblutung im Gehirn durch nNOS-vermittelte NO-Freisetzung (Faraci und Brian, 1995) als auch die Kontrolle des systemischen Blutdrucks durch eine zentrale Erniedrigung des Sympathikustonus, werden durch NO beeinflusst.

In den Zellen des Immunsystems, wie etwa Makrophagen, spielt die iNOS-vermittelte Bildung von NO eine bedeutende Rolle. Nach Stimulation mit bakteriellen Endotoxinen oder Zytokinen kommt es innerhalb kurzer Zeit mengenmäßig zu einer im Vergleich zu der NO-Bildung durch die konstitutiven Isoformen exzessiven Freisetzung (Stuehr und Marletta, 1987). Diese spielt in der Immunabwehr eine zentrale Rolle, ist aber auch hauptverantwortlich für den Blutdruckabfall bei einem septischen Schock (Li und Förstermann, 2000). Auch neurodegenerative Erkrankungen wie *M. Alzheimer* und *M. Parkinson* sind mit pathologischen Konzentrationen von durch iNOS produziertem NO assoziiert, die dann zytotoxische Wirkung besitzen (Moncada und Bolanos, 2006).

Aufgrund der vielseitigen Beteiligung von NO an grundlegenden physiologischen und patho-physiologischen Mechanismen ist die Entwicklung von sowohl isoformspezifischen NOS-Inhibitoren als auch von isoformspezifischen NOS-Substraten Gegenstand derzeitiger Arzneimittelforschung.

Während eine Vielzahl potenter, selektiver Inhibitoren bekannt ist (Auvin *et al.*, 2003; Buss, 2005), gibt es nur wenige eng mit L-Arginin bzw. NOHA verwandte α -Aminosäuren, die sich als NOS-Substrate erwiesen haben (Cai *et al.*, 2005; Beranova *et al.*, 2005; Xian *et al.*, 2002) und in der Lage sind, NO freizusetzen. Die Substratbindung unterliegt hierbei hoch spezifischen strukturellen Voraussetzungen. Hinzu kommt, dass das aktive Zentrum der drei NOS-Isoformen

hoch konserviert ist, und sich deshalb die Entwicklung isoformspezifischer NOS-Substrate als schwierig darstellt. 1999 wurde von Renodon-Corniere *et al.* erstmals eine Reihe von *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen präsentiert, die sich nicht nur als Substrate der NOS erwiesen, sondern auch eine gute Selektivität gegenüber der iNOS zeigten (Renodon-Corniere *et al.*, 2002). Ihre Grundstruktur ist in Abb. 2.2 dargestellt.

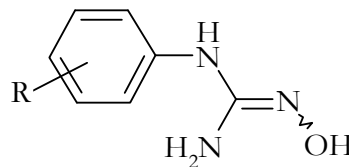


Abb. 2.2 Allgemeine Struktur der *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine

2.1.1.2 Zytotoxische NOHG

NOHG wirken darüber hinaus zytotoxisch und besitzen potentiellen Nutzen als antivirale sowie zytostatische Wirkstoffe (Chern *et al.*, 1997; Tai *et al.*, 1984).

Hydroxyguanidin (Abb. 2.3 a)) ist ein Hemmstoff der DNA-Synthese. Die inhibitorische Potenz ist mit Hydroxyharnstoff (Abb. 2.3 b)) und bestimmten Hydroxamsäurederivaten (Abb. 2.3 c)) vergleichbar (Young *et al.*, 1967). Als Wirkmechanismus für die zytostatischen und zytotoxischen Effekte wurde zunächst die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase (Young *et al.*, 1967), später die NO-Produktion angenommen (Everett *et al.*, 1998). Die Intaktheit der hydroxylierten Aminfunktion, also das Vorliegen der freien Base bei physiologischem pH-Wert, wird als Voraussetzung für die zytotoxische Wirkung dieser Verbindungen diskutiert. Dies wird damit begründet, dass spezielle Hydroxamsäuren wie Glycinhydroxamsäure, die einen pK_a -Wert nahe oder unterhalb des physiologischen pH besitzen, kaum oder gar keinen Effekt gegenüber den genannten Verbindungen mit pK_a -Werten größer als 8,4 zeigten (Hill und Gordon, 1968; Young *et al.*, 1967). Hydroxyguanidin besitzt einen pK_a -Wert von 8,1 (Walker und Walker, 1959).

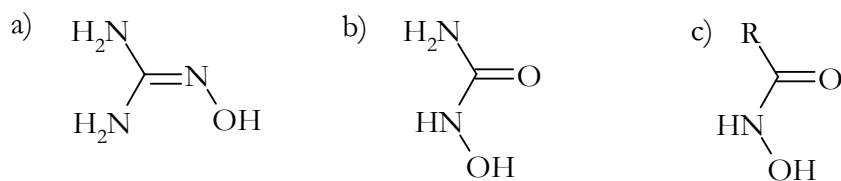


Abb. 2.3 Inhibitoren der DNA-Synthese: a) Hydroxyguanidin, b) Hydroxyharnstoff, c) Hydroxamsäure

2.1.1.3 NOHG als Prodrugs von Guanidinen

Unzureichende pharmakokinetische Parameter sind eine häufige Ursache für das Ausscheiden von Arzneistoffkandidaten in der klinischen Entwicklung. Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes nach oraler Applikation zu verbessern. Die Entwicklung von Prodrugs ist hierbei ein etabliertes Konzept. Ein entsprechendes Prodrug-Design kann zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit, Permeabilität, Transporter-vermittelten Absorption und zur Vermeidung von präsystemischer Elimination führen (Ettmayer *et al.*, 2004; Rahmathullah *et al.*, 1999; Testa und Mayer, 2001).

Guanidinstrukturen sind in zahlreichen Arzneistoffklassen, z.B. in der antihypertensiven, antimikrobiellen, antihistaminergen und antidiabetischen Therapie, vertreten (Clement, 1996; Mutschler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2003). Ihre durch Protonierung gebildeten Kationen sind häufig für die Interaktion mit negativ geladenen Carboxylfunktionen der Targetmoleküle verantwortlich. Ferner imitiert die Guanidgruppe die Teilstruktur des Arginins (Kapitel 2.1.1.1).

Guanidine zählen zu den stärksten organischen Basen mit einem pK_a -Wert von 13,6 (Fukuto, 1996), vergleichbar mit dem von Alkalihydroxiden, die nach einer Protonierung am doppelt gebundenen Stickstoff ein hoch mesomeriestabilisiertes Kation bilden (Abb. 2.6).

Bedingt durch die positive Ladung bei physiologischem pH-Wert sind Guanidine normalerweise nicht in der Lage, biologische Membranen zu passieren, und können nach oraler Applikation nicht aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden (Clement, 2002).

Das von Clement (1993a) für den trypanoziden und leishmaniziden Wirkstoff Pentamidin entwickelte Prodrug-Prinzip beruht auf der Hydroxylierung von

basischen Amidinfunktionen zu den korrespondierenden Amidoximen und lässt sich analog auch auf Guanidinfunktionen übertragen (Clement, 2002). Die Hydroxylierung der Guanidinfunktion führt zu einer enormen Erniedrigung der Basizität auf einen pK_a -Wert von 8,1 (Walker und Walker, 1959) und somit zu einer erhöhten oralen Bioverfügbarkeit (Clement, 2002). Ein Beispiel für ein Prodrug mit einer *N*-hydroxylierten Guanidinstruktur ist der in Abb. 2.4 dargestellte blutdrucksenkende Arzneistoff Guanoxabenz (Benzérial[®], Frankreich) und seine Wirkform Guanabenz (Lisapres[®], Brasilien; Wytensin[®], USA). Die *N*-Hydroxyguanidin-Struktur ist hier Bestandteil eines Amidinohydrazons (Aminoguanidins).



Guanabenz-Prodrug (Guanoxabenz, Benzérial[®]) Guanabenz-Wirkform (Lisapres[®], Wytensin[®])

Abb. 2.4 Prodrug mit antihypertensiver Wirkung

Ebenfalls antihypertensive Wirkung besitzen Debrisoquin und sein Prodrug *N*-Hydroxydebrisoquin (Abb. 2.5), welches gleichzeitig als Metabolit nach *N*-Oxygenierung von Debrisoquin gefunden wurde (Clement, 1993b).

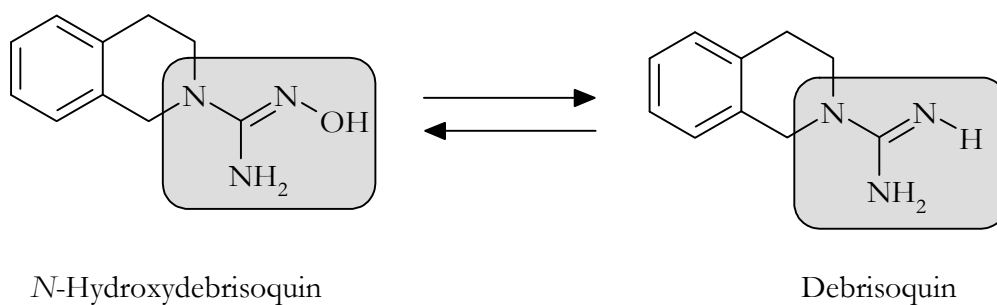


Abb. 2.5 Guanidin- und *N*-Hydroxyguanidin mit antihypertensiver Wirkung

N-hydroxylierte Prodrugs müssen zur Umwandlung in die Wirkform reduktiv metabolisiert werden (Abb. 2.6). Für Substanzen mit Oxim-Funktionen, wie Oxime, Amidoxime und NOHG konnte *in vitro* die sehr effiziente Bildung der entsprechenden Imine, Amidine und Guanidine gezeigt werden (Clement, 2002).

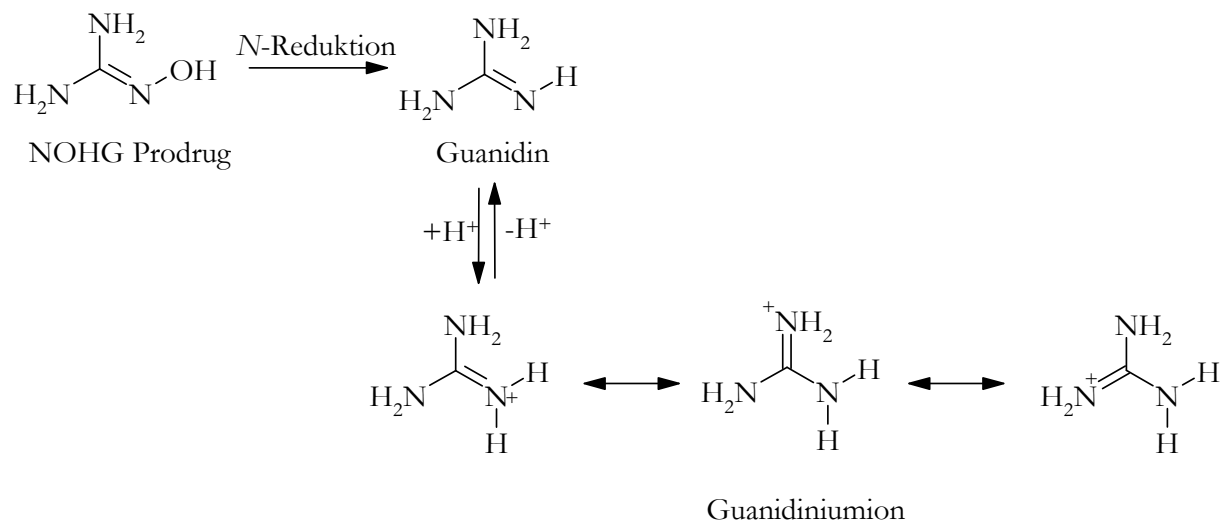


Abb. 2.6 NOHG als Prodrugs von Guanidinen

2.1.2 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ZUM METABOLISMUS VON NOHG

Im Unterschied zu den wenigen bekannten Substraten der NOS (Cai *et al.*, 2005; Kapitel 2.1.1.1), ist eine Vielzahl von Verbindungen bekannt, die nach oxidativer Metabolisierung durch andere Enzyme, insbesondere Cytochrom P450, NO bilden (Andronik-Lion *et al.*, 1992; Clement und Jung, 1994; Jousserandot *et al.*, 1995).

Jousserandot *et al.* (1998) entdeckten, dass unter anderem *N*-4-Chlorphenyl-*N'*-hydroxyguanidin durch Lebermikrosomen von Dexamethason-vorbehandelten Ratten oxidativ zum entsprechenden Harnstoff- bzw. Cyanamid-Derivat und NO metabolisiert wird (Abb. 2.7 a)). Dies geschieht analog zu der in Abb. 2.1 dargestellten Oxidation von NOHA zu Citrullin, die von der NOS katalysiert wird. Gleiches gilt auch für *N*-Hydroxydebrisoquin (Clement *et al.*, 1993b; Clement *et al.*, 1999; Abb. 2.7 b)). Die Bildung der Metabolite war hierbei NADPH- und

Sauerstoff-abhängig und wurde durch Cytochrom P450 Enzyme katalysiert (Jousserandot *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 1993b).

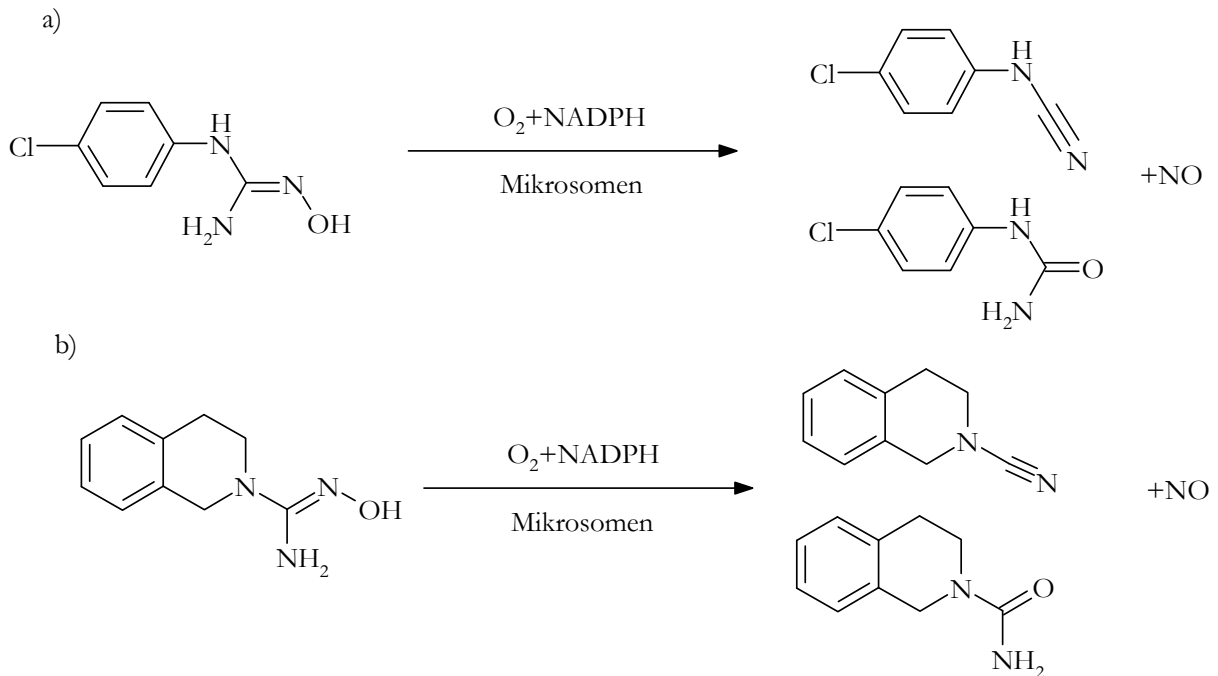


Abb. 2.7 Oxidativer Metabolismus von a) *N*-4-Chlorphenyl-*N'*-hydroxyguanidin und b) *N*-Hydroxydebrisoquin zu den entsprechenden Harnstoff- bzw. Cyanamid-Derivaten und Stickstoffmonoxid.

Die enzymatische Reduktion von Hydroxyguanidin (Abb. 2.3 a)) wurde bereits 1959 von Walker und Walker *in vivo* nach intraperitonealer Injektion in Ratten nachgewiesen. Eine Übersicht über entsprechende *in vitro*-Studien verschiedener NOHG-Derivate gibt Clement (2002). Die an der Reduktion von Oxim-Funktionen beteiligten Enzyme sind aus Schweinelebermikrosomen isoliert und zum Teil auch identifiziert worden. Es handelt sich hierbei um Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase für Oxime (Heberling *et al.*, 2006). Bei Vorliegen von Amidoxim-Funktionen lassen sich die Umsetzungsraten durch Zugabe einer dritten Komponente bis auf das Zehnfache gegenüber dem reinen Zweikomponentensystem aus Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase erhöhen (Clement *et al.*, 2005a). Diese mikrosomale *N*-reduktive Komponente ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht identifiziert, besitzt jedoch Cytochrom P450-

Eigenschaften. LC/MS-Analysen der aus Schweineleber isolierten mikrosomalen *N*-reduktiven Fraktion zeigten zudem wiederholt die Anwesenheit eines Cytochrom P450 Isoenzym der 2D-Familie (Clement *et al.*, 1997).

Das physiologische NOHG, *N*^w-Hydroxy-L-arginin, wird durch Schweinelebermikrosomen ebenfalls zum Arginin reduziert. Allerdings waren Cytochrom b₅, NADH Cytochrom b₅ Reduktase und die mikrosomale *N*-reduktive Komponente nicht in der Lage NOHA zu reduzieren (Clement *et al.*, 2006a).

2.1.3 THEMA UND ZIELSETZUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der mikrosomale reduktive Metabolismus von nicht-physiologischen *N*-Aryl-*N*'-hydroxyguanidinen charakterisiert und die verantwortlichen Enzyme identifiziert werden.

Schweine-, Ratten- und humane Lebermikrosomen und auch mit Cytochrom P450-induzierte Lebermikrosomen von mit Phenobarbital- oder Dexamethason-vorbehandelten Ratten sollten auf ihre Fähigkeit, die Reduktion von NOHG zu katalysieren, untersucht und die Reaktion charakterisiert werden.

Darüber hinaus sollte das mikrosomale Amidoxim-reduzierende Enzymsystem auf seine Fähigkeit, das entsprechende Guanidin zu bilden und der aktivitätssteigernde Einfluss der dritten Komponente auf die Umsetzungsraten des Zweikomponentensystems aus Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase überprüft werden.

Da der oxidative Metabolismus in Mikrosomen von Dexamethason-vorbehandelten Ratten beschrieben ist, sollten Substratbindungsspektren aufgenommen und mit denen von Schweinelebermikrosomen verglichen werden, um zu bestimmen, ob oxidativer und reduktiver Metabolismus von unterschiedlichen Substratbindungsmodi abhängig sind.

Die charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften von Cytochrom P450 Enzymen erlauben nicht nur die exakte Bestimmung der Enzymkonzentration mittels des Kohlenmonoxid-Differenzspektrums (Omura und Sato, 1964), sondern ermöglichen auch eine Aussage über die Art der Substratbindung. Das charakteristische Absorptionsmaximum bei ca. 415 – 420 nm des oxidierten, substratfreien CYP450 kommt durch die prosthetische Gruppe, das Häm,

zustände. Im oxidierten Zustand existieren zwei katalytisch relevante Spin-Zustände, Low und High Spin. Der Low Spin-Zustand ist sechsfach koordiniert, die sechste Koordinationsstelle des Eisens also besetzt. Im High Spin-Zustand ist das Eisen-Ion nur fünffach koordiniert und kein sechster Ligand vorhanden (Abb. 2.8). Beide Spin-Zustände existieren in einem Gleichgewicht und besitzen unterschiedliche Absorptionsmaxima. Im Low Spin-Zustand, der den überwiegend im Grundzustand eines CYP450 vorherrschenden Spin-Zustand mit Wasser als sechstem Liganden darstellt, liegt das Absorptionsmaximum bei 415 – 420 nm, im High Spin-Zustand bei 390 – 400 nm (Testa, 1995).

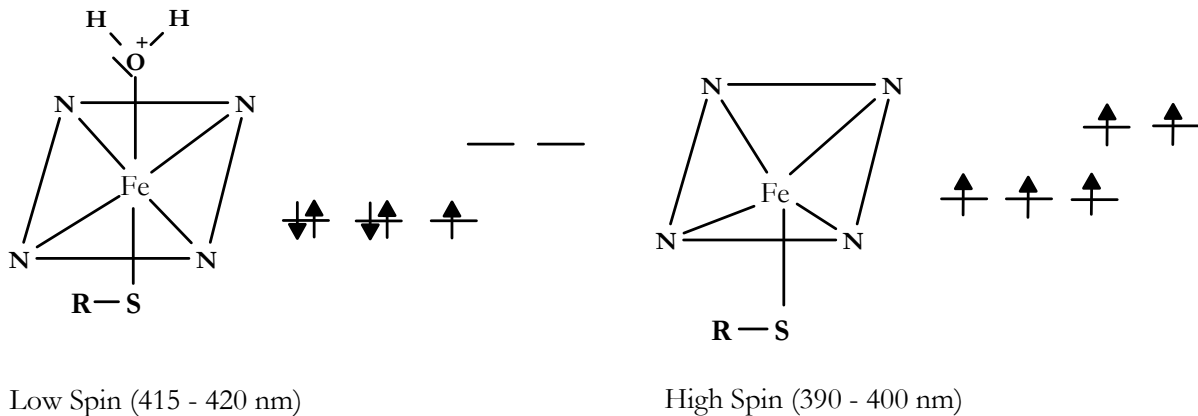


Abb. 2.8 Katalytisch relevante Spin-Zustände von Cytochrom P450 Enzymen und ihre jeweiligen Absorptionsmaxima

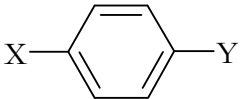
Die substratinduzierte Änderung des Absorptionsspektrums lässt Rückschlüsse auf die Wechselwirkung von Protein und Substrat zu. Durch Substratbindung bzw. durch die Verdrängung des in axialer Position vorhandenen Wassers ändert sich der Spin-Zustand.

Durch Interaktion des Proteins mit Typ I-Substratmolekülen, die nicht direkt mit dem Häm wechselwirken, aber in der Nähe des katalytischen Zentrums binden, wird der sechste Ligand verdrängt. Der Low Spin-Zustand des Häm-Eisens wird zum High Spin-Zustand umgewandelt, was mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen einhergeht (Blauverschiebung). Bei einer Typ II-Bindung handelt es sich um eine koordinative oder Liganden-Bindung. Diese induziert den Low Spin-Zustand und verschiebt daher das Absorptionsmaximum zu längeren Wellenlängen (Rotverschiebung). Substanzen,

die koordinativ an Häm-Eisen binden, sind häufig CYP450-Inhibitoren, die meist über ein freies Elektronenpaar verfügen (z.B. Anilin, Pyridin oder Cyanid). Durch Aufnahme von Differenzspektren werden die Verschiebungen der Absorptionsmaxima deutlich. Typ I-Spektren weisen während der Substratbindung ein Absorptionsmaximum bei 390 nm und ein -minimum bei 420 nm auf. Bei Typ II-Spektren nimmt die Absorption in einem Bereich zwischen 390 und 405 nm ab, während sie zwischen 425 und 435 nm zunimmt (Testa, 1995; Schenkman *et al.*, 1967).

Schließlich sollte der elektronische Effekt verschiedener in *para*-Stellung substituierter *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine auf die Umsetzungen der Mikrosomen und das mikrosomale *N*-reduktive Enzymsystem untersucht werden. Eine Übersicht über die zu testenden Substrate und ihre erwarteten Metabolite gibt Tab. 2.1.

Tab. 2.1 *Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Substrate und ihrer Metabolite*

|  | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------|
| Substrat | X | Y |
| 1a | -OCH ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-OH |
| 1b | -OCH ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-H |
| 2a | -H | -NH-C(NH ₂)=N-OH |
| 2b | -H | -NH-C(NH ₂)=N-H |
| 3a | -Cl | -NH-C(NH ₂)=N-OH |
| 3b | -Cl | -NH-C(NH ₂)=N-H |
| 4a | -CH ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-OH |
| 4b | -CH ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-H |
| 5a | -CF ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-OH |
| 5b | -CF ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-H |
| 6a | -C(CH ₃) ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-OH |
| 6b | -C(CH ₃) ₃ | -NH-C(NH ₂)=N-H |

2.2 METHODEN

2.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

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

Die Synthese der *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine wurde 2002 von Renodon-Corniere *et al.* beschrieben. Arylguanidine wurden über eine Reaktion des Amins mit *N,N'*-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)pyrazol-1-carboxamidin erhalten mit anschließender saurer Abspaltung der Schutzgruppe (Dijols *et al.*, 2002). Die Synthesen waren nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

2.2.2 ENZYMPRÄPARATIONEN

2.2.2.1 Lebermikrosomen unterschiedlicher Spezies

Proben humaner Leber wurden aus der medizinischen Abteilung der Christian-Albrechts-Universität Kiel erhalten. Die Verwendung für Metabolismusstudien war zuvor von der Ethikkommission sowie den Patienten genehmigt worden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Schweinelebern stammten aus weiblichen oder kastrierten Schweinen (Pietraint, 7 Monate alt) und wurden direkt nach Tötung und Ausbluten des Tieres entnommen.

Für die Cytochrom P450-induzierten Rattenlebermikrosomen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten vier Tage lang intraperitoneal entweder mit Phenobarbital (80 mg/kg/Tag, in 0,9 % NaCl-Lösung) oder mit Dexamethason (50 mg/kg/Tag, in Maiskeimöl) behandelt.

Die Mikrosomen wurden nach bekannten Methoden mittels Ultrazentrifugation erhalten (Clement *et al.*, 1996; Omura und Sato, 1964) und bei –80 °C gelagert.

Die nicht induzierten Rattenlebermikrosomen wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, bezogen.

2.2.2.2 Mikrosomales *N*-reduktives Enzymsystem

Cytochrom b₅, NADH Cytochrom b₅ Reduktase und die mikrosomale dritte Komponente wurden nach dem Verfahren von Clement *et al.* (1997) aufgereinigt. Thesit (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde zur Solubilisation der mikrosomalen Proteine in den Elutionspuffern verwendet. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C.

2.2.3 REDUKTION VON NOHG ZU GUANIDINEN

2.2.3.1 Charakterisierung der Enzymquellen

2.2.3.1.1 Proteingehaltsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Enzymquellen wurden mittels der BCA-Methode nach Smith *et al.* (1985) bestimmt. Die Proteine wurden vor der Analyse mit Hilfe des Compat Able™ Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) gefällt, um störende Begleitsubstanzen in den Puffern zu entfernen. Nach Aufnahme mit dem BCA-Reagenz (Pierce, Rockford, IL, USA) wurden die Proben bei 562 nm vermessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe einer mit bekannten Konzentrationen an Rinderserumalbumin erstellten Kalibriergeraden (Smith *et al.*, 1985).

2.2.3.1.2 Cytochrom P450 Gehaltsbestimmung

Die Bestimmung des Cytochrom P450 Gehaltes erfolgte durch Aufnahme eines Kohlenmonoxid-Differenzspektrums nach dem von Omura und Sato (1964) beschriebenen Verfahren. Zur Berechnung des Cytochrom P450 Gehaltes wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ des Fe(II)-CO-Komplexes herangezogen (Omura und Sato, 1964).

2.2.3.1.3 Cytochrom b₅ Gehaltsbestimmung

Der Cytochrom b₅ Gehalt wurde nach der Methode von Estabrook und Werringloer (1978) durch Aufnahme eines Differenzspektrums von oxidiert und NADH vermittelter reduzierter Form des Cytochroms b₅ bestimmt. Nach Aufnahme des Spektrums wurde die resultierende Absorptionsdifferenz zwischen dem ermittelten Absorptionsmaximum (~426 nm) und -minimum (~409 nm) berechnet. Zur Berechnung des Cytochrom b₅ Gehaltes wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ der reduzierten Form des Cytochrom b₅ herangezogen (Estabrook und Werringloer, 1978).

2.2.3.1.4 NADH Cytochrom b₅ Reduktase Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung der NADH Cytochrom b₅ Reduktase erfolgte - wie bei Mihara und Sato (1978) beschrieben - spektrophotometrisch. Der Enzymassay in 500 μl Gesamtvolumen setzte sich dabei wie folgt zusammen: NADH Cytochrom b₅ Reduktase, 0,1 mM NADH und 1 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5. Alle Reagenzien wurden stets frisch in Puffer gelöst, die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung wurde lichtgeschützt gelagert. Die Absorptionsabnahme wurde nach dem Starten der Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates bei 420 nm über eine Messzeit von 20 Sekunden bei 25 °C verfolgt.

Das Messprinzip beruht auf der enzymatischen Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) zu Kaliumhexacyanoferrat(II). Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon = 1,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Kaliumhexacyanoferrat(III) herangezogen (Mihara und Sato, 1978).

Die Enzymaktivität wird in der vorliegenden Arbeit durchgehend in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute ein μmol reduziertes Ferricyanid umsetzt.

2.2.3.2 *In vitro* Biotransformationsansätze

2.2.3.2.1 Inkubationen mit Mikrosomen unterschiedlicher Spezies

Die Inkubationen wurden bei 37 °C im Schüttelwasserbad in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Der Inkubationsansatz mit einem Endvolumen von 300 µl war wie folgt zusammengesetzt: 1 mg/ml Protein, 1 mM NOHG und 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates gestartet und nach 30 Minuten durch Zugabe von Methanol abgestoppt. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Guanidin wurde mittels der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

2.2.3.2.2 Inkubationen mit dem gereinigten mikrosomalen *N*-reduktiven Enzymsystem

Für die Inkubationen mit dem rekonstituierten Enzymsystem wurde zu der mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 gepufferten Suspension aus 75 – 200 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 – 0,35 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase und 5 µg dritter Komponente 40 µM Dilauryl-phosphatidylcholin (DLPC) zugesetzt und zwei Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde das Substrat NOHG in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben und die Reaktion nach einer erneuten Vorinkubation von drei Minuten mit 1 mM NADH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 µl. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Guanidin wurde mittels der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

2.2.3.3 HPLC-Analytik

Für jedes Substrat wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine eigene HPLC-Analytik entwickelt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Substrate konnten für die einzelnen *para*-substituierten NOHG ähnliche Fließmittelsysteme verwendet werden.

Für (1) bis (3) wurde folgendes HPLC-System verwendet:

| | |
|--------------------|---|
| HPLC-Pumpe: | Waters 1525 binary HPLC Pumpe, (Waters, Milford, CT, USA) |
| Detektor: | Waters 2487 Dual λ Variable Wavelength Detector (Waters, Milford, CT, USA) |
| Autosampler: | Waters 700 satellite WISP Autosampler (Waters, Milford, CT, USA) |
| Integrator: | EZChromElite™ Aufnahme und Auswertesoftware, Version 2.8.3 (EZChromElite SS42ox Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA) |
| Stationäre Phase: | Prodigy® C18 250 × 4,6 mm; 5 μ m (Phenomenex, Aschaffenburg) mit Nova-Pak® C18, 4 μ m Guard Column (Waters, Milford, CT, USA) |
| Flussrate: | 1,0 ml/min |
| Detektion: | $\lambda = 240$ nm |
| Injektionsvolumen: | 10 μ l |

Für (4) und (5) wurde folgendes HPLC-System verwendet:

| | |
|--------------|--|
| HPLC-Pumpe: | Spectra Physics HPLC Pump (Spectra Physics, Oregon, OR, USA) |
| Autosampler: | AS300 Autosampler (Spectra Physics, Oregon, OR, USA) |
| Detektor: | Spectra System UV 2000 Detector (Spectra Physics, Oregon, OR, USA) |
| Integrator: | Borwin® Software (JMBS Developpements, Grenoble, Frankreich) |

Stationäre Phase: Colochrom[®] 250 × 4 mm Nucleosil 100 A C8; 5 μm
(Colochrom, Gagny, Frankreich) für (4)

Inertsil[®] 250 × 4,6 mm C8; 5 μm (Interchrom, Montlucon,
Frankreich) für (5)

Flussrate: 1,0 ml/min

Detektion: $\lambda = 225 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 10 μl

Verwendete mobile Phasen für die *para*-substituierten NOHG und ihre
entsprechenden Guanidine und die entsprechenden Retentionszeiten:

(1) *N*-4-Methoxyphenyl-*N*'-hydroxyguanidin und 4-Methoxyphenylguanidin

94 % 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,5; 6 % Acetonitril (v/v)

$R_{t\text{NOHG}} = 7,7 \pm 0,2 \text{ min}$, $R_{t\text{Guanidin}} = 10,6 \pm 0,1 \text{ min}$

(2) *N*-Phenyl-*N*'-hydroxyguanidin und Phenylguanidin

96 % 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,5; 4 % Acetonitril (v/v)

$R_{t\text{NOHG}} = 7,8 \pm 0,1 \text{ min}$, $R_{t\text{Guanidin}} = 10,4 \pm 0,2 \text{ min}$

(3) *N*-4-Chlorphenyl-*N*'-hydroxyguanidin und 4-Chlorphenylguanidin

90 % 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,5; 10 % Acetonitril (v/v)

$R_{t\text{NOHG}} = 10,7 \pm 0,1 \text{ min}$, $R_{t\text{Guanidin}} = 13,8 \pm 0,1 \text{ min}$

(4) *N*-4-Tolyl-*N*'-hydroxyguanidin und 4-Tolylguanidin und *N*-4-^tButylphenyl-*N*'-hydroxyguanidin und 4-^tButylphenylguanidin

A: 5 mM Phosphorsäure

B: Acetonitril

0 – 5 min: 97 % A, 3 % B

20 min: 72 % A, 28 % B

25 min: 22 % A, 78 % B

35 min: 97 % A, 3 % B

35 – 50 min: 97 % A, 3 % B

$R_{t\text{NOHG}} = 7,3 \pm 0,2 \text{ min}$, $R_{t\text{Guanidin}} = 10,6 \pm 0,3 \text{ min}$ (4-CH₃)

$R_{t\text{NOHG}} = 25,4 \pm 0,1 \text{ min}$, $R_{t\text{Guanidin}} = 23,0 \pm 0,2 \text{ min}$ (4-^tBu)

(5) *N*-4-Trifluormethylphenyl-*N*'-hydroxyguanidin und 4-Trifluormethylphenylguanidin

A: 100 mM Ammoniumacetat, pH 6,5

B: Acetonitril

0 – 2 min: 98 % A, 2 % B

10 min: 78 % A, 22 % B

12 min: 48 % A, 52 % B

22 min: 98 % A, 2 % B

22 – 37 min: 97 % A, 3 % B

 $R_{t\text{NOHG}} = 20,9 \pm 0,1 \text{ min}$, $R_{t\text{Guanidin}} = 18,3 \pm 0,1 \text{ min}$

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius® Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Methanol 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der jeweilige synthetisch hergestellte Metabolit in definierten Konzentrationen im Fließmittel gelöst. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich (0 – 200 µM) linear (jeweils $r > 0,999$). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Das jeweilige korrespondierende Guanidin wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 gelöst, den Inkubationsansätzen 0,1 mg/ml hitzedenaturiertes Protein sowie 0,5 bzw. 1 mM des entsprechenden NOHG zugefügt. Diese wurden 35 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert, mit der entsprechenden Menge Methanol abgestoppt und nach Zentrifugation bei 10000 *g* anschließend mittels HPLC quantifiziert. Es wurden Wiederfindungsraten zwischen $100,4 \pm 2,8$ und $109,0 \pm 5,0$ % ermittelt.

2.2.3.4 LC/MS-Analytik

Die Identifizierung der gebildeten Guanidin-Metabolite erfolgte durch Vergleich mit den Retentionszeiten sowie den Massenspektren der synthetischen Standards mithilfe einer LC/MS-Analytik nach Modifikation der unter 2.2.3.3 entwickelten

Methode. Nach Einstellung mit Phosphorsäure auf pH 2,5 wurde der Eluent durch einen Sartorius-Membranfilter (0,45 µm) filtriert und vor Verwendung 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Für die Analytik wurde das folgende System verwendet:

| | |
|--------------------|--|
| HPLC Pumpe | HP 1100 Hochdruckgradientenpumpe (Hewlett Packard, Waldbronn) |
| Injektor | 5 µl Probenschleife (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA) |
| Detektor | HP 1100 VWD UV/VIS Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn) |
| Massenspektrometer | Esquire LC (Bruker Daltonics, Bremen) |
| Interface | ESI, positiver Ionenmodus |
| Sprühdruk | 12 psi |
| Trockengas | 6,5 l/min |
| Trockentemperatur | 350 °C |
| Scanbereich | 50 – 600 m/z |
| Split | 1 : 5,5 |
| Integrator | Data Analysis TM , Version 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen) |
| Stationäre Phase | Prodigy [®] C18 250 × 4,6 mm; 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg) Nova-Pak [®] C18; 4 µm (Waters, Milford, CT, USA) |
| Mobile Phasen | <u><i>N</i>-4-Methoxyphenyl-<i>N</i>'-hydroxyguanidin und 4-Methoxyphenylguanidin</u> 94 % 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,5 6 % Acetonitril (v/v) <u><i>N</i>-Phenyl-<i>N</i>'-hydroxyguanidin und Phenylguanidin</u> 96 % 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,5 4 % Acetonitril (v/v) |
| Flussrate | 1 ml/min |
| Detektion | λ = 240 nm |
| Injektionsvolumen | 50 µl |
| Retentionszeiten | R _{t NOHG} = 7,0 ± 0,1 min, R _{t Guanidin} 9,2 ± 0,1 min (4-OCH ₃) R _{t NOHG} = 7,1 ± 0,1 min, R _{t Guanidin} 9,8 ± 0,2 min (4-H) |

2.2.3.5 Substratbindungsspektren

Es wurden Substratbindungsspektren in Anlehnung an das von Schenkman *et al.* (1967) entwickelte Verfahren vermessen.

Die Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur in einem Uvikon 942 (Kontron Biotek, Neufahrn) oder einem Cary 50 (Varian, Darmstadt) Spektrophotometer in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt. Die Enzymquelle wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 auf einen Cytochrom P450 Gehalt von 1,1 bis 1,5 μ M eingestellt (Omura und Sato, 1964). Das Volumen betrug 500 μ l. Das zu untersuchende Substrat wurde zunächst in DMSO gelöst und schrittweise bis zu einer Konzentration von 20 mM in die Probenküvette gegeben. Die Referenzküvette wurde entsprechend mit DMSO bis zum gleichen Volumen aufgefüllt. Die höchste DMSO-Konzentration in der Küvette betrug 4 %.

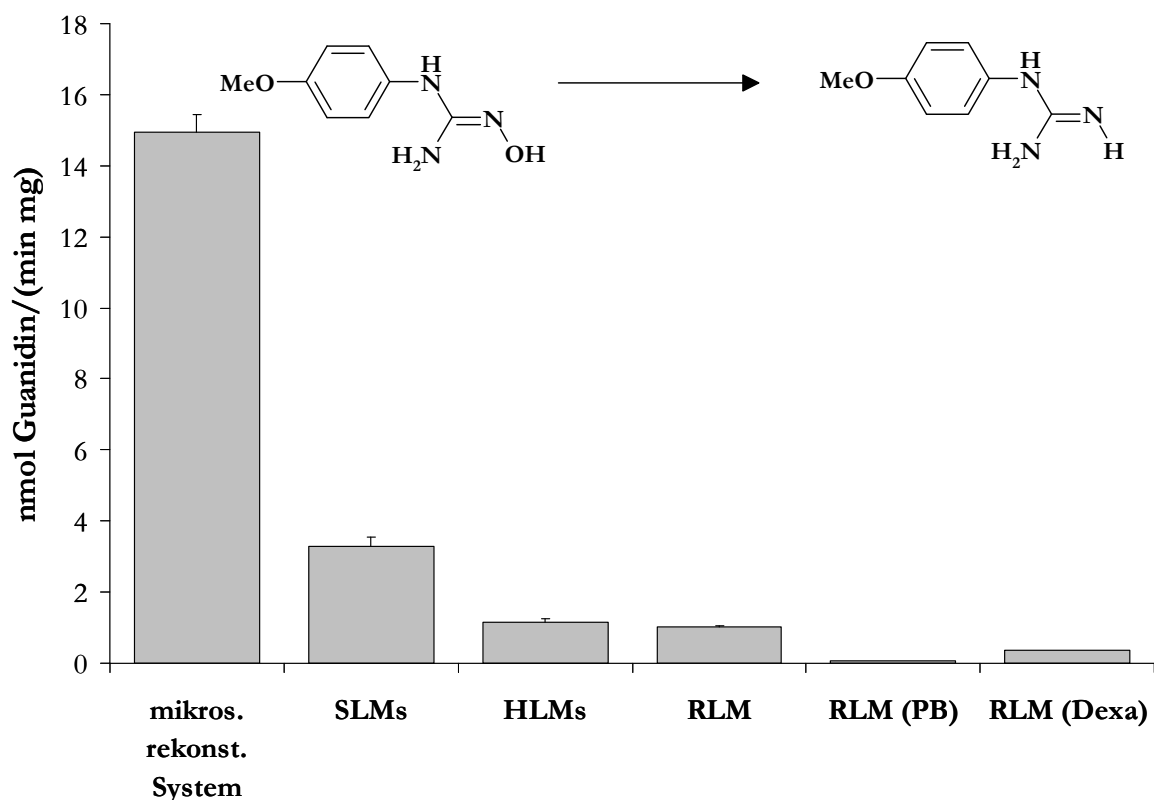
Es wurden Spektren im Bereich von 380 bis 500 nm aufgenommen.

2.3 ERGEBNISSE

2.3.1 *IN VITRO* STUDIEN MIT MIKROSOMEN UNTERSCHIEDLICHER SPEZIES

Die Reduktion von *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin durch Lebermikrosomen unterschiedlicher Spezies wurde untersucht und mittels der in 2.2.3.3 aufgeführten HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.9 dargestellt.

Alle untersuchten Enzymquellen waren in der Lage, das NOHG reaktiv zu metabolisieren, wenn auch mit unterschiedlichen Umsetzungsraten. Für Schweinelebermikrosomen konnten die höchsten Umsetzungsraten ermittelt werden ($3,2 \pm 0,3$ nmol Guanidin/(min mg)), gefolgt von humanen Lebermikrosomen ($1,2 \pm 0,1$ nmol Guanidin/(min mg)). Rattenlebermikrosomen bildeten das entsprechende Guanidin mit einer Reduktionsrate von $1,0 \pm 0,1$ nmol Guanidin/(min mg). Eine Cytochrom P450-Induktion in Lebermikrosomen von Phenobarbital- oder Dexamethason-vorbehandelten Ratten führte zu einer weiteren Erniedrigung der Reduktionsraten ($< 0,4$ nmol Guanidin/(min mg)).



SLMs = Schweinelebermikrosomen; *HLMs* = humane Lebermikrosomen; *RLM* = Rattenlebermikrosomen

Abb. 2.9 Reduktiver Metabolismus von *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin durch das rekonstituierte mikrosomale Enzymsystem und Lebermikrosomen von Schwein, Mensch und Ratte, sowie mit Phenobarbital (PB) oder Dexamethason (Dexa) vorbehandelter Ratte

Die Durchführung der Inkubationen ist in den Kapiteln 2.2.3.2.1 bzw. 2.2.3.2.2 beschrieben. Gebildetes 4-Methoxyphenylguanidin wurde mittels der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Stattdessen waren diese die einzigen Enzymquellen, bei denen andere Reaktionsprodukte mit höheren Retentionszeiten gefunden werden konnten, die denen der synthetischen Standards der Harnstoff- bzw. Cyanamid-Derivate entsprachen (Daten nicht gezeigt). Alle anderen untersuchten Enzymquellen,

inklusive der nicht vorbehandelten Rattenlebermikrosomen, zeigten keine Umsetzung zu den oxidierten Metaboliten.

2.3.2 *IN VITRO* STUDIEN MIT DEM GEREINIGTEN MIKROSOMALEN *N*-REDUKTIVEN ENZYMSYSTEM

Die Reduktion von *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen durch das gereinigte mikrosomale Enzymsystem wurde untersucht und mittels der in 2.2.3.3 aufgeführten HPLC-Analytik quantifiziert. Es konnte die Reduktion der nicht-physiologischen NOHG Verbindung *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin mit einer Umsetzungsrate von $14,9 \pm 0,5$ nmol Guanidin/(min mg) gezeigt werden (Abb. 2.9).

Des Weiteren wurde die Fähigkeit der dritten Komponente, die Umsetzungsrate von *N*-Phenyl-*N'*-hydroxyguanidin gegenüber dem Zweikomponentensystem zu erhöhen, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Für den Komplettansatz konnte eine Umsetzungsrate von $24,8 \pm 1,1$ nmol Guanidin/(min mg) erhalten werden. Das Weglassen sowohl der dritten Komponente als auch von Cytochrom b_5 führte zu einem vollständigen Verlust der Reduktase-Aktivität, wohingegen in der Zusammensetzung ohne NADH Cytochrom b_5 Reduktase noch eine kleinere Restaktivität vorhanden war.

NADH konnte gegenüber NADPH als der bevorzugte Cofaktor ebenso ermittelt werden wie die Präferenz des schwach sauren pH-Wertes von 6,3 gegenüber pH 7,4.

Unter Verwendung von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase in einem molaren Verhältnis von 10:1, welches als physiologisch angesehen wird (Kurian *et al.*, 2004; Yang und Cederbaum, 1996), konnte im Zweikomponentensystem eine geringe Umsetzung detektiert werden. Die Zugabe der dritten Komponente führte jedoch zu einer signifikanten ($p < 0,05$) 2,8-fachen Erhöhung der Umsetzungsrate (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2.2 In vitro Umsetzung von N-Phenyl-N'-hydroxyguanidin durch das aus Schweineleber gereinigte mikrosomale Enzymsystem

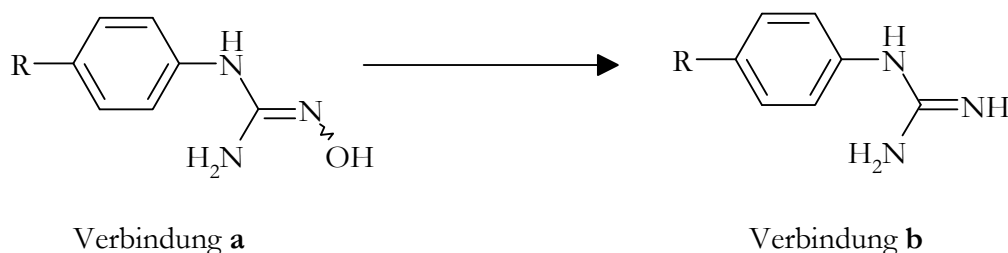
| Inkubationsbedingungen | pH | Aktivität |
|---|-----|------------------------|
| | | nmol/(min mg) |
| Komplettansatz | 6,3 | 24,8 ± 1,1 |
| Komplettansatz | 7,4 | 10,7 ± 1,1* |
| - dritte Komponente | 6,3 | ND ^a |
| - Cytochrom b ₅ | 6,3 | ND ^a |
| - NADH Cytochrom b ₅ Reduktase | 6,3 | 4,7 ± 0,2* |
| - NADH, +NADPH | 6,3 | 11,7 ± 1,3* |
| - NADH, +NADPH | 7,4 | 5,7 ± 0,2 [#] |
| - Protein | 6,3 | ND ^a |
| - NADH | 6,3 | ND ^a |
| - Substrat | 6,3 | ND ^a |

^aNicht detektierbar, < 3,1 nmol/(min mg); * p < 0,001; gegenüber dem Komplettansatz bei pH 6,3 [#]p < 0,001; gegenüber dem Komplettansatz bei pH 7,4

Der Komplettansatz bestand aus 5 µg der dritten Komponente, 75 pmol Cytochrom b₅ und 0,35 U NADH Cytochrom b₅ Reduktase, 0,5 mM N-Phenyl-N'-hydroxyguanidin und 1 mM NADH in einem Reaktionsansatz von 150 µl. Weitere Inkubationsbedingungen sind in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben. Gebildetes Phenylguanidin wurde mittels der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.3 *IN VITRO* STUDIEN UNTERSCHIEDLICHER *PARA*-SUBSTITUIERTER NOHG

Die Reduktion unterschiedlicher *para*-substituierter *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine zu den entsprechenden Guanidinderivaten durch Schweinelebermikrosomen und das mikrosomale *N*-reduktive Enzymsystem wurde untersucht und mittels der in 2.2.3.3 aufgeführten HPLC-Analytiken quantifiziert (Abb. 2.10).



| Verbindung | R |
|------------|-----------------------------------|
| 1 | -OCH ₃ |
| 2 | -H |
| 3 | -Cl |
| 4 | -CH ₃ |
| 5 | -CF ₃ |
| 6 | -C(CH ₃) ₃ |

Abb. 2.10 *In vitro* Reduktion *para*-substituierter *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.3.2.1 beschrieben.

Alle untersuchten *para*-substituierten *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine wurden von Schweineleber-mikrosomen zu den entsprechenden Guanidin-Derivaten metabolisiert (Tab. 2.3).

Die Umsatzraten lagen zwischen $2,39 \pm 0,02$ nmol **3b**/(min mg) für **3a** und $4,12 \pm 0,01$ nmol **6b**/(min mg) für **6a**.

Steigende Umsatzraten wurden in der folgenden Reihenfolge erhalten:

$-\text{Cl} \leq -\text{CH}_3 < -\text{CF}_3 < -\text{H} < -\text{OCH}_3 < -\text{C}(\text{CH}_3)_3$, allerdings mit geringen Unterschieden.

Die Amidoxim reduzierenden mikrosomalen Proteine konnten ebenfalls als das für die Reduktion dreier verschieden *para*-substituierter *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine verantwortliche Enzymsystem identifiziert werden. Für *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin (**1a**) sind die Ergebnisse bereits in Abb. 2.9 dargestellt und für *N*-Phenyl-*N'*-hydroxyguanidin (**2a**) in Tab. 2.2. Für *N*-4-Chlorphenyl-*N'*-hydroxyguanidin (**3a**) wurde eine Reduktionsrate von $20,91 \pm 0,94$ nmol *N*-4-Chlorphenyl-guanidin/(min mg) (**3b**) ermittelt.

Der bevorzugte Cofaktor war NADH gegenüber NADPH für alle untersuchten Substrate und auch die Präferenz des schwach sauren pH-Wertes konnte für nahezu alle Substrate ermittelt werden (Tab. 2.3).

Tab. 2.3 *In vitro* Umsetzung unterschiedlich *para*-substituierter *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine durch Schweinelebermikrosomen

| Inkubations- bedingungen | nmol/(min mg) | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1b^a | 2b^a | 3b^a | 4b^a | 5b^a | 6b^a |
| NADH, pH 6,3 | 3,30 ± 0,26 | 2,75 ± 0,54 | 2,39 ± 0,02 | 2,41 ± 0,41 | 2,57 ± 0,07 | 4,12 ± 0,01 |
| | *,° | *,#°,° | #,° | ° | #,° | *,#°,° |
| NADPH, pH 6,3 | 2,04 ± 0,18 | 1,56 ± 0,12 | 2,08 ± 0,88 | 1,59 ± 0,11 | 1,81 ± 0,45 | 2,54 ± 0,02 |
| NADH, pH 7,4 | 3,78 ± 0,18 | 1,28 ± 0,03 | 1,38 ± 0,16 | 1,54 ± 0,02 | 1,29 ± 0,04 | 2,08 ± 0,23 |
| NADPH, pH 7,4 | 2,01 ± 0,47 | 0,63 ± 0,02 | 0,42 ± 0,15 | 0,55 ± 0,29 | 0,72 ± 0,07 | 0,97 ± 0,25 |

^a siehe Abb. 2.10

**p* < 0,05; gegenüber NADPH, pH 6,3

#*p* < 0,05; gegenüber NADH, pH 7,4

°*p* < 0,05; gegenüber NADPH, pH 7,4

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.3.2.1 beschrieben. Gebildete Guanidinderivate wurden mittels der in Kapitel 2.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytiken quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.4 IDENTIFIZIERUNG DER GEBILDETEN GUANIDIN-METABOLITEN

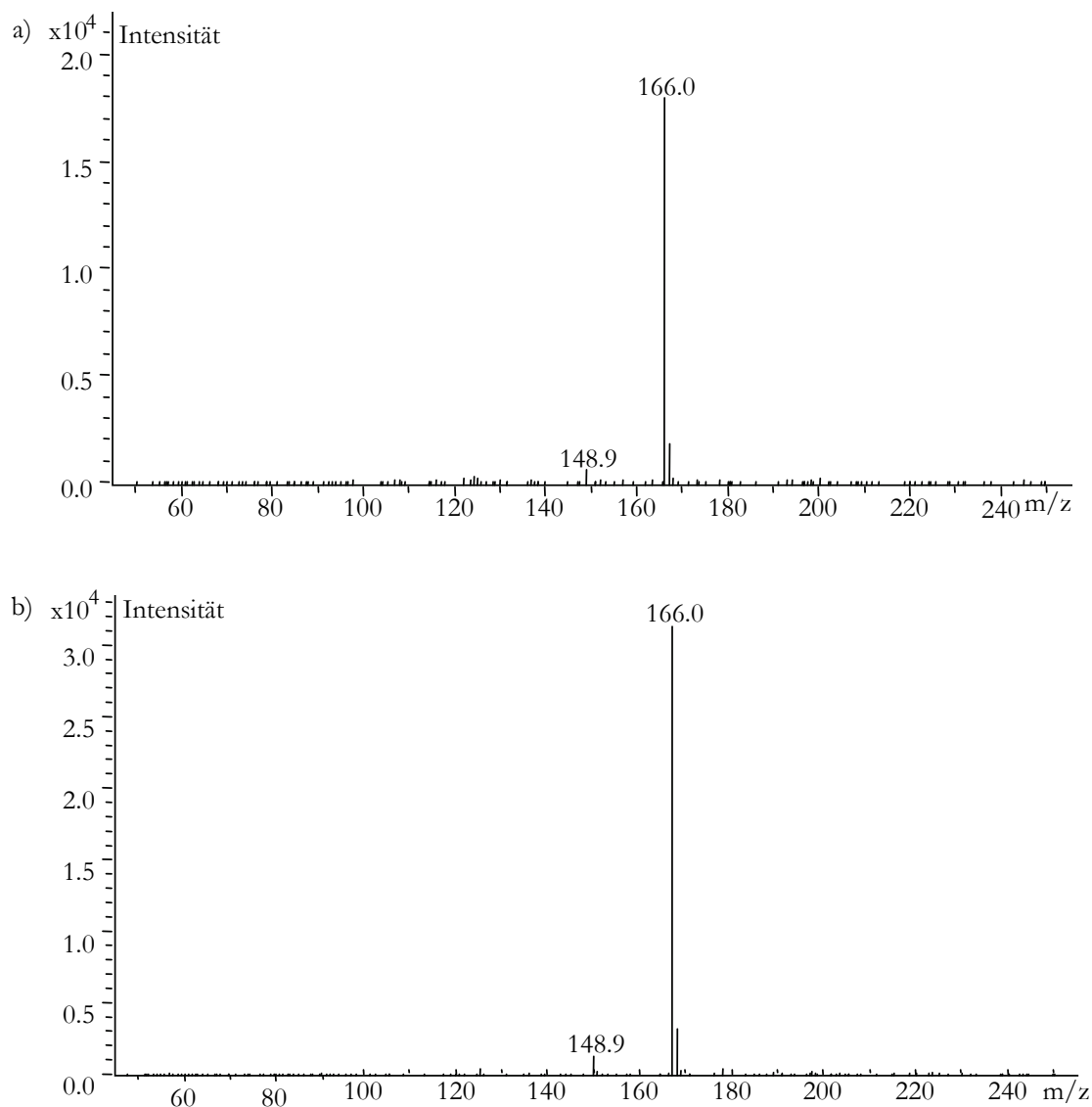


Abb. 2.11 Repräsentative Massenspektren von 4-Methoxyphenylguanidin mit der Retentionszeit $9,2 \pm 0,1$ min: a) *N*-Reduktion von *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin in einer Inkubation mit humanen Lebermikrosomen, b) Standardverbindung

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.3.2.1 beschrieben. Gebildetes 4-Methoxyphenylguanidin wurde mittels der in Kapitel 2.2.3.4 beschriebenen LC/MS-Methode analysiert und gegen einen $10 \mu\text{M}$ synthetischen Standard verglichen.

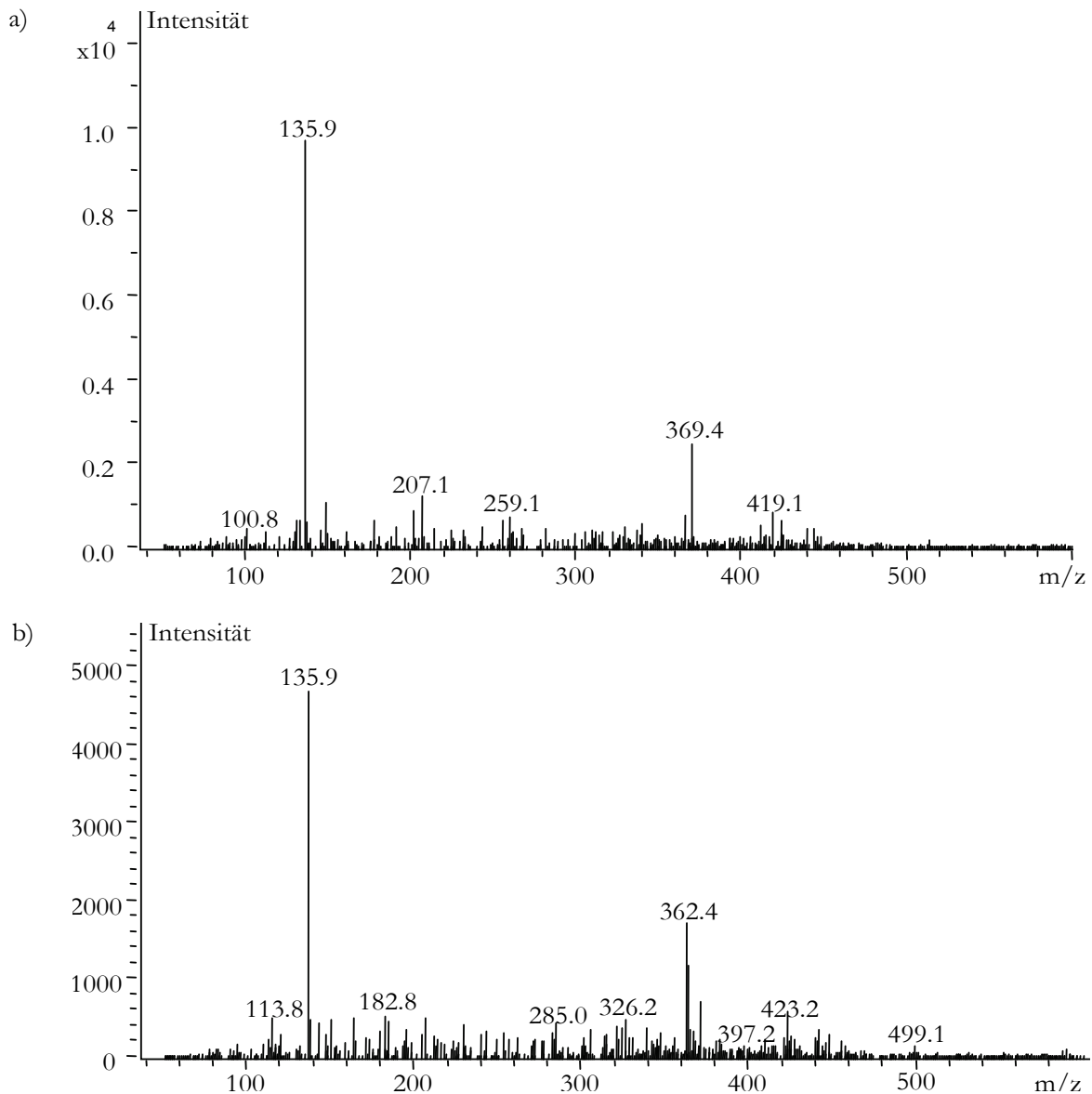


Abb. 2.12 Repräsentative Massenspektren von Phenylguanidin mit der Retentionszeit $9,8 \pm 0,1$ min: a) *N*-Reduktion von *N*-Phenyl-*N'*-hydroxyguanidin in einer Inkubation mit humanen Lebermikrosomen, b) Standardverbindung

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 2.2.3.2.1 beschrieben. Gebildetes Phenylguanidin wurde mittels der in Kapitel 2.2.3.4 beschriebenen LC/MS-Methode analysiert und gegen einen $10 \mu\text{M}$ synthetischen Standard verglichen.

Die nach Inkubation von *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin und *N*-Phenyl-*N'*-hydroxyguanidin mit humanen Lebermikrosomen sowie dem gereinigten mikrosomalen Enzymsystem erhaltenen Metaboliten wurden mittels der in 2.2.3.4 dargestellten LC/MS-Analytiken identifiziert. Es wurden Massenspektren des in der Inkubation gebildeten Guanidins und des synthetischen Standards gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass die Retentionszeiten und die Massenspektren der in den Inkubationen gebildeten Guanidine mit denen der Standards übereinstimmten (Abb. 2.11 und Abb. 2.12).

2.3.5 SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN MIT MIKROSOMEN UNTERSCHIEDLICHER SPEZIES

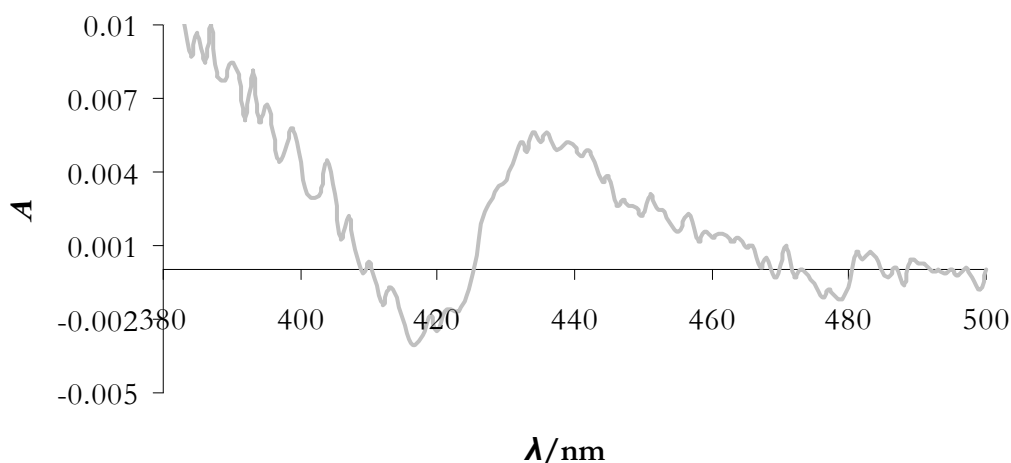


Abb. 2.13 Differenzbindungs-Spektrum nach Zugabe von 4 mM *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin zu einer 1 μM Cytochrom P450-haltigen Verdünnung von Schweine-lebermikrosomen

Die Durchführung für die Aufnahme der Differenzbindungs-Spektren ist in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben.

Um einen Einblick in den Mechanismus der Reaktion zu bekommen, wurden Differenzbindungs-Spektren mit Mikrosomen unterschiedlicher Spezies

aufgenommen. Weil Cytochrom P450-induzierte Rattenlebermikrosomen wie in 2.3.1 dargestellt nur sehr wenig reduktiv, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Enzymquellen aber oxidativ metabolisieren, wurden Unterschiede im Bindungsmodus untersucht.

Die schrittweise Zugabe von *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin zu Schweineleber-mikrosomen führte zu einem Differenzbindungsspektrum, das durch einen Peak bei 441 nm und ein Minimum bei 422 nm charakterisiert war (Abb. 2.13, Tab. 2.4).

Cytochrom P450-induzierte Rattenlebermikrosomen zeigten ebenso wie die gereinigte dritte Komponente des mikrosomalen Enzymsystems Differenzbindungsspektren mit sowohl Absorptionsminima als auch -maxima bei etwas kürzeren Wellenlängen. Diese Absorptionsminima lagen bei 414 – 418 nm, die -maxima bei 432 – 434 nm (Tab. 2.4). Allerdings konnten generell nur sehr geringe Werte für die Absorptionsdifferenz erhalten werden.

Tab. 2.4 Charakteristika der Differenzbindungsspektren von Mikrosomen unterschiedlicher Spezies und der dritten Komponente des gereinigten mikrosomalen Enzymsystems mit *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin

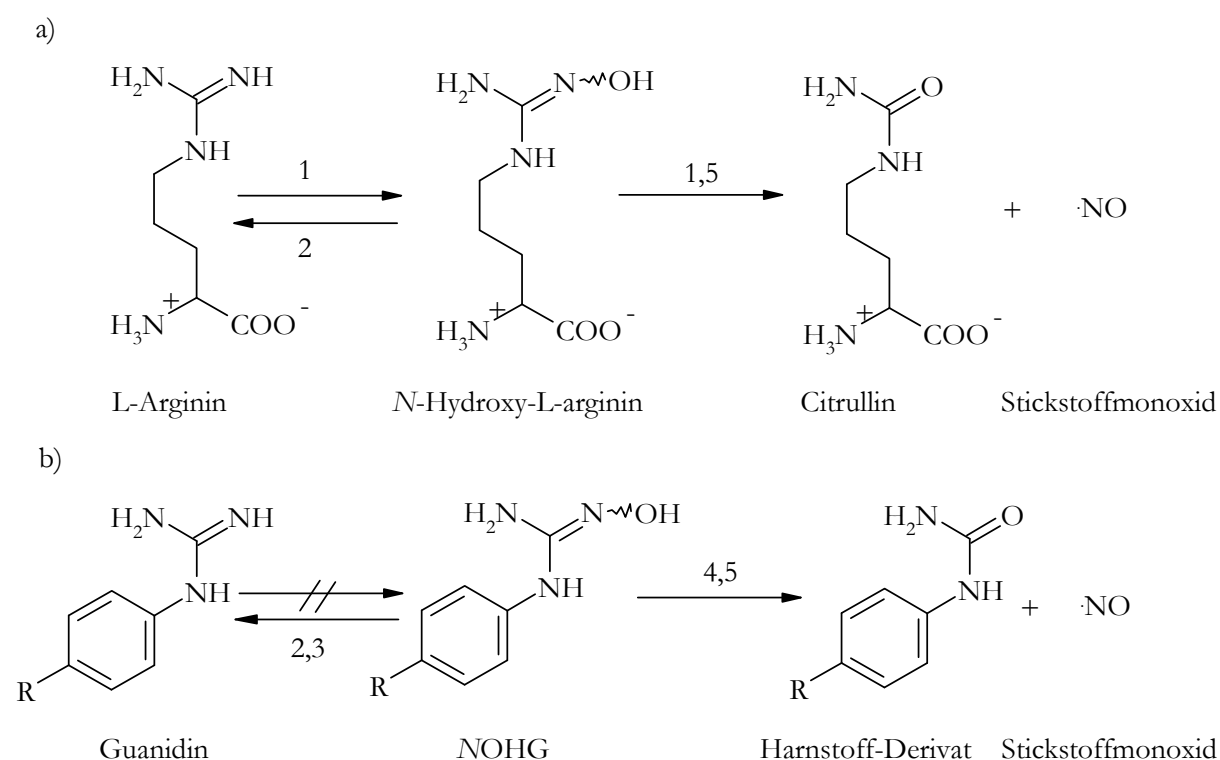
| Ligand | Enzymquelle | λ_{\max} | λ_{\min} | ΔA_{\max} |
|-----------------------|------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | | nm | nm | nmol P450 ml |
| 1a^a | Schweinelebermikrosomen | 441 | 422 | 0,014 |
| | Rattenlebermikrosomen (PB) | 432 | 418 | 0,010 |
| | Rattenlebermikrosomen (Dexa) | 433 | 414 | 0,006 |
| | dritte Komponente | 434 | 418 | 0,004 |

^as. Abb. 2.10

Die Durchführung für die Aufnahme der Differenzbindungsspektren ist in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben. Die maximalen Absorptionsdifferenzen zwischen Minima und Maxima wurden nach Substratsättigung mit 20 mM *N*-4-Methoxyphenyl-*N'*-hydroxyguanidin erhalten.

2.4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der reduktiven Biotransformation von NOHG durch mikrosomale Präparationen. Eine Übersicht über das metabolische Schicksal der NOHG gibt Abb. 2.14.



Katalysierende Enzyme:

- 1 NOS (Cai *et al.*, 2005; Mansuy und Boucher, 2004)
- 2 Lebermikrosomen unterschiedlicher Spezies (diese Arbeit, Clement *et al.*, 2006a)
- 3 Gereinigtes mikrosomales Enzymsystem (diese Arbeit)
- 4 induzierbare NOS (Renodon-Corniere *et al.*, 2002)
- 5 CYP450-induzierte Rattenlebermikrosomen (Jousserandot *et al.*, 1998; Renaud *et al.*, 1993; Mansuy *et al.*, 1995)

Abb. 2.14 *Metabolisches Schicksal von a) physiologischen und b) nicht-physiologischen N-Hydroxyguanidinen*

Da sowohl oxidativer als auch reduktiver Metabolismus der NOHG beschrieben wurde (Jousserandot *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 1993b; Clement, 2002), sollten hier verschiedene Spezies, einschließlich humaner Lebermikrosomen, hinsichtlich ihrer Biotransformation untersucht werden, um die Relevanz der konkurrierenden Biotransformationsreaktionen *in vivo* bewerten zu können.

In dieser Arbeit wurde die *in vitro* Reduktion mehrerer *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine zu ihren korrespondierenden Guanidinen für Mikrosomen von Schwein, Mensch und Ratte gezeigt. Darüber hinaus hat sich die Spezies der Enzymquelle als sehr wichtig für das Ausmaß des reduktiven Metabolismus erwiesen. Zur Interpretation der im Vergleich zu Schweinelebermikrosomen niedrigeren Reduktionsraten von humanen Lebermikrosomen muss berücksichtigt werden, dass diese nicht in einer vergleichbaren Qualität und Quantität gewonnen werden können.

Im Vergleich von Ratten- mit humanen Lebermikrosomen zeigte sich eine ähnliche Benzamidoxim Reduktase Aktivität. Diese sank aber bei Verwendung von Cytochrom P450-induzierten Rattenlebermikrosomen signifikant. Lebermikrosomen von Phenobarbital- und Dexamethason-vorbehandelten Ratten sind demnach als sehr schlechte reduktive Enzymquellen anzusehen. Dies ist besonders erstaunlich, da für das an der mikrosomalen *N*-Reduktion, neben Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase, beteiligte Enzym ein Cytochrom P450 Enzym postuliert wird (Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a).

Da beschrieben wurde, dass das physiologische NOHG, *N*^w-Hydroxy-L-arginin, von Schweinelebermikrosomen zum Arginin reduziert wird, nicht aber von dem gereinigten mikrosomalen Enzymsystem (Clement *et al.*, 2006a), war die mögliche Beteiligung dieses Enzymsystems an der Reduktion der nicht physiologischen *N*^w-Hydroxy-L-arginin-Analoga von besonderem Interesse. Als Ursache dafür, dass das gereinigte Enzymsystem *N*^w-Hydroxy-L-arginin nicht umsetzen konnte, wurde die zwitterionische Aminosäurestruktur angenommen (Clement *et al.*, 2006a), deren Ladung unter physiologischen Bedingungen das Erreichen der aktiven Bindungsstelle des Enzyms behindert. In der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung des gereinigten mikrosomalen Enzymsystems an der Reduktion einer Reihe von NOHG ohne Aminosäurestruktur eindeutig gezeigt werden, was diese Annahme bestätigt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind von großer Bedeutung für die Eignung von *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen als neue potentielle NO-Donoren. Die Reduktion des physiologischen NOHG, *N*^ω-Hydroxy-L-arginin, stellt einen metabolischen Zyklus dar, da der reduzierte Metabolit, das Arginin, selbst ein Substrat für die NOS ist und die Reoxidation zum NOHA den ersten Schritt in der physiologischen Entstehung von NO bedeutet. Nach der Reduktion der nicht-physiologischen NOHG zu den entsprechenden Arylguanidinen kann allerdings keine erneute Oxidation durch die NOS erfolgen (Lefevre-Groboillot *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu sind Alkylguanidine ohne Aminosäurestruktur, ebenso wie ihre korrespondierenden *N*-hydroxylierten Derivate, als Substrate der NOS in der Lage, NO zu generieren (Moreau *et al.*, 2006). Arylguanidine können zwar an der aktiven Bindungsstelle der NOS binden, sind aber nicht zur NO-Bildung imstande. Im Unterschied zu den Alkylguanidinen wird auch kein *N*-hydroxyliertes Intermediat gebildet. Stattdessen kommt es zu vermehrten Entkopplungsreaktionen, die häufig zur Bildung von Wasserstoffperoxid führen (Moreau *et al.*, 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene metabolische Reduktion der *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine stellt demzufolge eine irreversible Inaktivierung dieser neuen potentiellen NO-Donoren dar.

Für die vollständige Reduktase-Aktivität des mikrosomalen Enzymsystems konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass für NOHG anders als bei Oximen (Heberling *et al.*, 2006), aber ähnlich wie bei Amidoximen (Clement *et al.*, 1997), alle drei Komponenten des gereinigten mikrosomalen Enzymsystems von essentieller Bedeutung sind. Die für Amidoxime beschriebene verstärkende Wirkung der dritten Komponente auf die Umsetzung des Zweikomponentensystems aus Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase kann für NOHG bestätigt werden, da in diesem Zweikomponentensystem allein keine Reduktase-Aktivität messbar war.

Die geringe vorhandene Restaktivität des Systems ohne Zusatz von NADH Cytochrom b₅ Reduktase ist durch eine geringfügige Verunreinigung der dritten Komponente mit dieser zu erklären. Ihre Beteiligung an der Reaktion konnte bereits mehrfach zweifelsfrei bewiesen werden (Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005).

Wie auch für Amidoxime beschrieben, erwies sich NADH als der gegenüber NADPH bevorzugte Cofaktor, und der schwach saure pH-Wert von 6,3 gegenüber 7,4 überlegen.

Weitere Struktur-Aktivitätsbeziehungen mit elektronenziehenden und –schiebenden Substitu-enten in *para*-Position zur Oxim-Funktion des reduktiven *N*-Aryl-*N*'-hydroxyguanidin-Metabolismus wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem elektronischen Effekt und der Umsatzungsrate gefunden werden. Weder elektronenziehende noch –schiebende Substituenten haben einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der NOHG-Funktion. Es konnte im Gegenteil gezeigt werden, dass unabhängig von der Substitution in *para*-Position alle untersuchten Substrate sehr effizient reduziert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit mittels differentieller UV/VIS-Spektroskopie erhaltenen Bindungsspektren sind charakteristisch für eine Ligandenbindung am Häm-Eisen (Testa, 1995), was man auch als ein Typ II-Bindungsspektrum bezeichnet. Das Gleichgewicht zwischen Low- und High Spin-Zustand war durch Substratzugabe eindeutig zum Low Spin-Zustand verschoben. Bei den vorliegenden Substraten kam es darüber hinaus zu einer verhältnismäßig großen Rotverschiebung, was charakteristisch für ein stark koordinierendes Substrat ist, wobei jedoch die zwischen Minimum und Maximum gemessene Absorptionsdifferenz nur sehr schwach war. Die Differenzbindungsspektren mit Absorptionsmaxima größer als 430 nm sind für NOHG mit der NOS (Lefevre-Groboillot *et al.*, 2003) und dem Häm-Modell Microperoxidase 8 (Lombardi *et al.*, 2001) bereits beschrieben (Lefevre-Groboillot *et al.*, 2001) und als Typ II'-Bindungsspektren bezeichnet worden. Mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie ist auch die Struktur des Komplexes aufgeklärt worden. Die Bindung zwischen dem Häm-Eisen und dem Sauerstoff der Oxim-Funktion der NOHG erfolgt nach Deprotonierung oder Abschwächung der O-H Bindung (Lefevre-Groboillot *et al.*, 2001; Abb. 2.15).

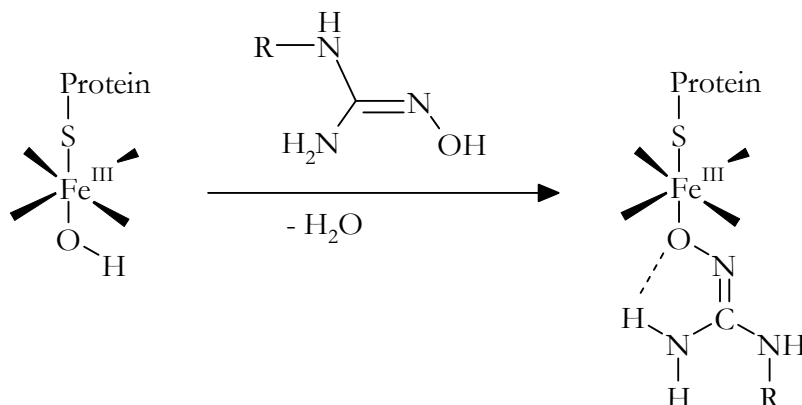


Abb. 2.15 Typ II'-Substratbindung der NOHG an das Häm-Eisen der NOS, Microperoxidase 8 sowie Cytochrom P450 Enzymen in mikrosomalen Präparationen und dem N-reduktiven mikrosomalen Enzymsystem

Entgegen den Erwartungen aus den Erkenntnissen zum unterschiedlichen metabolischen Verhalten der einzelnen Mikrosomenspezies konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in den Substratbindungsspektren gefunden werden. Ein ähnliches Phänomen ist bereits für die Wechselwirkung von Arylguanidinen mit der iNOS beschrieben worden, bei der eine Substratbindung gefunden wurde, die aber nicht mit der Fähigkeit zur Produktion von NO korrelierbar war (Lefevre-Groboillot *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2006).

Auch ließen sich mit der Microperoxidase 8 spektrale Dissoziationskonstanten für NOHG ermitteln, die eine Aussage über die Affinität der Liganden zum Häm-Eisen ermöglichen (Lefevre-Groboillot *et al.*, 2001). Diese ließen sich darüber hinaus mit dem elektronischen Effekt des Substituenten in *para*-Position über seine Hammett-Konstante korrelieren (Wolf, 2003).

Der elektronische Effekt besitzt jedoch wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben keinen signifikanten Effekt auf die Reduktionsraten.

Eine Ursache für den fehlenden Zusammenhang zwischen spektralen Wechselwirkungen und Biotransformationsverhalten könnte darin begründet sein, dass das Hämprotein für die Reduktion nicht verantwortlich ist. Die Frage nach der Beteiligung hämhaltiger Proteine an der mikrosomalen Reduktion stickstoffhaltiger Verbindungen soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden (Kapitel 3).

Während die Identität der mikrosomalen dritten Komponente bislang weiterhin ungeklärt ist, wurde kürzlich eine mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC, *mitochondrial Amidoxime Reducing Compound*) gefunden, die als ein 35 kDA Molybdoprotein identifiziert wurde (Havemeyer *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse über den reduktiven Metabolismus der NOHG, die in der vorliegenden Arbeit erhalten wurden, limitieren, wie bereits diskutiert, die Einsetzbarkeit der *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine als neue potentielle NO-Donoren erheblich. Andererseits können sie jedoch als ein hochwirksames Prodrug-Prinzip für stark basische funktionelle Gruppen angesehen werden, welches eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit einer Vielzahl von Arzneistoffen mit Guanidinfunktionen ermöglicht.

Das zytotoxische Potential der NOHG könnte jedoch ihren Einsatz als Arzneistoffe limitieren. Hier müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass die metabolische Reduktion eine ausreichende Detoxifizierungsreaktion darstellt.

2.5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte eine effiziente Reduktion einer Reihe von *para*-substituierten *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen durch mikrosomale Enzympräparationen unterschiedlicher Spezies gezeigt werden. Die für die Reduktion von Amidoximen verantwortlichen Enzyme zeigen sich ebenfalls an der Reduktion von *N*-Hydroxyguanidinen beteiligt. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und eine bislang nicht identifizierte mikrosomale *N*-reduktive Komponente, für die ein Cytochrom P450 Enzym postuliert wird. Im Gegensatz dazu wird *N*^w-Hydroxy-L-arginin zwar durch mikrosomale Präparationen, nicht aber das gereinigte mikrosomale Enzymsystem, reduziert.

Eine Induktion von Cytochrom P450 Enzymen in Mikrosomen von Phenobarbital- oder Dexamethason-vorbehandelten Ratten führt zu einer signifikanten Erniedrigung der Reduktionsraten und nicht zu der erwarteten

Erhöhung. Dies stellt einen Hinweis dafür dar, dass es sich bei der mikrosomalen dritten Komponente nicht um ein Cytochrom P450 Enzym handelt oder aber die Expression des verantwortlichen Isoenzym nicht induziert sondern unterdrückt wurde.

Darüber hinaus lassen sich Hämprotein-Substratbindungsspektren der einzelnen Mikrosomenspezies mit *N*-Hydroxyguanidinen nicht mit deren unterschiedlichen Biotransformationsverhalten korrelieren.

Die Ergebnisse über den reduktiven Metabolismus der *N*-Hydroxyguanidine limitieren die Einsetzbarkeit der *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine als neue potentielle NO-Donoren erheblich. Andererseits stellen sie ein hochwirksames Prodrug Prinzip für stark basische funktionelle Gruppen dar, welches eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit einer Vielzahl von Arzneistoffen mit Guanidinfunktionen ermöglicht.

Das zytotoxische Potential der *N*-Hydroxyguanidine könnte ihren Einsatz als Arzneistoffe limitieren. Hier müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass die metabolische Reduktion eine ausreichende Detoxifizierungsreaktion darstellt.

3 TESTUNG VON GEREINIGTEN UND REKOMBINANTEN ENZYMEN UND DEM HÄM-MODELL MICROPEROXIDASE 8 AUF BENZAMIDOXIM REDUKTASE AKTIVITÄT

3.1 EINFÜHRUNG

Wie zuvor erläutert, sind die mikrosomalen, an der Reduktion basischer *N*-hydroxylierter Verbindungen beteiligten Enzyme noch nicht vollständig identifiziert (Kapitel 1, Kapitel 2.4). Während Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase als für die Katalyse notwendige Proteine vielfach beschrieben wurden (Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1997; Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005), bleibt die Identität und Funktion einer an der Reduktion beteiligten dritten Komponente umstritten. Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben jedoch aus Mikrosomen isolierte Proteine, deren Zusatz die allein durch Cytochrom b_5 und seine Reduktase erzielten Umsetzungsraten um ein Vielfaches steigern konnte (Clement *et al.*, 2005a; Andersson *et al.*, 2005).

Aufgrund möglicher Neben- und Wechselwirkungen, die aus der Beteiligung von z. B. arzneistoffmetabolisierenden Enzymen resultieren, ist die Identifizierung der dritten Komponente des mikrosomalen *N*-reduktiven Enzymsystems aber von großer Bedeutung. Für die nachfolgend vorgestellten Proteine wird eine Beteiligung am mikrosomalen Enzymsystem diskutiert.

3.1.1 FREMDSTOFFMETABOLISIERENDE ENZYME

Ein Überblick über die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme findet sich in Kapitel 1.1.3.

3.1.1.1 Cytochrom P450 Isoenzyme 2A6 und 3A4 (CYP2A6 und CYP3A4)

Bei den Cytochrom P450 Isoenzymen 2A6 und 3A4 (EC 1.14.14.1) handelt es sich um zwei in humaner Leber vorkommende membranständige Enzyme, die für den Phase I Fremdstoffmetabolismus von großer Bedeutung sind (s. auch Kapitel 1.1.3).

Der CYP2A6-Gehalt in humaner Leber ist mit etwa 4 % im Vergleich zu anderen Cytochrom P450 Enzymen des Fremdstoffwechsels eher gering (Ortiz de Montellano, 1995). Allerdings kommt es unter anderem durch genetische Polymorphismen zu großen interindividuellen Schwankungen des CYP2A6-Levels (Kitagawa *et al.*, 2001). Dieses wirkt sich in veränderter Enzymaktivität aus. Während es in der asiatischen Bevölkerung eine Anhäufung von Individuen mit verminderter Enzymaktivität („poor metabolizer“) gibt, tritt dieser genetische Polymorphismus bei Europäern nur selten auf (Oscarson, 2001). Der stark schwankende CYP2A6-Gehalt kann jedoch auch durch Umweltfaktoren oder Lebererkrankungen beeinflusst sein (Niemela *et al.*, 2000). CYP2A6 ist das wichtigste Enzym des Nikotin-Stoffwechsels, welches für die Nikotin-Clearance verantwortlich ist. Personen mit einem CYP2A6-Gendefekt besitzen wahrscheinlich ein niedrigeres Lungenkrebsrisiko. Die Gründe hierfür liegen wohl im verzögerten Abbau und der damit einhergehenden längeren Nikotin-Wirkung, wodurch diese Personen weniger rauchen (Sellers *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von CYP2A6 an der Aktivierung von Prokarzinogenen wie Nitrosaminen diskutiert (Kushida *et al.*, 2000). Zu den Arzneistoffen, die durch CYP2A6 metabolisiert werden, zählen unter anderem das Analgetikum und Antipyretikum Paracetamol (Chen *et al.*, 1998) und das Antiepileptikum Valproat (Sadeque *et al.*, 1997).

Auch die 7-Hydroxylierung von Cumarin (Abb. 3.1) wird überwiegend durch dieses Isoenzym katalysiert, wodurch diese Reaktion zur Bestimmung der Markerenzymaktivität für CYP2A6 verwendet werden kann (Greenlee und Poland, 1978). Sie wird auch von der EMEA für das *in vitro*-Interaktionsscreening empfohlen (CPMP, 1997).

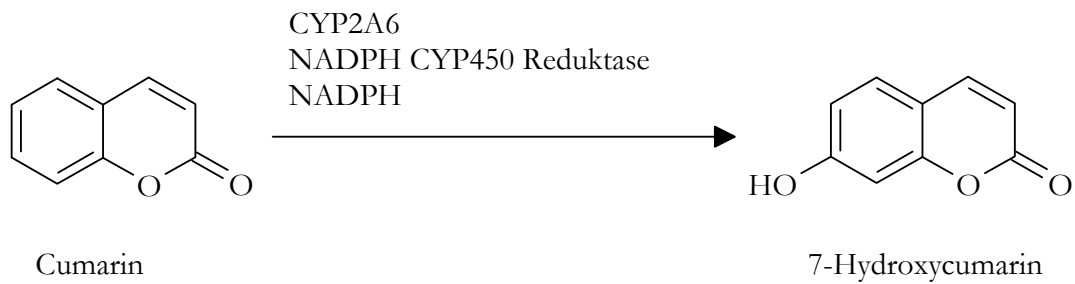


Abb. 3.1 Bestimmung der Markerenzymaktivität von CYP2A6: Coumarin-7-Hydroxylierung.

CYP3A4 ist das in humaner Leber und Dünndarm am häufigsten vorkommende Cytochrom P450 Enzym und am Metabolismus von der Hälfte aller auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe beteiligt (Guengerich, 1999). Aus der Induktion bzw. Inhibition dieses Cytochrom P450 Isoenzym bei gleichzeitiger Gabe mehrerer Arzneistoffe resultiert auch das immense Interaktionspotential, das bei sämtlichen Arznei- und anderen Fremdstoffen, die zu einem hohen Prozentsatz über dieses Isoenzym abgebaut werden, klinisch relevant ist. So führt selbst Grapefruitsaft über eine Hemmung von CYP3A4 zu einer Erhöhung von Plasmaspiegeln verabreichter Arzneistoffe, die über CYP3A4 metabolisiert werden. Beispiele hierfür sind der Calcium-Antagonist Nifedipin und das Immunsuppressivum Ciclosporin A. Die von der EMEA für dieses Isoenzym empfohlene Markerreaktion ist die 6- β -Hydroxylierung von Testosteron (CPMP, 1997; Abb. 3.2).

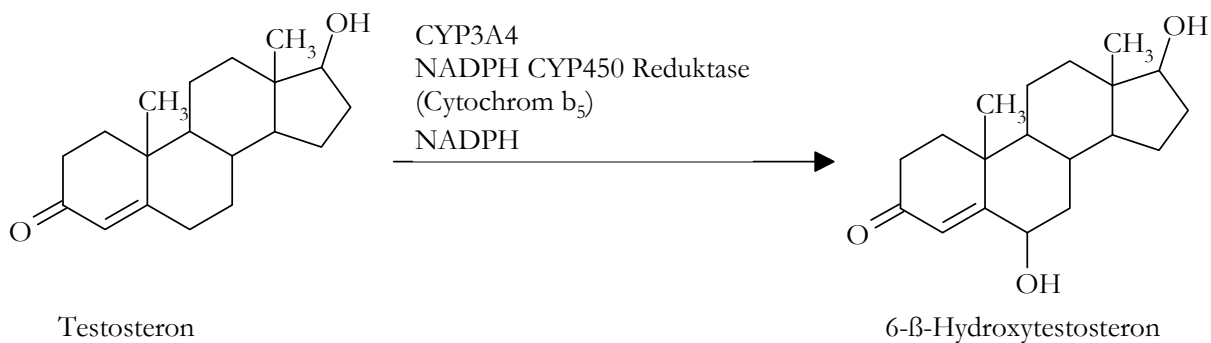


Abb. 3.2 Bestimmung der Markerenzymaktivität von CYP3A4: Testosteron-6- β -Hydroxylierung.

3.1.1.2 Flavinhaltige Monooxygenase 3 (FMO3)

Ebenfalls zu den Phase I fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zählt die FMO (EC 1.14.13.8). Hierbei handelt es sich um ein Protein mit Flavin als funktioneller Gruppe (Ziegler, 2002), welches wie die Cytochrom P450 Enzyme membranständig ist und Sauerstoff und NADPH als Cofaktoren benötigt. Im Unterschied zu CYP450 wird aber keine Reduktase benötigt, um eine Monooxygenasereaktion zu katalysieren (Krueger und Williams, 2005). Die FMO oxygeniert Arznei- und andere Fremdstoffe, die weiche Nukleophile enthalten und häufig stickstoff- oder schwefelhaltig sind. In der Regel kommt es bei dieser Reaktion zur Bildung von Metaboliten, die weniger pharmakologisch oder toxikologisch aktiv sind.

Bei der FMO3 handelt es sich um die in der adulten humanen Leber vorkommende Isoform, deren Gendefekt zur Stoffwechselkrankheit Trimethylaminurie („fish odour syndrome“) führt (Lang *et al.*, 1998). Erkrankte Personen riechen nach nicht mehr ganz frischem Fisch, da die *N*-Oxygenierung von fischartig riechendem Trimethylamin zu geruchlosem Trimethylamin-*N*-Oxid exklusiv über FMO3 katalysiert wird (Lang *et al.*, 1998).

3.1.1.3 NAD(P)H Chinonoxidoreduktase 1 (DT Diaphorase, DTD)

Die DTD (EC 1.6.99.2) ist im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Enzymen kein membranständiges Protein, sondern cytosolisch lokalisiert (Eliasson *et al.*, 1999). Sie schützt Zellen vor karzinogenen Effekten durch Chinone und andere Elektrophile. Es handelt es sich dabei, wie bei der FMO3, um ein Flavinenzym, welches die simultane Zwei-Elektronen-Reduktion von Chinonen zu Hydrochinonen katalysiert (Iyanagi und Yamazaki, 1970). Würde zunächst nur ein Elektron auf das Chinon übertragen, käme es zur Bildung von instabilen Semichinonradikalen, die reaktive Sauerstoffspezies generieren können. Die simultane Übertragung von zwei Elektronen führt hingegen zu stabilen Hydrochinonen (Abb. 3.3). Die DTD ist an der Entgiftung mit der Nahrung zugeführter Chinone ebenso beteiligt wie an der bioreduktiven Aktivierung zytostatischer Chinone (Faig *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1992). Durch ihre

Überexprimierung in Tumorzellen wird über die Bioaktivierung eine selektive Toxizität der applizierten zytotoxischen Chinone gegenüber normalen Zellen erreicht (Hassani *et al.*, 2005).

Ferner ist die DTD am Vitamin K-Metabolismus (Abb. 3.3) und somit an der Blutgerinnung beteiligt, da Menadion (Vitamin K3) ein sehr gutes Substrat für die DTD ist (Ma *et al.*, 1990).

Unter aeroben Bedingungen reduziert sie *N*-haltige Verbindungen, wie aromatische Nitro- und Nitrosoverbindungen sowie bestimmte Azofarbstoffe (Hajos und Winston, 1992; Horie, 1990; Mc Lane *et al.*, 1983).

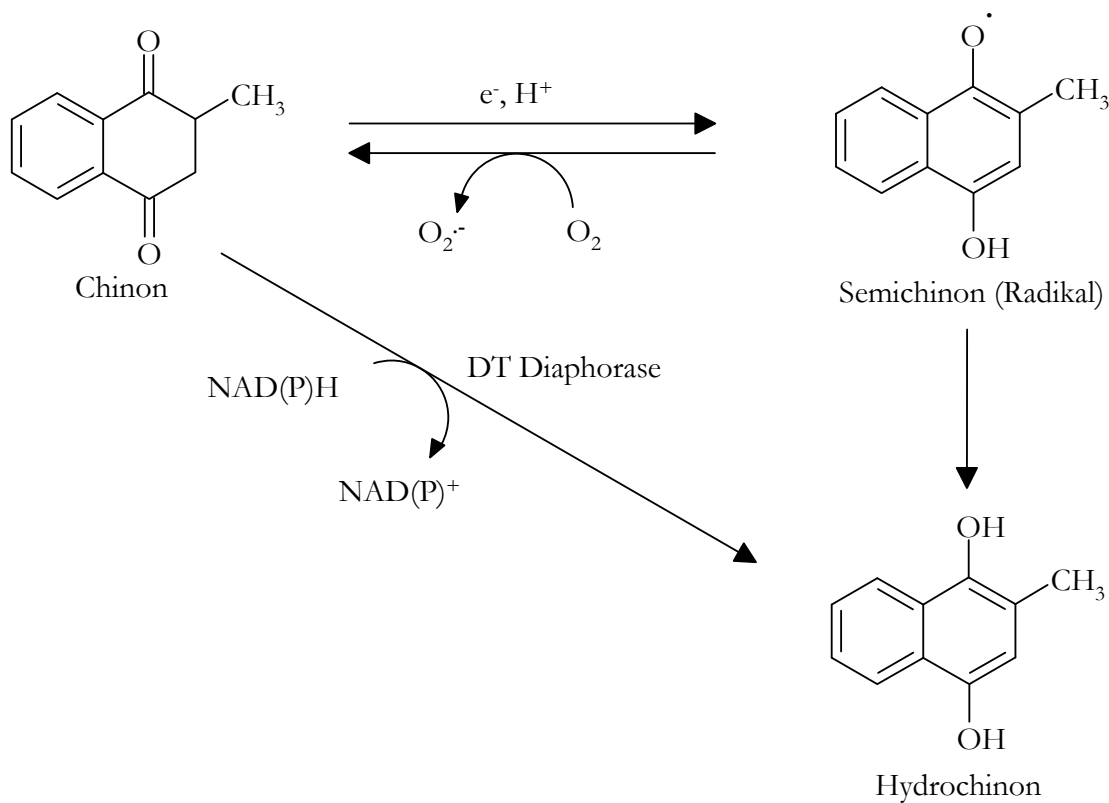


Abb. 3.3 Vergleich der Reduktion von Menadion durch sukzessive und simultane Elektronenübertragung, letztere vermittelt durch die DT Diaphorase (DTD)

3.1.1.4 Ω -Gluthathion-S-Transferase (Ω GST)

Gluthathion-S-Transferasen (EC 2.5.1.18, GST) sind als Enzyme des Phase II Metabolismus an der zellulären Detoxifizierung einer Vielzahl von Xenobiotika sowie reaktiver endogener Verbindungen des oxidativen Stoffwechsels beteiligt. Sie katalysieren den nukleophilen Angriff von reduziertem Gluthathion an unpolaren Verbindungen, die elektrophile Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatome besitzen (Hayes *et al.*, 2005).

Alle Eukaryoten besitzen mehrere cytosolische und membrangebundene GST-Isoenzyme (Hayes *et al.*, 2005). Es gibt Anzeichen dafür, dass das Expressionslevel von GST ein ausschlaggebender Faktor für die Sensitivität von Zellen gegenüber einem breiten Spektrum von toxischen Verbindungen, wie chemischen Karzinogenen, Arzneistoffen und Produkten von oxidativem Stress ist (Board *et al.*, 2000).

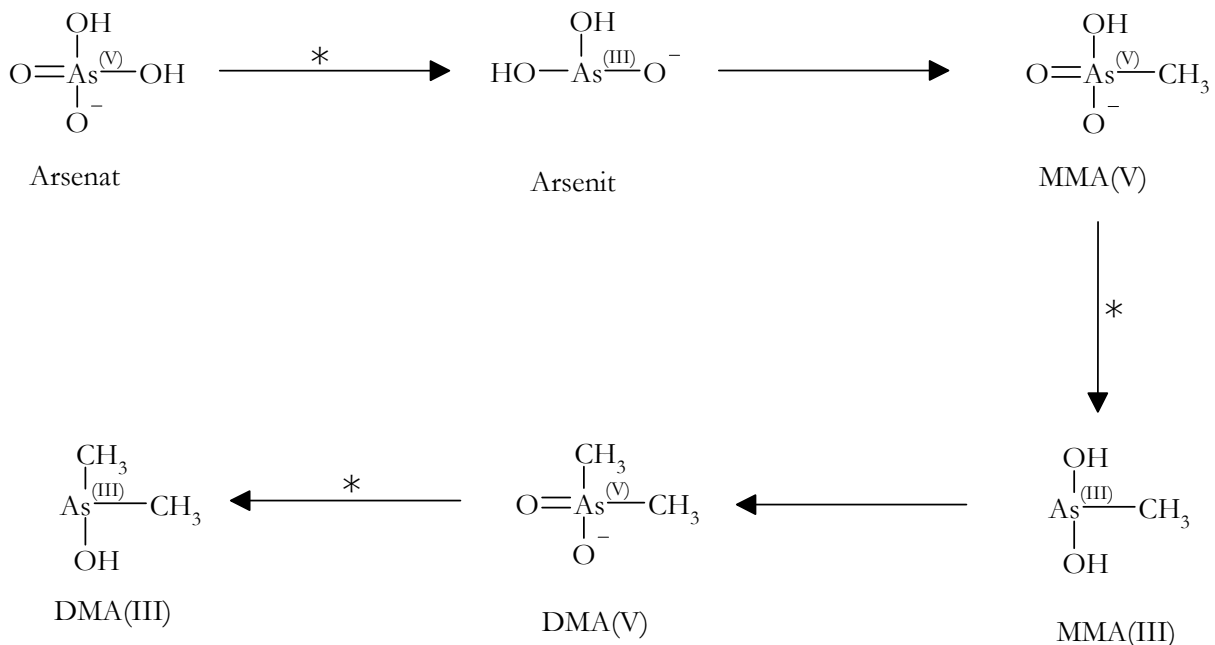


Abb. 3.4 Biotransformation anorganischer Arsenverbindungen (MMA(V) = Monomethylarsenat, MMA(III) = Monomethylarsenit, DMA(V) = Di-methylarsenat, DMA(III)=Dimethylarsenit, * = Reaktion katalysiert durch Ω -Gluthathion-S-Transferase)

Eine kürzlich neu entdeckte Familie dieser GSTs ist die Ω GST mit veränderten strukturellen und funktionellen Eigenschaften (Board *et al.*, 2000). Diese katalysieren keine klassischen Phase II-Gluthathion-Kopplungen, sondern Reduktionen (Board *et al.*, 2000).

Aposhian *et al.* (2004) fanden, dass Ω GST mit einem Protein identisch ist, welches bisher als Monomethylarsenat Reduktase bezeichnet wurde und die Reduktion von Arsenat (+V), Monomethylarsenat und Dimethylarsenat katalysiert (Abb. 3.4).

Die Reduktion dieser anorganischen Arsenverbindungen zu den entsprechenden Arseniten (+III), die toxischer sind als ihre entsprechenden fünfwertigen Ausgangsprodukte, ist der erste Schritt einer Bioaktivierung zu einem Karzinogen (Aposhian *et al.*, 2004; Zakharyan *et al.*, 2005).

3.1.2 MICROPEROXIDASE 8 (MP8)

Bei MP8 handelt es sich um ein Häm-Modell. Häm-Modelle imitieren die prosthetische Gruppe hämhaltiger Proteine und finden deshalb breite Anwendung zur Untersuchung von Substratbindungen an solche Proteine. Vorteilhaft ist, dass sie wasserlösliche, monomere Porphyrine sind (Lombardi *et al.*, 2001). Die MP8 ist ein Häm-Oktapeptid (Abb. 3.5), welches aus Cytochrom c aus Pferdeherz gewonnen wird. Nach tryptischem Verdau bleiben noch die Aminosäuren 14 bis 21 übrig (Aron *et al.*, 1986).

MP8 besitzt ein einzeln koordinativ gebundenes Imidazol des Histidins als axialen Liganden. Die sechste Koordinationsstelle ist entweder frei oder durch einen einfach auszutauschenden Liganden wie Wasser besetzt.

Im Unterschied zu den Hämthiolatproteinen Cytochrom P450 oder NOS handelt es sich bei der MP8 um ein Häm-Histidin-Peptid, welches Peroxidase-Aktivität besitzt und insbesondere Cytochrom P450 vermittelte Oxidationen imitieren kann (Lombardi *et al.*, 2001).

Microperoxidasen neigen in wässriger Lösung zur Aggregation. Monomere Lösungen können in hohen Verdünnungen, durch Zusatz von Detergentien oder Lösungsmitteln erreicht werden. Daher arbeitet man häufig in wässrig-methanolischen Lösungen (Lombardi *et al.*, 2001).

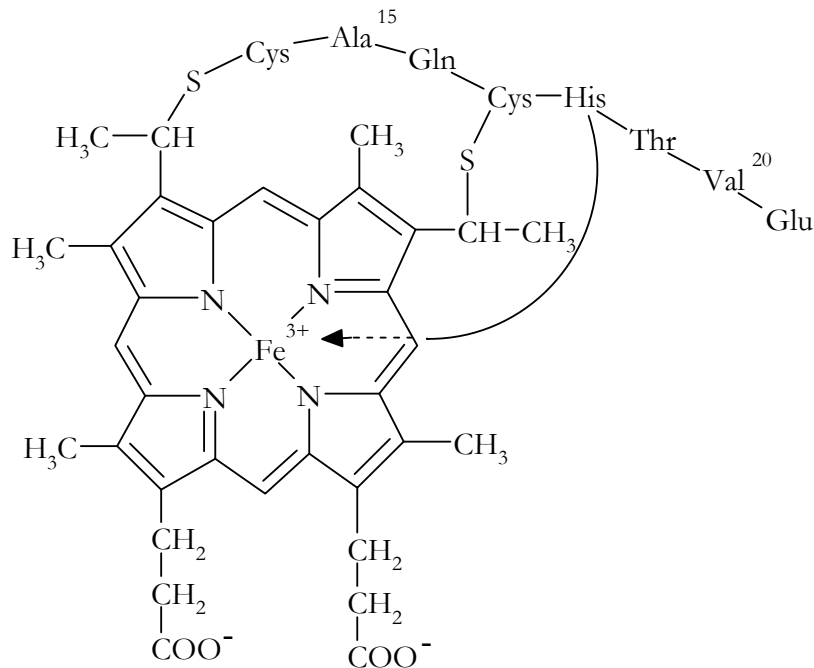


Abb. 3.5 *Microperoxidase 8 (MP8)*. Die *Bezifferung der Aminosäuren ist analog zu Cytochrom c*.

3.1.3 REKONSTITUTION VON MEMBRANSTÄNDIGEN ENZYMEN

Ein isoliertes Membranprotein zu rekonstituieren bedeutet, ein Protein funktionsfähig in eine Lipidmembran einzubauen, mit dem Ziel alle Funktionen und Eigenschaften des Proteins wiederherzustellen. Dies ist insbesondere bei größeren Proteinen mit ihrer Vielzahl von Ligandenbindungsstellen und Regulationsmöglichkeiten eine ehrgeizige Aufgabe. Die meisten Rezeptoren, Ionenkanäle und Transporter befinden sich in Phospholipidmembranen, weshalb häufig Phospholipide, z. B. Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC), für die Rekonstitution verwendet werden.

Insbesondere für CYP3A4 ist der Rekonstitutionsvorgang kompliziert (Yamazaki und Shimada, 2006; Guengerich, 1999). Der Grund hierfür liegt in der für einige, aber nicht alle, katalytischen Aktivitäten erforderlichen Anwesenheit von Cytochrom b_5 (Kumar *et al.*, 2005) und komplexen Phospholipidmischungen. Von letzterer werden insbesondere solche mit saurer Komponente wie Phosphatidylserin (PS, Imaoka *et al.*, 1992) in Kombination mit ionischen

Detergentien, in der Regel 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS, Shaw *et al.*, 1997) benötigt. Auch Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren (Dioleoylphosphatidylcholin, DOPC) können für bestimmte Reaktionen notwendig sein (Eberhart und Parkinson, 1991). Zweiwertige Metallionen oder Gluthathion, jedoch nicht in Kombination, sollen die CYP3A4-Aktivität fördern (Yamazaki *et al.*, 1995).

Um eine Rekonstitution zu erleichtern, verwendet man häufig heterolog exprimierte CYPs. Diese enthalten in unterschiedlichem Ausmaß neben Cytochrom P450 insbesondere NADPH Cytochrom P450 Reduktase und manchmal auch Cytochrom b₅ (Guengerich, 1999; Crespi und Miller, 1999).

Im Hinblick auf die zu katalysierende Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen, die ohne Beteiligung der NADPH Cytochrom P450 Reduktase abläuft, wird deren Anwesenheit nach Coexpression als mögliche Ursache für fehlende Enzymaktivität angesehen (Matschke, 2004).

3.1.4 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DER MIKROSOMALEN *N*-REDUKTIVEN KOMPONENTE

Die mikrosomale Benzamidoxim Reduktion wurde im Laufe des letzten Jahrzehnts vielfach diskutiert und viele Hinweise auf die Identität der, neben Cytochrom b₅ und seiner Reduktase, beteiligten dritten Komponente gefunden (Clement *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2005a).

Die nach Clement *et al.* (1997) gereinigte dritte Komponente zeigt eine Absorption bei 417 nm, was auf die Anwesenheit eines Hämproteins schließen lässt. Nach Reduktion weist sie ein Kohlenmonoxid-Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 450 nm auf. Dies lässt eine Beteiligung eines Cytochrom P450 Enzymsystems an der Benzamidoxim Reduktion vermuten (Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a). Wiederholte Analysen der durch SDS-PAGE erhaltenen Proteinbanden mittels Massenspektrometrie oder Aminosäuresequenzanalyse lieferten die in Tab. 3.1 aufgeführten Proteine.

Tab. 3.1 Proteine, die nach massenspektrometrischer- oder Aminosäuresequenzanalyse in der mikrosomalen dritten Komponente gefunden wurden

| Spezies ^a | Protein | Literatur |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Schwein | CYP2D | Clement <i>et al.</i> , 1997 |
| | CYP2D6 | Clement <i>et al.</i> , 1997 |
| | CYP2D25 | Clement <i>et al.</i> , 2005a |
| | CYP1A | Clement <i>et al.</i> , 1997 |
| | CYP2A | Clement <i>et al.</i> , 1997 |
| | CYP2J | Clement <i>et al.</i> , 1997 |
| | CYP3A | Clement <i>et al.</i> , 1997 |
| | CYP2E1 | Clement <i>et al.</i> , 2005a |
| | FMO3 | Clement <i>et al.</i> , 2005a |
| | Succinyl-CoA-Ligase | Clement <i>et al.</i> , 2005a |
| | UDP-Glucuronosyltransferase | Matschke, 2004 |
| 6-Phosphofruktokinase | Matschke, 2004 | |
| Mensch | CYP2A6 | Karhan, 2002 |
| | Arylacetamid-Deacetylase | Karhan, 2002 |
| | CYP2C19 | Karhan, 2002 |

^aSpezies, aus der die mikrosomale *N*-reduktive Komponente nach dem Verfahren von Clement *et al.* (1997) isoliert wurde.

Die endgültige Identifizierung steht jedoch im Gegensatz zur mitochondrialen Benzamidoxim reduzierenden Komponente (mARC; Havemeyer, 2006) bis heute aus. Für ein zur mARC homologes rekombinantes Protein konnte eine erfolgreiche

Rekonstitution der Benzamidoxim Reduktase Aktivität gezeigt werden (Havemeyer *et al.*, 2006).

Tab. 3.2 Übersicht über die bisherigen, nicht erfolgreich getesteten rekombinanten Proteine auf Benzamidoxim Reduktase Aktivität

| Enzym | Spezies | Expressionssystem | Literatur |
|--------------------------------|---------|-------------------|--------------------------|
| CYP1A2 OR | Human | Insektenzellen | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP2A6 OR | Human | Insektenzellen | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP2C8 OR | Human | Insektenzellen | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP2C9 OR | Human | Insektenzellen | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP2C19 OR | Human | Insektenzellen | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP2C19 | Human | E. Coli | Karhan, 2002 |
| CYP2D6 OR | Human | Insektenzellen | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP3A4 OR | Human | Insektenzellen | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP3A4 | Human | E. Coli | Clement und Lopian, 2003 |
| CYP2A6 OR | Human | Hefezellen | Karhan, 2002 |
| CYP2A6 pur. | Human | Hefezellen | Karhan, 2002 |
| CYP2D25 OR | Porcin | Insektenzellen | Matschke, 2004 |
| CYP2D25 | Porcin | Insektenzellen | Matschke, 2004 |
| CYP2D25 | Porcin | Hefezellen | Matschke, 2004 |
| UDP Glucuronosyltransferase | Human | Insektenzellen | Karhan, 2002 |

OR = heterolog exprimierte CYPs, mit coexprimierter NADPH Cytochrom P450 Reduktase

Unter den in der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente nachgewiesenen Proteinen konnte jedoch kein rekombinantes Protein gefunden werden, welches in der Lage war Benzamidoxim unter aeroben Bedingungen zu reduzieren. Einen Überblick über die bislang bereits getesteten rekombinanten Enzyme gibt Tab. 3.2.

3.1.5 THEMA UND ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist, zu klären, ob die eingangs genannten Proteine an der mikrosomalen Reduktion stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen beteiligt sind. Nachfolgend wird kurz erläutert, warum die einzelnen Proteine getestet wurden.

- CYP2A6 ist nach Isolation der *N*-reduktiven Fraktion aus humanen Lebermikrosomen im SDS-Gel massenspektrometrisch nachgewiesen worden. Eine unabhängige Reinigung von CYP2A6 nach literaturbekannter Vorschrift (Yun *et al.*, 1991) lieferte ein Protein, das *N*-reduktive Eigenschaften zeigte (Karhan, 2002; Lopian, 2002).
- CYP3A wurde in der aus Schweinelebermikrosomen isolierten Proteinfraction gefunden (Clement *et al.*, 1997). CYP3A4 ist das aus der CYP3A-Familie in humaner Leber am häufigsten vorkommende Isoenzym (Guengerich, 2001).
- FMO3 wurde ebenfalls in der aus Schweineleber isolierten Proteinfraction gefunden (Clement *et al.*, 2005a).
- DTD katalysiert Reduktionen stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen (Mc Lane, 1983; Hajos und Winston, 1992; Hassani *et al.*, 2005).
- Weil Arsen ein Element der 5. Hauptgruppe ist, kann man die entsprechenden Stickstoff-Verbindungen als analog zu den hydroxylierten Arsen-Verbindungen, die durch Ω GST reduziert werden, betrachten (Zakharyan *et al.*, 2005; s. Abb. 3.4).
- Die Untersuchungen mit dem Häm-Modell MP8 sollen Aufschluss darüber geben, ob Hämproteine generell an der mikrosomalen Reduktion

stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen beteiligt sind und welchen Einfluss die Apoproteine der an der Reaktion beteiligten Enzyme haben.

Die bislang getesteten rekombinanten Präparationen von CYP2A6 wiesen keine Benzamidoxim Reduktase Aktivität auf (Karhan, 2002; Clement und Lopian, 2003). Als mögliche Ursache hierfür sollte in dieser Arbeit das Vorhandensein hemmender Bestandteile in rekombinanten Systemen ebenso ausgeschlossen werden wie ein eventuell verändertes Verhalten rekombinant exprimierter Enzyme. Daher sollte kommerziell erworbenes, aus humaner Leber gereinigtes Cytochrom P450 2A6 auf seine Fähigkeit, Benzamidoxim zu reduzieren, untersucht werden. Die gleiche Idee stand hinter der Testung des gereinigten humanen Cytochrom P450 3A4. Erschwerend hierbei ist die komplizierte Rekonstitution dieses Isoenzym (Yamazaki und Shimada, 2006; Guengerich, 1999; Gonzalez und Korzekwa, 1995), die auch möglicherweise für die bisherigen fehlgeschlagenen Versuche verantwortlich ist, die Benzamidoxim Reduktase Aktivität zu rekonstituieren. Nicht zuletzt hat auch die Art des Expressionssystems Auswirkungen auf die Enzymaktivität, was unter anderem auf die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Wirtsmembranen zurückgeführt wird (Zhang *et al.*, 2004). Folgerichtig sollte ein besonderes Augenmerk auf die Charakterisierung der rekombinanten und gereinigten humanen Präparationen gelegt werden. Hierzu sollte anhand einer Enzym-Markerreaktion sichergestellt werden, dass eine erfolgreiche Rekonstitution mit den Coenzymen stattgefunden hat.

Ein weiterer Ansatz zur Klärung der reduktiven CYP3A4-Eigenschaften ist die Verwendung von CYP3A4 Supersomes. Hierbei handelt es sich um eine rekombinante Enzympräparation, bei der die Enzyme mit ihren Coenzymen coexprimiert werden. Nach der Expressierung werden nur die Mikrosomen und nicht die einzelnen Enzyme isoliert, was sonst eine Solubilisation aus ihrer Membran erfordert hätte. Die Proteine liegen hier also noch rekonstituiert in ihrer Lipidmembran verankert vor.

Um Rekonstitutionsprobleme aufgrund von Proteinen unterschiedlicher Spezies auszuschließen, sollte in dieser Arbeit ausschließlich mit humanen Enzymsystemen inkubiert werden.

2001 veröffentlichten Stiborová *et al.* erstmals eine erfolgreiche Rekonstitution eines rekombinanten Cytochrom P450 Isoenzym für die Reduktion einer Nitro-

Verbindung (Stiborová *et al.*, 2001; Isin und Guengerich, 2007). Die hier verwendeten Rekonstitutionsbedingungen, wie die Verwendung des ionischen Tensids CHAPS, einer Phospholipidmischung aus DLPC, dem sauren PS und dem ungesättigten DOPC, sowie der Zusatz von Gluthathion, sollten analog auf die Benzamidoxim Reduktion übertragen werden.

In jüngster Zeit wurde die Reduktion von Amidoximen allein durch das Zweikomponentensystem, bestehend aus den löslichen Isoformen des Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase, beschrieben (Kurian *et al.*, 2004; Saulter *et al.*, 2005). Es gibt Hinweise, dass es sich hierbei allerdings um eine eher chemische als enzymatische Reaktion handelt (Holtkamp, 2007).

Um den Einfluss der Apoproteine der an der Reaktion beteiligten Enzyme zu beurteilen, sollte zum einen mit hitzedenaturierten Komponenten gearbeitet werden und zum anderen Cytochrom b_5 und die mikrosomale N -reduktive Komponente, bei der es sich möglicherweise ebenfalls um ein Hämprotein handelt, jeweils durch das Häm-Modell MP8 ausgetauscht werden. Kurian *et al.* (2004) verwendeten für ihre Inkubationen im Zweikomponentensystem ein Verhältnis von Cytochrom b_5 zu NADH Cytochrom b_5 Reduktase von 8 – 10:1, was als physiologisch angesehen wird (Yang und Cederbaum, 1996; Rogers und Strittmatter, 1974). Stöchiometrisch optimal für die Reaktion im Dreikomponentensystem ist allerdings ein ungefähr äquimolares Verhältnis. Der Einfluss der veränderten Stöchiometrie sollte bei allen durchgeführten Inkubationen berücksichtigt werden.

3.2 METHODEN

3.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

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

3.2.2 ENZYMPRÄPARATIONEN

Tab. 3.3 Übersicht über die verwendeten Enzympräparationen

| Enzympräparation | Ursprung | Bezugsquelle |
|--|--|--|
| CYP3A4 | aus humanem Gewebe gereinigt | Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA |
| CYP2A6 | aus humanem Gewebe gereinigt | Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA |
| Cytochrom b ₅ | aus humanem Gewebe gereinigt | Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA |
| CYP3A4 | in E. Coli exprimiert und gereinigt | Pan Vera Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| CYP3A4+b ₅ +P450R* (Supersomes) | in Baculovirus-Insektenzellen exprimiert | BD Gentest, Woburn, MA, USA |
| FMO3 | in Baculovirus-Insektenzellen exprimiert und gereinigt | BD Gentest, Woburn, MA, USA |
| DTD | in E. Coli exprimiert und gereinigt | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| ΩGST | in E. Coli exprimiert und gereinigt | Prof. Aposhian, University of Arizona, Tucson, AZ, USA |
| Cytochrom b ₅ | in E. Coli exprimiert und gereinigt | MBL, Woburn, MA, USA |
| NADPH Cytochrom P450 Reduktase | in Baculovirus-Insektenzellen exprimiert und gereinigt | BD Gentest, Woburn, MA, USA |
| NADH Cytochrom b ₅ Reduktase | in Hefe exprimiert und gereinigt | Abnova, Niehu, Taipei, Taiwan |
| NADH Cytochrom b ₅ Reduktase | aus porcinem Gewebe gereinigt | Gereinigt nach Clement <i>et al.</i> , 1997 |
| Microperoxidase 8 | aus Trypsin-verdaulichem Pferdeherz-Cytochrom c | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

*CYP3A4 wurde mit Cytochrom b₅ und der NADPH Cytochrom P450 Reduktase coexprimiert.

Eine Übersicht über die verwendeten Enzymquellen, die Art der Gewinnung, ggf. das Expressionssystem und die jeweiligen Bezugsquellen gibt Tab. 3.3.

3.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMQUELLEN

3.2.3.1 Photometrische Assays

Sofern nicht hier aufgeführt, sind die photometrischen Assays zur Charakterisierung der Enzymquellen in Kapitel 2.2.3.1 angegeben.

3.2.3.1.1 NADPH Cytochrom P450 Reduktase

Die NADPH Cytochrom P450 Reduktase Aktivitätsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch nach Sottocasa *et al.* (1967). Daraus ergab sich folgende Zusammensetzung des Enzymassays in 1000 μl Gesamtvolumen: rekombinante NADPH Cytochrom P450 Reduktase, 0,1 mM NADPH, 0,1 mM Cytochrom c und 0,3 mM Kaliumcyanid in 500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5. Alle Reagenzien wurden stets frisch in Puffer gelöst. Die Absorptionzunahme wurde nach dem Starten der Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates bei 550 nm über eine Messzeit von 60 Sekunden bei 30 °C verfolgt. Das Messprinzip beruht auf der enzymatischen Reduktion von Cytochrom c. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die reduzierte Form des Cytochrom c herangezogen (Kamin *et al.*, 1965). Die Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute ein μmol Cytochrom c umsetzt.

3.2.3.1.2 Gehaltsbestimmung der MP8

Die MP8 Gehaltsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch nach Aron *et al.* (1986). Das Enzym wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst, dem 25 % Methanol zugesetzt waren. Zur Gehaltsbestimmung wurde der

Absorptionskoeffizient $\epsilon = 157 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die Soret Bande bei 397 nm herangezogen.

3.2.3.1.3 Substratbindung an MP8

Es wurden Substratbindungsspektren in Anlehnung an das von Schenkman *et al.* (1967) entwickelte Verfahren vermessen.

Die Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur in einem Uvikon 942 (Kontron Biotek, Neufahrn) oder einem Cary 50 (Varian, Darmstadt) Spektrophotometer in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt. Die Enzymquelle wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 auf einen MP8-Gehalt von 1 μM eingestellt (Aron *et al.*, 1986), das Volumen betrug 500 μl . Benzamidoxim wurde zunächst in DMSO gelöst und schrittweise bis zu einer Konzentration von 20 mM in die Probenküvette gegeben. Die Referenzküvette wurde entsprechend mit DMSO bis zum gleichen Volumen aufgefüllt. Die höchste DMSO-Konzentration in der Küvette betrug 4 %.

Es wurden Spektren im Bereich von 380 bis 500 nm aufgenommen.

3.2.3.1.4 DTD

Die DTD-Gehaltsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch nach Hassani *et al.* (2005). Daraus ergab sich folgende Zusammensetzung des Enzymassays in 1000 μl Gesamtvolumen: 0,5 μg DTD, 1 mM NADPH, 70 μM Cytochrom c und 25 μM Menadion bzw. Benzamidoxim in 25 mM Trispuffer pH 7,4. Alle Reagenzien wurden stets frisch in Puffer gelöst. Die Absorptionzunahme wurde nach dem Starten der Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates bei 550 nm über eine Messzeit von 30 Sekunden bei 37 °C verfolgt. Das Messprinzip beruht auf der enzymatischen Reduktion von Cytochrom c. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Absorptionskoeffizient $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die reduzierte Form des Cytochrom c herangezogen (Kamin *et al.*, 1965). Die Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Enzymmenge definiert ist, die pro Minute ein μmol Cytochrom c umsetzt.

3.2.3.2 *In vitro* Biotransformationsansätze

3.2.3.2.1 Inkubationsansätze zur Bestimmung der CYP2A6 Markerenzymaktivität Cumarin-7-Hydroxylierung

Zur Rekonstitution der Enzymaktivität wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 50 pmol humanes gereinigtes CYP2A6 bzw. 5 µg dritte Komponente, 150 pmol rekombinante NADPH Cytochrom P450 Reduktase, 200 pmol humanes gereinigtes Cytochrom b₅ und ein Zusatz von 0,5 mg/ml CHAPS; 0,1 mg/ml einer Mischung aus gleichen Teilen DLPC, PS und DOPC und 3 mM Gluthathion wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 500 µM Cumarin und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 1 mM NADPH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 µl. Nach 20 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 g abgetrennt. Gebildetes 7-Hydroxycumarin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

3.2.3.2.2 Inkubationsansätze zur Bestimmung der CYP3A4 Markerenzymaktivität Testosteron-6-β-Hydroxylierung

Zur Rekonstitution der Enzymaktivität wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 30 pmol humanes gereinigtes bzw. rekombinantes CYP3A4 oder 5 µg dritte Komponente, 90 pmol rekombinante NADPH Cytochrom P450 Reduktase, 120 pmol humanes gereinigtes Cytochrom b₅ und ein Zusatz von 0,5 mg/ml CHAPS; 0,1 mg/ml einer Mischung aus gleichen Teilen DLPC, PS und DOPC und 3 mM Gluthathion wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 200 µM Testosteron und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 1 mM NADPH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 100 µl. Nach 15 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Acetonitril. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige

Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes 6- β -Hydroxytestosteron wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Für den 200 μ l-Inkubationsansatz mit CYP3A4 Supersomes oder humanen Lebermikrosomen wurden 87 μ g Supersomes (entspricht 9,6 pmol CYP3A4, 0,28 U NADPH Cytochrom P450 Reduktase und 11 nmol Cytochrom b_5) oder 180 μ g humane Lebermikrosomen und ein Zusatz von 3,3 mM Magnesiumchlorid mit 250 μ M Testosteron in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 drei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit 450 μ M NADPH gestartet und nach 15 Minuten durch Zugabe von Acetonitril abgestoppt. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes 6- β -Hydroxytestosteron wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

3.2.4 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN

3.2.4.1 Inkubationen mit gereinigten bzw. rekombinanten Cytochrom P450 Enzymen

Zur Rekonstitution der Enzymaktivität wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 5 μ g gereinigtes CYP2A6 bzw. CYP3A4, rekombinantes CYP3A4 oder CYP3A4 Supersomes oder gereinigte mikrosomale Komponente, 75 bzw. 750 pmol humanes gereinigtes Cytochrom b_5 , 0,35 U porcine bzw. rekombinante humane NADH Cytochrom b_5 Reduktase und ein Zusatz von 0,5 mg/ml CHAPS; 0,1 mg/ml einer Mischung aus gleichen Teilen DLPC, PS und DOPC und 3 mM Gluthathion wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 500 μ M Benzamidoxim und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 1 mM NADH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 μ l. Nach 15 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

3.2.4.2 Inkubationen mit anderen rekombinanten Enzymen

Zur Rekonstitution der Enzymaktivität wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 50 – 100 µg FMO3, 50 µg DT Diaphorase oder 5 – 10 µg Ω-Gluthathion-S-Transferase, 75 pmol rekombinantes Cytochrom b₅, 0,35 U porcine NADH Cytochrom b₅ Reduktase und ein Zusatz von 0,5 mg/ml CHAPS; 0,1 mg/ml einer Mischung aus gleichen Teilen DLPC, PS und DOPC und 3 mM Gluthathion wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 500 µM Benzamidoxim und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 1 mM NADH bzw. NADPH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 µl. Nach 15 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 g abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

3.2.4.3 Inkubationen mit MP8 bzw. hitzedenaturierten Proteinen

Für die Inkubationen wurde als Kontrollansatz eine mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 gepufferte Suspension aus 75 bzw. 750 pmol rekombinantem Cytochrom b₅, 0,35 U porciner NADH Cytochrom b₅ Reduktase und ggf. 5 µg dritter Komponente verwendet. Die Komponenten wurden zunächst einzeln oder gemeinsam gegen die hitzedenaturierten Komponenten ausgetauscht. Diese sind durch 15-minütiges Abkochen im Wasserbad und anschließendes Resuspendieren nach Vortexen erhalten worden. MP8 wurde sowohl anstelle von Cytochrom b₅ als auch der dritten Komponente in steigenden Mengen (0 bis 1000 pmol) zugesetzt.

Nach Zugabe von 40 µM DLPC wurde zwei Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde das Substrat Benzamidoxim in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben und die Reaktion nach einer erneuten Vorinkubation von drei Minuten mit 1 mM NADH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 µl. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch

fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

3.2.5 HPLC-ANALYTIK

3.2.5.1 HPLC-Analytik zur Trennung von Cumarin und 7-Hydroxycumarin

Die HPLC-Analytik erfolgte nach Zebothsen (2005) unter Verwendung des folgenden HPLC-Systems:

| | |
|--------------------|--|
| HPLC-Pumpe: | Waters 600 Pumpe mit Controller (Waters, Milford, CT, USA) |
| Detektor: | Waters Fluoreszenzdetektor 470 (Waters, Milford, CT, USA) |
| Autosampler: | Waters WISP 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA) |
| Integrator: | EZChromElite™ Aufnahme und Auswertesoftware Version 2.8.3 (EZChromElite SS42ox Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA) |
| Stationäre Phase: | Nucleosil C18 5 µm, 250 × 4 mm (Gromm, Herrenberg) mit Waters Guard Column C18 (Waters, Milford, CT, USA) |
| Mobile Phase: | 45 % 0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5; eingestellt mit Eisessig 55 % Methanol (v/v) |
| Flussrate: | 0,8 ml/min |
| Detektion: | Fluoreszenz, Ex λ = 340 nm, Em λ = 460 nm |
| Injektionsvolumen: | 10 µl |
| Retentionszeiten: | 7-Hydroxycumarin 5,5 ± 0,1 min Cumarin 8,2 ± 0,1 min |

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius® Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Methanol 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit 7-Hydroxycumarin in definierten Konzentrationen (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 µM)

im Fließmittel gelöst. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r > 0,999$). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. 7-Hydroxycumarin wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst, den Inkubationsansätzen 0,1 mg/ml denaturiertes Protein sowie 200 μ M Cumarin zugefügt. Diese wurden 25 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert, mit der entsprechenden Menge Methanol abgestoppt und nach Zentrifugation bei 10000 g anschließend mittels HPLC quantifiziert. Es wurde eine Wiederfindungsrate von 109 ± 3 % ermittelt.

3.2.5.2 HPLC-Analytik zur Trennung von Testosteron und 6- β -Hydroxytestosteron

Die HPLC-Analytik erfolgte nach Zebothsen (2005) unter Verwendung des folgenden HPLC-Systems:

| | |
|-------------------|--|
| HPLC-Pumpe: | Waters 616 Pumpe mit Controller (Waters, Milford, CT, USA) |
| Detektor: | Waters 486 TAD UV Detector (Waters, Milford, CT, USA) |
| Autosampler: | Waters WISP 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA) |
| Integrator: | EZChromElite™ Aufnahme und Auswertesoftware Version 2.8.3 (EZChromElite SS42ox Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA) |
| Stationäre Phase: | LiChroCART 125-4 HPLC-Kartusche mit LiChrospher® 60 RP-select B (5 μ m), Vorsäule RP-select B, 4 \times 4 mm (Merck, Darmstadt) |
| Mobile Phase: | Fließmittel A: 75 % <i>Aqua bidest.</i> , 25 % Acetonitril (v/v) Fließmittel B: Acetonitril |
| Flussrate: | 1,0 ml/min |

Gradient: 0 – 11 min: 100 % A, 0 % B
 11 – 14 min: 70 % A, 30 % B
 14 – 22 min: 70 % A, 30 % B
 22 – 24 min: 100 % A, 0 % B
 24 – 29 min: 100 % A, 0 % B

Detektion: $\lambda = 254 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 15 μl

Retentionszeiten: 6- β -Hydroxytestosteron $8,2 \pm 0,1 \text{ min}$
 Testosteron $19,8 \pm 1,0 \text{ min}$

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 μm Sartorius[®] Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit 6- β -Hydroxy-testosteron in definierten Konzentrationen (1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 50 μM) im Fließmittel gelöst. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r > 0,999$). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. 6- β -Hydroxytestosteron wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst, den Inkubationsansätzen 0,1 mg/ml denaturiertes Protein sowie 200 μM Testosteron zugefügt. Diese wurden 20 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert, mit der entsprechenden Menge Acetonitril abgestoppt und nach Zentrifugation bei 10000 g anschließend mittels HPLC quantifiziert. Es wurde eine Wiederfindungsrate von $80 \pm 11 \%$ ermittelt.

3.2.5.3 HPLC-Analytik zur Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin

Die HPLC-Analytik nach Friedrich (2003) wurde zur Verbesserung der Bestimmungsgrenze leicht modifiziert unter Verwendung des folgenden HPLC-Systems:

HPLC-Pumpe: Waters 616 Pumpe mit Controller (Waters, Milford, CT, USA)

| | | |
|--------------------|--|----------------------------|
| Detektor: | Waters 486 TAD UV Detector (Waters, Milford, CT, USA) | |
| Autosampler: | Waters WISP 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA) | |
| Integrator: | EZChromElite™ Aufnahme und Auswertesoftware Version 2.8.3 (EZChromElite SS42ox Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA) | |
| 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: | 83 % 10 mM 1-Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> 17 % Acetonitril (v/v) | |
| Flussrate: | 1,0 ml/min | |
| Detektion: | $\lambda = 201 \text{ nm}$ | |
| Injektionsvolumen: | 40 µl | |
| Retentionszeiten: | Benzamidoxim | $7,9 \pm 0,1 \text{ min}$ |
| | Benzamidin | $26,7 \pm 0,5 \text{ min}$ |

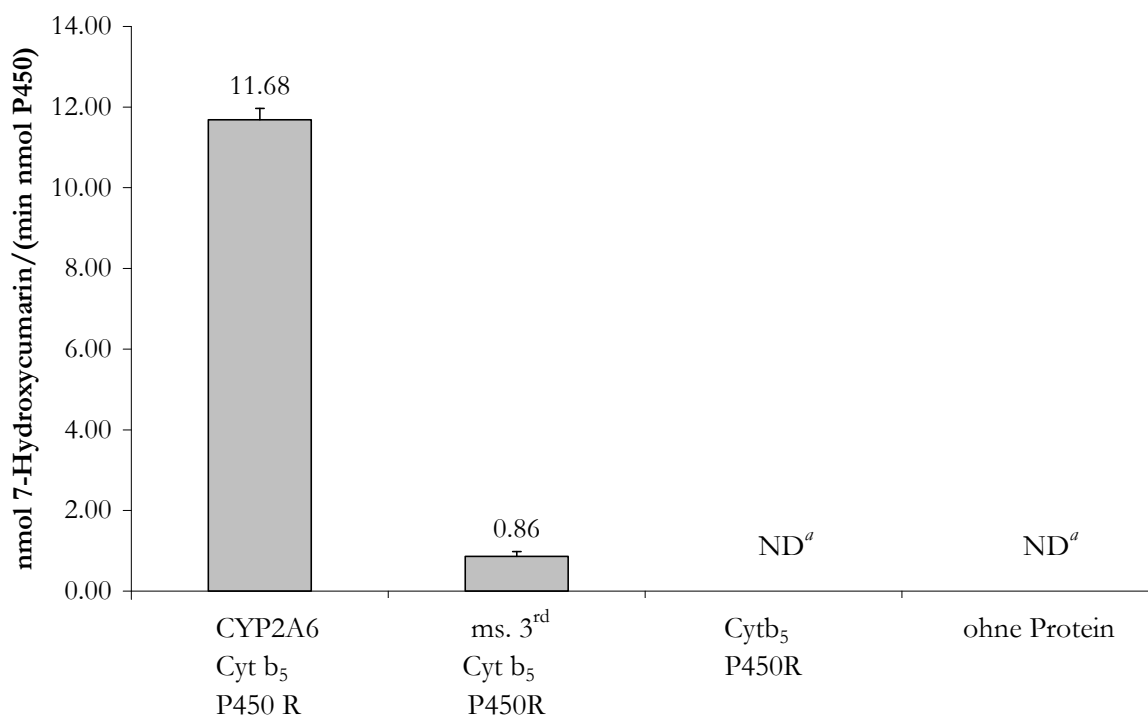
Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius® Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit Benzamidin in definierten Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 µM) im Fließmittel gelöst. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r > 0,999$). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Benzamidin wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 gelöst, den Inkubationsansätzen 0,1 mg/ml denaturiertes Protein sowie 500 µM Benzamidoxim zugefügt. Diese wurden 35 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert, mit der entsprechenden Menge Methanol abgestoppt und nach Zentrifugation bei 10000 g anschließend mittels HPLC quantifiziert. Es wurde eine Wiederfindungsrate von $101 \pm 8 \%$ ermittelt.

3.3 ERGEBNISSE

3.3.1 CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMQUELLEN

3.3.1.1 CYP2A6



^aNicht detektierbar; < 0,4 nmol 7-Hydroxycumarin / (min nmol P450); CYP2A6 = Cytochrom P450 2A6; Cyt b₅ = Cytochrom b₅; P450R = NADPH Cytochrom P450 Reduktase; ms. 3rd = gereinigte mikrosomale dritte Komponente

Abb. 3.6 Rekonstitution der Markerenzymaktivität von Cytochrom P450 2A6

Die Durchführung der Inkubation ist in Kapitel 3.2.3.2.1 beschrieben. Gebildetes 7-Hydroxycumarin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.1 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Zur Überprüfung der gelieferten Enzymcharge des aus humanem Gewebe gereinigten CYP2A6 wurde die Markerreaktion der Cumarin-7-Hydroxylierung untersucht und mittels der in 3.2.5.1 aufgeführten HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.6 dargestellt.

Die Enzymaktivität des gereinigten CYP2A6 konnte rekonstituiert und eine Umsatzrate von $11,68 \pm 0,28$ nmol 7-Hydroxycumarin/(min nmol P450) ermittelt werden. Diese entsprach 105 % der vom Hersteller angegebenen Markerenzymaktivität.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die dritte Komponente ebenfalls in der Lage ist, diese Reaktion mit einer Umsatzrate von $0,86 \pm 0,12$ nmol 7-Hydroxycumarin/(min nmol P450) zu katalysieren. Inkubationen ohne Protein sowie mit Cytochrom b_5 und NADPH Cytochrom P450 Reduktase allein führten zu keiner messbaren Bildung des Metaboliten.

3.3.1.2 CYP3A4

Zur Überprüfung der gelieferten Enzymchargen des aus humanem Gewebe gereinigten CYP 3A4 sowie der rekombinanten Präparationen wurde die Markerreaktion der Testosteron-6- β -Hydroxylierung untersucht und mittels der in 3.2.5.2 aufgeführten HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.4 dargestellt.

Die Markerenzymaktivität für das gereinigte CYP3A4 konnte nicht rekonstituiert werden. Für das rekombinante CYP3A4 wurde eine Umsatzrate ermittelt, die lediglich ca. 7 % der vom Hersteller angegebenen Enzymaktivität entsprach. Waren Cytochrom b_5 und die NADPH Cytochrom P450 Reduktase coexprimiert, entsprach die Umsetzung des rekonstituierten Systems ca. 51 % der vom Hersteller angegebenen. Für die gereinigte mikrosomale Komponente sowie humane Lebermikrosomen konnte ebenfalls eine Markerenzymaktivität festgestellt werden (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Rekonstitution der Markerenzymaktivität von Cytochrom P450 3A4

| Enzymquelle | Aktivität |
|--|---|
| | nmol 6- β -Hydroxytestosteron/(min nmol P450) |
| CYP3A4, gereinigt | ND ^a |
| CYP3A4, rekombinant | 3,36 \pm 1,06 |
| CYP3A4 + Cyt b ₅ + P450R, rekombinant (Supersomes) | 91,66 \pm 10,76 |
| Porcine mikrosomale N-reduktive Komponente, gereinigt | 0,34 \pm 0,01 |
| humane Lebermikrosomen | 4,20 \pm 0,06 |

^aNicht detektierbar, < 0,2 nmol 6- β -Hydroxytestosteron/(min nmol P450); Cyt b₅ = Cytochrom b₅, P450R = NADPH Cytochrom P450 Reduktase

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 3.2.3.2.2 beschrieben. Gebildetes 6- β -Hydroxytestosteron wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.2 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.1.3 DTD

Zur Aktivitätsbestimmung der DTD wurde ein photometrischer Assay (s. Kapitel 3.2.3.1.4) verwendet, bei dem die Reduktion von Cytochrom c als terminalem Elektronenakzeptor gemessen wird. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt.

Bei Vorliegen von Menadion konnte eine Enzymaktivität von 64 U/mg gemessen werden, die ca. 64 % der vom Hersteller angegebenen Enzymaktivität entsprach. Ferner konnte gezeigt werden, dass Benzamidoxim nicht in der Lage ist, anstelle

von Menadion als Substrat für die DTD mit Cytochrom c als terminalem Elektronenakzeptor zu wirken.

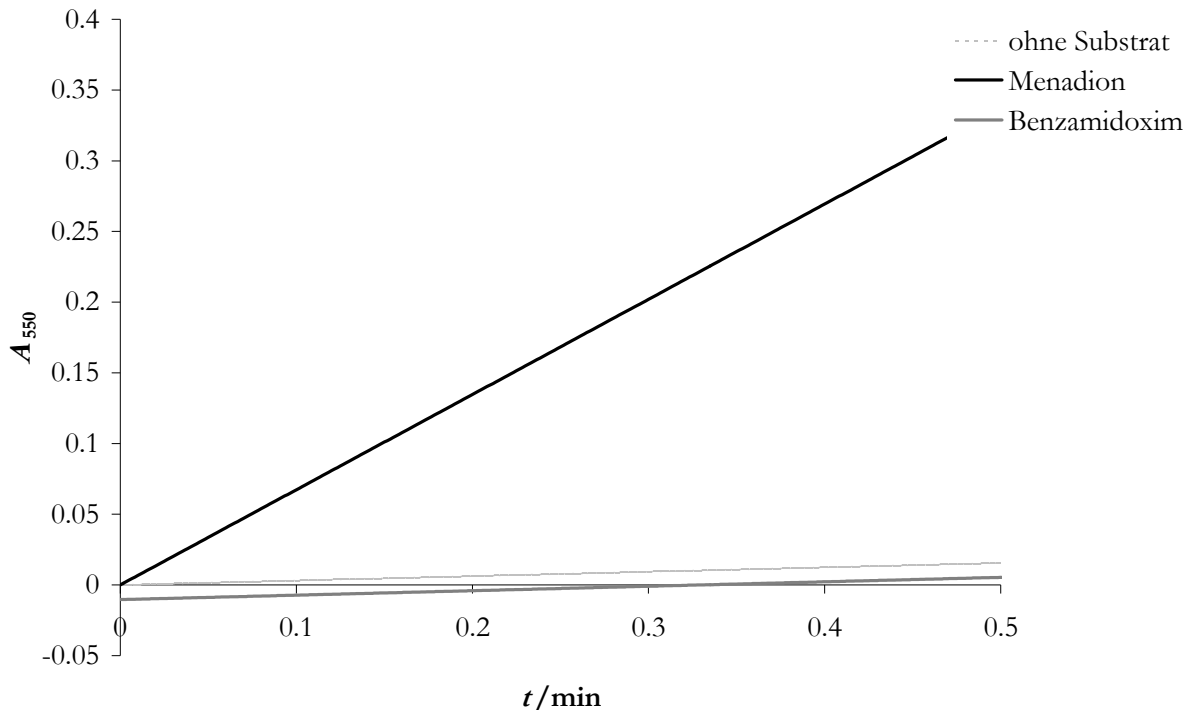


Abb. 3.7 Absorptionzunahme bei 550 nm durch Reduktion von Cytochrom c als terminalem Elektronenakzeptor für die DT Diaphorase bei Vorliegen von Menadion, Benzamidoxim oder ohne Substrat

Die Durchführung des Enzymassays ist in Kapitel 3.2.3.1.4 beschrieben.

3.3.1.4 Rekombinante humane NADH Cytochrom b₅ Reduktase

Die Aktivitätsbestimmung der humanen rekombinanten NADH Cytochrom b₅ Reduktase erfolgte spektrophotometrisch wie in Kapitel 2.2.3.1.4 beschrieben. Es konnte eine spezifische Aktivität von $6,2 \pm 1,0$ U/mg ermittelt werden. Vom Hersteller war keine spezifische Aktivität angegeben worden.

3.3.1.5 MP8

Mithilfe der MP8 wurde die Fähigkeit von Benzamidoxim, koordinativ am Häm zu binden, untersucht. Wie in Kapitel 3.2.3.1.3 beschrieben, wurden dazu Differenzbindungsspektren aufgenommen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.8 dargestellt.

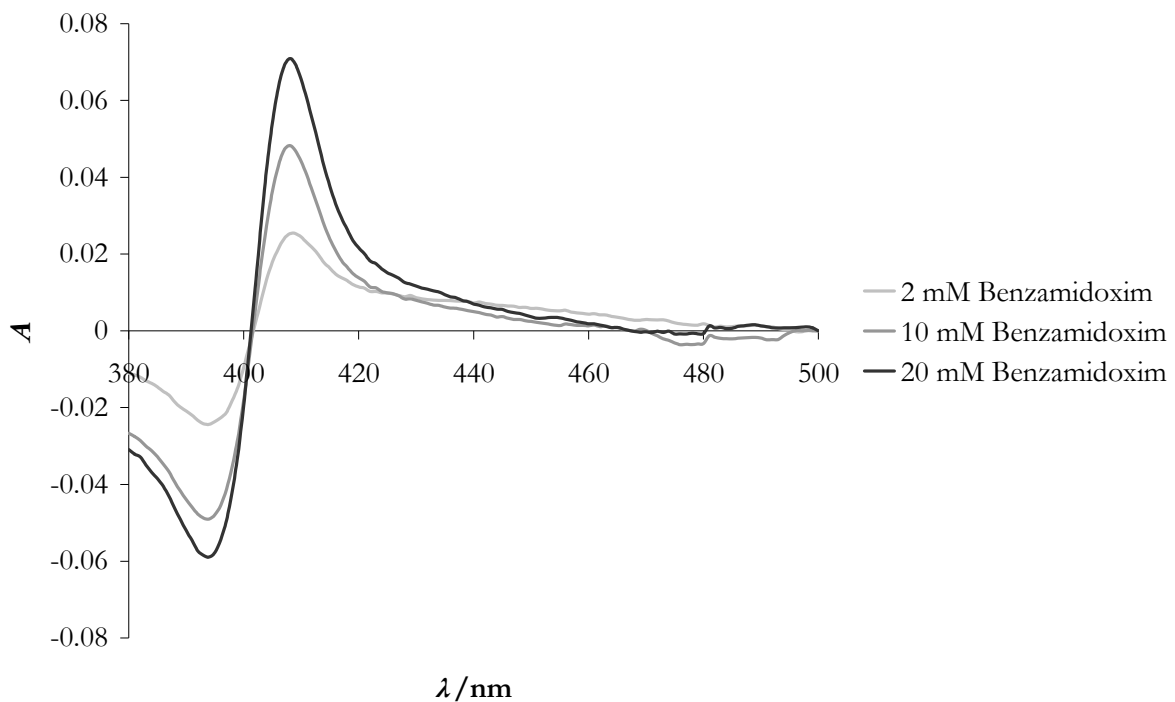


Abb. 3.8 Differenzbindungsspektrum nach Zugabe von 2 bis 20 mM Benzamidoxim zu 1 μ M Microperoxidase 8

Die Durchführung für die Aufnahme der Differenzbindungsspektren ist in Kapitel 3.2.3.1.3 beschrieben.

Durch Zugabe steigender Konzentrationen Benzamidoxim verschob sich die Lage des Absorptionsmaximums der MP8 in den längerwelligen Bereich, was sich in einem Differenzspektrum wie hier dargestellt auswirkt. Dieses zeigt ein Minimum bei 394 nm und ein Maximum bei 408 nm. Die gemessene Absorptionsdifferenz

war konzentrationsabhängig und folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Wolf, 2003).

3.3.2 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN

3.3.2.1 *In vitro* Studien mit Cytochrom P450 Isoenzymen

Die gereinigten humanen Cytochrom P450 Isoenzyme wurden nach Rekonstitution mit humanem rekombinantem Cytochrom b_5 und gereinigter porciner sowie rekombinanter humaner NADH Cytochrom b_5 Reduktase auf ihre Benzamidoxim Reduktase Aktivität getestet und die Bildung des Metaboliten Benzamidin mittels der in 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.5 dargestellt.

Alle durchgeführten Inkubationen mit der rekombinanten humanen NADH Cytochrom b_5 Reduktase zeigten keine messbaren Umsetzungen von Benzamidoxim zu Benzamidin. Rekonstitutionen der humanen CYPs mit ebenfalls humanem Cytochrom b_5 und porciner NADH Cytochrom b_5 Reduktase lieferten keine signifikant erhöhten Umsetzungsraten gegenüber dem Zweikomponentensystem unabhängig von dem eingesetzten Verhältnis von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase. Einzig die gereinigte mikrosomale dritte Komponente konnte die Umsetzungsraten im Vergleich zu dem optimierten Ansatz im Zweikomponentensystem signifikant steigern, selbst bei Einsatz eines 10:1-Verhältnisses von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase ($p < 0,001$).

Die Inkubationen wurden auch mit rekombinantem CYP3A4 und den CYP3A4 Supersomes wie in 3.2.4.1 beschrieben durchgeführt, zeigten jedoch keine Veränderungen zu den hier dargestellten gereinigten humanen Präparationen (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.5 Benzamidoxim Reduktase Aktivität gereinigter humaner Cytochrom P450 Isoenzyme

| Inkubationsansatz | Aktivität | N ^a |
|--|-----------------------------|----------------|
| | nmol Benzamidin/(min mg) | |
| 5 µg CYP2A6, 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R | 1,21 ± 0,99 | 4 |
| 5 µg CYP3A4, 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R | 0,39 ± 0,15 | 4 |
| 5 µg CYP2A6/3A4, 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U hb ₅ R | ND ^b | 8 |
| 5 µg 3 rd , 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R | 32,91 ± 4,09 ^{***} | 8 |
| 5 µg 3 rd , 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U hb ₅ R | ND ^b | 4 |
| 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R | 0,38 ± 0,18 | 8 |
| 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U hb ₅ R | ND ^b | 8 |
| 5 µg CYP2A6/CYP3A4, 0,35 U b ₅ R | ND ^b | 8 |
| 5 µg CYP2A6/CYP3A4, 75 pmol Cyt b ₅ | ND ^b | 8 |
| 5 µg CYP2A6, 750 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R | 2,57 ± 1,52 | 4 |
| 5 µg CYP3A4, 750 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R | 1,51 ± 0,08 | 4 |
| 750 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R | 2,84 ± 1,62 | 8 |
| 750 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U hb ₅ R | ND ^b | 8 |
| ohne Protein | ND ^b | 8 |
| 5 µg CYP2A6/CYP3A4, 75 pmol Cyt b ₅ , 0,35 U b ₅ R, — NADH | 0,41 ± 0,02 | 8 |

^aAnzahl der Bestimmungen; ^bNicht detektierbar, < 0,2 nmol Benzamidin/(min mg);

^{***}p < 0,001 gegenüber dem Inkubationsansatz 750 pmol Cyt b₅, 0,35 U b₅R;

Cyt b₅ = Cytochrom b₅; b₅R = gereinigte porcine NADH Cytochrom b₅ Reduktase; hb₅R = rekombinante humane NADH Cytochrom b₅ Reduktase; 3rd = gereinigte mikrosomale dritte Komponente

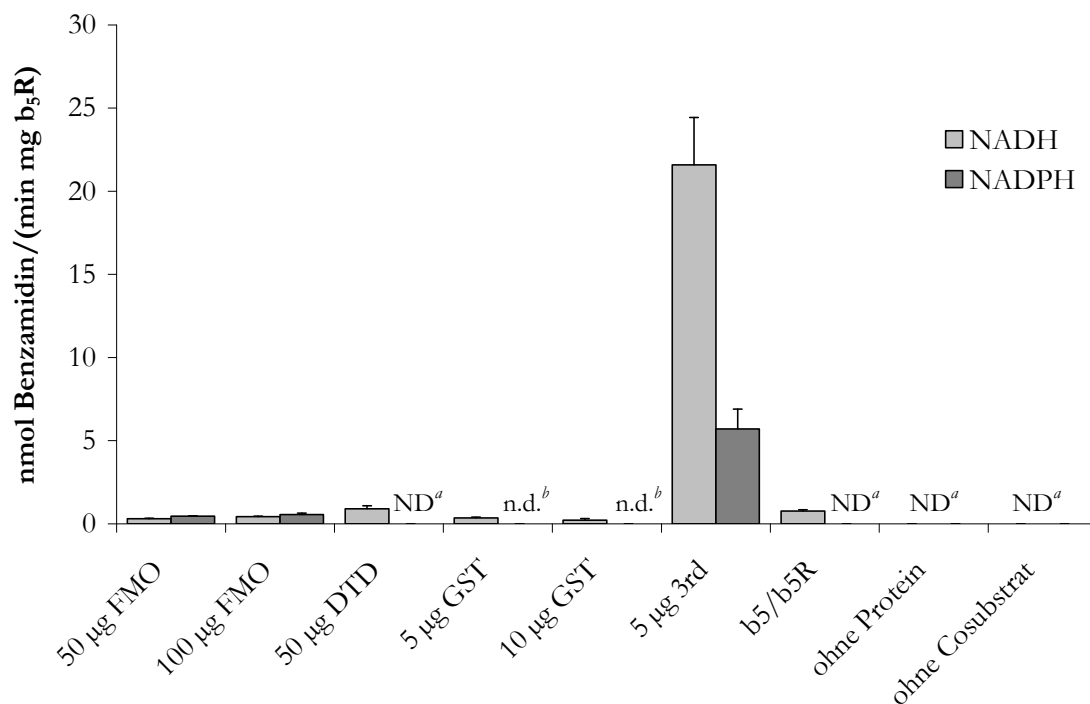
Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

3.3.2.2 *In vitro* Studien mit weiteren Enzymquellen

Humane rekombinante FMO3, DTD und ΩGST wurden ebenfalls mit Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase rekonstituiert und auf ihre Fähigkeit, Benzamidoxim zu reduzieren, getestet. Da es sich bei der FMO3 und der DTD um NADPH abhängige Enzyme handelt, wurden auch jeweils Ansätze mit diesem Cofaktor inkubiert. Die Bildung des Metaboliten Benzamidin wurde mittels der in 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.9 dargestellt.

Aufgrund der stark schwankenden Mengen an Gesamtprotein in den Inkubationsansätzen wurde die Umsetzungsrate nicht auf den Gesamtproteingehalt sondern auf die konstante Menge NADH Cytochrom b₅ Reduktase bezogen. Unterschiede in den Umsetzungsraten sind so klarer darstellbar.

Die für die rekombinanten Enzyme gemessenen Umsetzungsraten lagen zwischen $0,22 \pm 0,10$ und $0,90 \pm 0,19$ nmol Benzamidin/(min mg b₅ Reduktase), sofern sie überhaupt detektierbar waren. Die für das Zweikomponentensystem, bestehend aus Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase, gemessene Umsetzungsrate lag bei $0,77 \pm 0,08$ nmol Benzamidin/(min mg b₅ Reduktase). Im Gegensatz zur mikrosomalen N-reduktiven Komponente mit $21,6 \pm 2,9$ nmol Benzamidin/(min mg b₅ Reduktase) war keines der getesteten rekombinanten Enzyme in der Lage, die Umsetzungsrate im Vergleich zum Zweikomponentensystem signifikant zu erhöhen. Mit dem von der FMO3 und DTD bevorzugten Cofaktor NADPH konnten für die FMO3 Umsetzungsraten von $0,45 \pm 0,03$ bis $0,55 \pm 0,09$ nmol Benzamidin/(min mg b₅ Reduktase) erreicht werden. Die Umsetzungsrate für das entsprechende Zweikomponentensystem ebenso wie für die DTD war hier nicht detektierbar.



^aNicht detektierbar, < 0,2 nmol Benzamidin/(min mg b₅ Reduktase); ^bNicht bestimmt; b₅R = NADH Cytochrom b₅ Reduktase; 3rd = gereinigte mikrosomale dritte Komponente

Abb. 3.9 Benzamidoxim Reduktase Aktivität in nmol Benzamidin/(min mg NADH Cytochrom b₅ Reduktase) von rekombinanter flavinhaltiger Monooxygenase 3, DT Diaphorase und Ω-Gluthathion-S-Transferase

Die Durchführung der Inkubation ist in Kapitel 3.2.4.2. beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.2.3 *In vitro* Studien mit hitzedenaturierten Proteinen und dem Häm-Modell Microperoxidase 8

Aufgrund vermehrter Hinweise, dass es sich bei der Reduktion im Zweikomponentensystem um eine eher chemische als enzymatische Reduktion handelt (Holtkamp, 2007), wurden Inkubationen mit hitzedenaturiertem Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase durchgeführt, um den Einfluss der Apoproteine auf die Katalyse der Reduktion zu beurteilen. Ferner wurden Untersuchungen mit dem Häm-Modell MP8, für das eine koordinative Bindung von Benzamidoxim gezeigt werden konnte (s. Kapitel 3.3.1.5), angestellt. Da es sich sowohl bei Cytochrom b_5 als auch bei der mikrosomalen dritten Komponente vermutlich um ein Hämprotein handelt, wurden beide Komponenten gegen das Häm-Modell MP 8 ausgetauscht.

3.3.2.3.1 *In vitro* Studien mit hitzedenaturierten Proteinen

Der Einfluss aller drei Apoproteine auf die Reduktion von Benzamidoxim sowohl im Zwei- als auch im Dreikomponentensystem wurde durch Inkubation jeder einzelnen hitzedenaturierten Komponente mit den anderen nativen untersucht. Die Bildung des Metaboliten Benzamidin wurde mittels der in 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6 dargestellt.

Im Dreikomponentensystem wurde durch Hitzedenaturierung jeder einzelnen Komponente die Umsatzrate gegenüber dem nativen Ansatz signifikant herabgesetzt. Hitzedenaturiertes Cytochrom b_5 lieferte eine Umsatzrate, die etwa 55 % der der nativen entsprach, und damit noch deutlich höher lag als die der beiden anderen hitzedenaturierten Komponenten. Diese lieferten noch etwas mehr als 10 % der Aktivität und waren überdies mit der Aktivität des nativen Zweikomponentensystems vergleichbar.

Im Zweikomponentensystem hingegen hatte das Abkochen von Cytochrom b_5 allein keinen Einfluss auf die Umsatzrate im Vergleich zum nativen Ansatz. Ohne Zusatz von Cytochrom b_5 konnte jedoch keine Aktivität detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.6 Benzamidoxim Reduktase Aktivität im rekonstituierten Zwei- und Dreikomponentensystem nach Hitzedenaturierung der einzelnen Komponenten

| Inkubationsansatz | Aktivität |
|--|---|
| | nmol Benzamidin/(min mg b ₅ R) |
| Cyt b ₅ , b ₅ R, 3 rd | 9,31 ± 0,32 |
| Cyt b ₅ [†] , b ₅ R, 3 rd | 5,07 ± 0,38 ^{***} |
| Cyt b ₅ , b ₅ R [†] , 3 rd | 1,21 ± 0,31 ^{***} |
| Cyt b ₅ , b ₅ R, 3 ^{rd†} | 1,21 ± 0,24 ^{***} |
| Cyt b ₅ [†] , b ₅ R [†] , 3 ^{rd†} | 0,90 ± 0,31 ^{***} |
| Cyt b ₅ , b ₅ R | 2,06 ± 0,24 |
| Cyt b ₅ [†] , b ₅ R | 2,09 ± 0,21 |
| Cyt b ₅ , b ₅ R [†] | 1,30 ± 0,09 ^{##} |
| Cyt b ₅ [†] , b ₅ R [†] | 1,42 ± 0,30 [#] |

†=hitzedenaturiertes Protein (15 Minuten in kochendem Wasserbad und anschließender Resuspendierung durch Vortexen); Cyt b₅ = Cytochrom b₅; b₅R = NADH Cytochrom b₅ Reduktase; 3rd = gereinigte mikrosomale dritte Komponente; ^{***}p < 0,001 gegenüber dem Inkubationsansatz mit drei nativen Komponenten; ^{##}p < 0,005 bzw. [#]p < 0,05 gegenüber dem Inkubationsansatz mit zwei nativen Komponenten

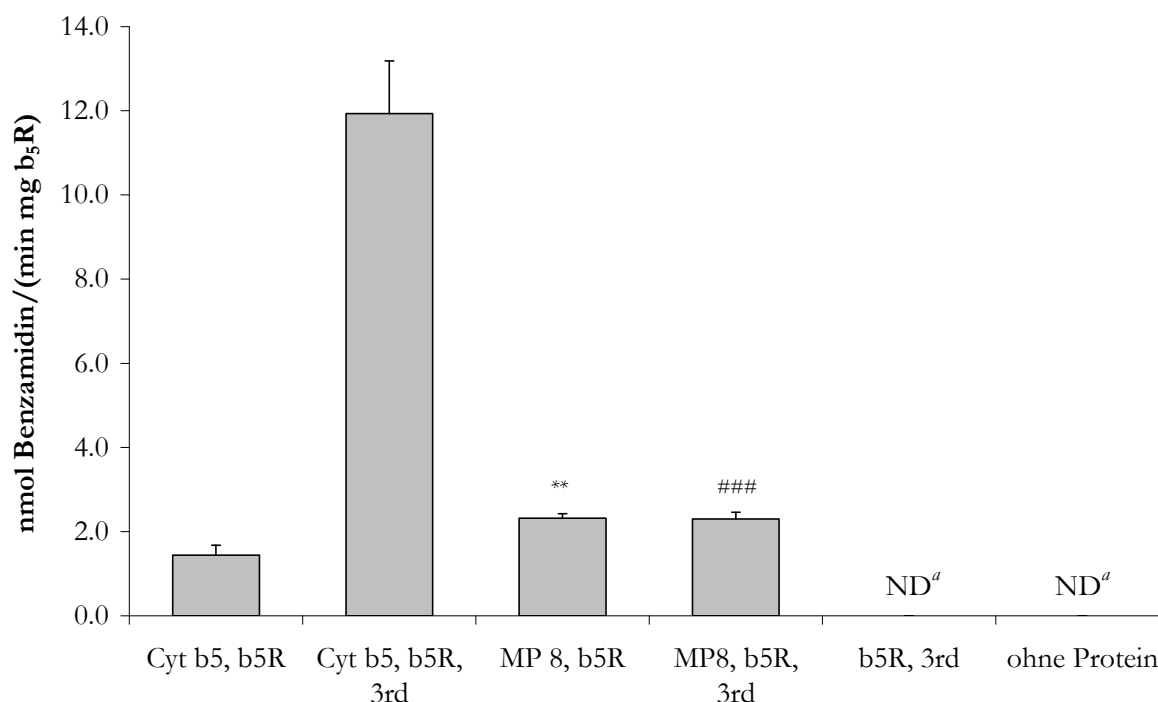
Die Durchführung der Inkubation ist in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Sowohl hitzedenaturierte NADH Cytochrom b_5 Reduktase als auch der Ansatz mit beiden denaturierten Proteinen lieferten ebenfalls signifikant niedrigere Umsetzungsraten.

3.3.2.3.2 *In vitro* Studien unter Austausch von Cytochrom b_5 durch das Häm-Modell MP8

Die Fähigkeit des Häm-Modells, das Hämprotein Cytochrom b_5 bei der Reduktion von Benzamidoxim zu ersetzen, wurde durch Inkubation unter Zugabe äquimolarer Mengen MP8 anstelle von Cytochrom b_5 untersucht. Die Bildung des Metaboliten Benzamidin wurde mittels der in 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 dargestellt.

Die Inkubationsansätze mit dem Häm-Modell MP8 lieferten Umsetzungsraten von $2,32 \pm 0,11$ nmol Benzamidin/(min mg b_5 Reduktase) im Zwei- und $2,30 \pm 0,16$ nmol Benzamidin/(min mg b_5 Reduktase) im Dreikomponentensystem. Damit war die Umsetzung im Zweikomponentensystem signifikant höher ($1,44 \pm 0,24$ nmol Benzamidin/(min mg b_5 Reduktase)), im Dreikomponentensystem signifikant niedriger ($11,93 \pm 1,25$ nmol Benzamidin/(min mg b_5 Reduktase)) als der jeweils entsprechende Ansatz mit Cytochrom b_5 .



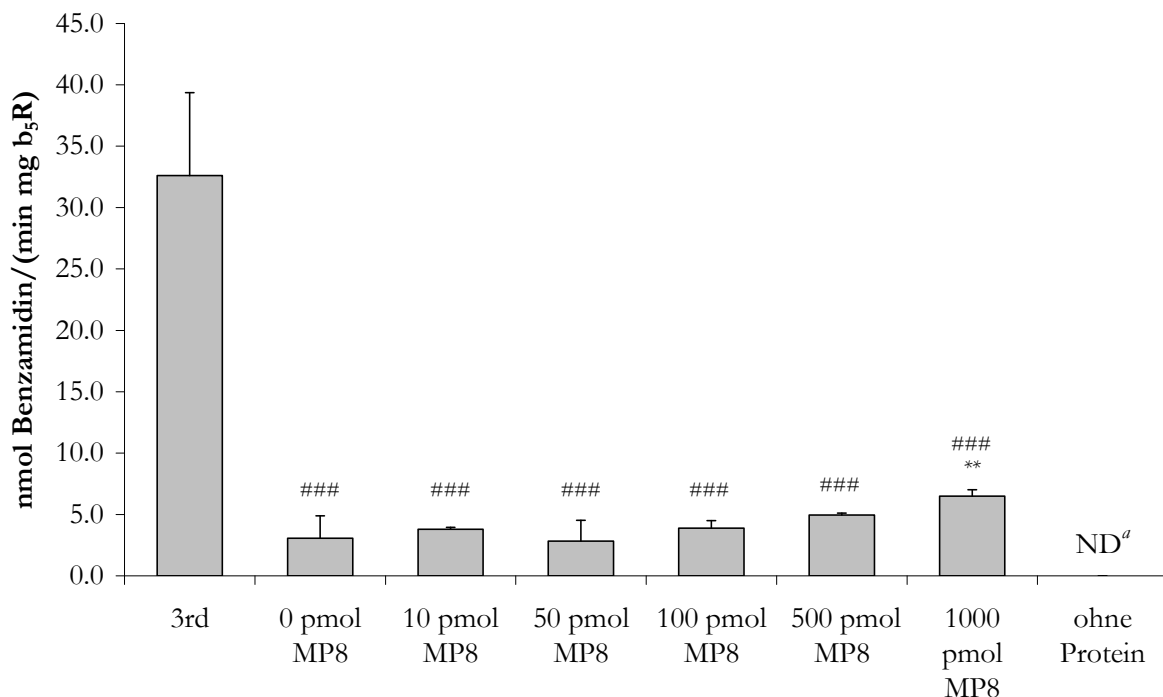
^aNicht detektierbar, < 0,2 nmol Benzamidin/(min mg b₅ Reduktase); Cyt b₅ = Cytochrom b₅; b₅R = NADH Cytochrom b₅ Reduktase; 3rd = gereinigte mikrosomale dritte Komponente; MP8 = Microperoxidase 8; ** p < 0,005 gegenüber dem Zweikomponentenansatz (Cytochrom b₅, NADH Cytochrom b₅ Reduktase); ### p < 0,001 gegenüber dem Dreikomponentenansatz (Cytochrom b₅, NADH Cytochrom b₅ Reduktase, 3rd)

Abb. 3.10 Benzamidoxim Reduktase Aktivität von Microperoxidase 8 anstelle von Cytochrom b₅

Die Durchführung der Inkubation ist in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.2.3.3 *In vitro* Studien unter Austausch der dritten Komponente durch das Häm-Modell MP8

Die Fähigkeit des Häm-Modells, die dritte Komponente bei der Reduktion von Benzamidoxim zu ersetzen, wurde durch Inkubation unter Zugabe steigender molarer Mengen MP8 anstelle von 5 µg der dritten Komponente untersucht.



^aNicht detektierbar, < 0,2 nmol Benzamidin/(min mg b₅ Reduktase); b₅R = NADH Cytochrom b₅ Reduktase; 3rd = gereinigte mikrosomale dritte Komponente; MP8 = Microperoxidase 8; ** p < 0,05 gegenüber 0 pmol Microperoxidase 8; ### p < 0,001 gegenüber dem Dreikomponentenansatz mit 3rd

Abb. 3.11 Benzamidoxim Reduktase Aktivität von Microperoxidase 8 anstelle der dritten Komponente

Die Durchführung der Inkubation ist in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bildung des Metaboliten Benzamidin wurde mittels der in 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11 dargestellt.

Der Zusatz steigender molarer Mengen MP8 zu dem Zweikomponentensystem, bestehend aus Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase, führte zu einer Erhöhung der Umsetzungsraten, die aber erst ab 1000 pmol MP8 signifikant war, im Vergleich jedoch immer noch deutlich niedriger ($p < 0,001$) als die Umsetzung mit der gereinigten mikrosomalen dritten Komponente.

3.4 DISKUSSION

Ziel der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Testung von gereinigten und rekombinanten Enzymen auf ihre Benzamidoxim Reduktase Aktivität war die Identifizierung der mikrosomalen dritten Komponente. Da die gereinigte Komponente ein Kohlenmonoxid-Absorptionsspektrum liefert, welches für Cytochrom P450 Enzyme charakteristisch ist, lag die Vermutung sehr nahe, dass es sich um ein solches Isoenzym handelt (Clement *et al.*, 1997). Auch LC/MS- bzw. Aminosäuresequenzanalysen unterstützen diese These (Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a). Trotzdem blieb die Testung der rekombinanten CYP Isoenzyme erfolglos, ebenso wie die Suche nach möglichen Ursachen dafür (Karhan, 2002). Deshalb schien der Einsatz aus humanem Gewebe gereinigter Cytochrom P450 Isoenzyme ein vielversprechender Ansatz zu sein. Die vorliegende Arbeit zeigte die erfolgreiche Rekonstitution des gereinigten CYP2A6 anhand der Cumarin-7-Hydroxylierungs-Markerenzymaktivität. Auch die mikrosomale N-reduktive Komponente war in der Lage die entsprechende Markerreaktion zu katalysieren. Dies bestätigt die zuvor von Behrens (1999) und Rieckert (1999) beschriebene Cumarin-7-Hydroxylierungs-Aktivität der mikrosomalen Komponente.

Im Gegensatz zu dem von Karhan (2002) und Lopian (2002) nach Yun *et al.* (1991) aus humaner Leber isolierten CYP2A6 Isoenzym, zeigte die in dieser Arbeit verwendete gereinigte CYP2A6-Präparation zusammen mit Cytochrom b₅ und

NADH Cytochrom b_5 Reduktase keine Benzamidoxim Reduktase Aktivität. Die Hemmung durch Bestandteile eines rekombinanten Expressionssystems kann deshalb ausgeschlossen werden. Da darüber hinaus in einem rein humanen System inkubiert wurde, kann CYP2A6 als verantwortliche Komponente für die Benzamidoxim Reduktion in humaner Leber ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für die von Karhan (2002) und Lopian (2002) beschriebene Benzamidoxim Reduktase Aktivität könnte eine Verunreinigung mit dem hierfür verantwortlichen Enzym sein.

Es sollte aber hinzugefügt werden, dass die verwendete rekombinante NADH Cytochrom b_5 Reduktase nur eingeschränkt funktionsfähig war. Diese wies nur eine verhältnismäßig geringe spezifische Aktivität auf und besaß zudem noch einen GST-Anker, den der Hersteller für die Aufreinigung an einer Affinitätsmatrix verwendet hatte und der dazu führte, dass die Reduktase auch im Inkubationsansatz mit der porcinen mikrosomalen Komponente keine nachweisbare Umsetzung lieferte. Da von Karhan (2002) gezeigt werden konnte, dass die porcine Reduktase ohne Einschränkung der Aktivität durch die humane austauschbar ist, ist diese fehlende Umsetzung auch nicht auf Speziesunterschiede zurückzuführen. Hinzu kommt, dass auch die Inkubation von gereinigtem humanen CYP2A6 mit porciner Reduktase zu keiner Umsetzung führte.

Die Rekonstitution für CYP3A4 erwies sich wie erwartet als schwierig (Yamazaki und Shimada, 2006; Guengerich, 1999). Während das aus humanem Gewebe gereinigte CYP3A4 keine Markerenzymaktivität zeigte, gelang die Rekonstitution für das rekombinante Protein, wenn auch mit geringen Umsetzungsraten. Der Einsatz von Supersomes, also rekombinantem CYP3A4 mit coexprimiertem Cytochrom b_5 und NADPH Cytochrom P450 Reduktase, hat sich in der Testosteron-6- β -Hydroxylierungs-Markerreaktion als sehr kompetent erwiesen und Umsetzungsraten geliefert, die sogar denen von humanen Lebermikrosomen weit überlegen waren. Auch die mikrosomale dritte Komponente war in der Lage die CYP3A4 Markerreaktion zu katalysieren.

Da die Aktivitätsbestimmung des aus humanem Gewebe gereinigten CYP3A4 nicht gelang, kann keine endgültige Aussage über die Fähigkeit dieses Isoenzym, Benzamidoxim zu reduzieren, getroffen werden. Nachdem aber auch die rekombinanten Präparationen nach sichergestellter Markerenzymaktivität keine

Umsetzung zeigten, ist eine Beteiligung an der mikrosomalen Benzamidoxim Reduktion nicht sehr wahrscheinlich.

Gleiches gilt für die weiteren getesteten rekombinanten Proteine FMO3, DTD und Ω GST. Für die DTD wurde ihre Aktivität spektrophotometrisch nachgewiesen. Trotzdem zeigte sie, ebenso wie die FMO3 und Ω GST keine Benzamidoxim Reduktase Aktivität.

Um den Einfluss der Apoproteine auf die Katalyse zu beurteilen, sollte in der vorliegenden Arbeit mit hitzedenaturierten Komponenten gearbeitet werden. Nachdem Kurian *et al.* (2004) und Saulter *et al.* (2005) die alleinige Reduktion von Benzamidoxim durch das Zweikomponentensystem, bestehend aus löslichem Cytochrom b_5 und löslicher NADH Cytochrom b_5 Reduktase, beschrieben hatten, konnte dies auch für die membranständigen Enzyme gezeigt werden (Clement *et al.*, 2005a). Jedoch konnte für dieses System keine Substratsättigung gefunden werden, was für eine enzymkatalysierte Reaktion ungewöhnlich ist (Holtkamp, 2007) und den bisherigen Erkenntnissen über die Umsetzung bei Anwesenheit aller drei Komponenten oder Mikrosomen widerspricht (Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Umsetzung im Zweikomponentensystem bei Verwendung von hitzedenaturiertem Cytochrom b_5 , von der im nativen System nicht signifikant verschieden ist. Im Gegensatz zur NADH Cytochrom b_5 Reduktase, deren Hitzedenaturierung zu einem signifikanten Verlust der Benzamidoxim Reduktase Aktivität führte, zeigte sich also die Reaktion von der Anwesenheit des Apoproteins von Cytochrom b_5 unbeeinflusst. Für die Umsetzung im Dreikomponentensystem hat sich hingegen die Intaktheit aller Apoproteine als essentiell erwiesen. Nach Hitzedenaturierung jeder einzelnen Komponente sanken die Umsetzungsraten im Vergleich zum nativen System signifikant ab. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen die zuvor gefundenen unterschiedlichen Charakteristika des Zwei- und Dreikomponentensystems (Clement *et al.*, 2005a; Holtkamp, 2007).

Analoge Resultate konnten durch Austausch der vermutlich beteiligten Hämproteine durch MP8 gezeigt werden. Im Zweikomponentensystem wurde unter Verwendung des Häm-Modells anstelle von Cytochrom b_5 sogar eine gesteigerte Umsetzungsrate im Vergleich zum nativen System gefunden. Im Dreikomponentensystem fiel diese hingegen deutlich ab.

Die Umsetzung im Vergleich zum Zweikomponentensystem konnte durch Zugabe steigender Mengen MP8 anstelle der mikrosomalen dritten Komponente konzentrationsabhängig erhöht werden, was vermutlich auf einen additiven Einfluss des Häms zurückzuführen ist. Die Umsetzungsraten des Dreikomponentensystems konnten jedoch bei weitem nicht erreicht werden. Die MP8 ist demzufolge im Gegensatz zu anderen Cytochrom P450-katalysierten Oxidationsreaktionen (Lombardi *et al.*, 2001) nicht in der Lage, das verantwortliche Protein für die Benzamidoxim Reduktion zu imitieren.

Somit kann nach den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen zum einen die Wechselwirkung aller drei Proteine im Enzymsystem der Benzamidoxim Reduktase als gesichert gelten und zum anderen die alleinige Umsetzungssteigerung der dritten Komponente durch eine mögliche Verunreinigung mit Cytochrom b_5 eindeutig ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus haben die in dieser Arbeit durchgeführten umfangreichen Testungen von gereinigten und rekombinanten Proteinen die Notwendigkeit einer verbesserten Charakterisierung und Aufreinigung des Proteingemischs der mikrosomalen dritten Komponente, um den Kreis der in Frage kommenden Proteine weiter einzugrenzen, deutlich gemacht. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sein.

3.5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass für eine optimale Aktivität eine Wechselwirkung aller drei Komponenten im Enzymsystem Benzamidoxim Reduktase notwendig ist. Ferner konnte geklärt werden, dass dieser verstärkende Einfluss gegenüber dem Zweikomponentensystem nicht allein auf einen additiven Effekt von zusätzlichem Häm durch eine mögliche Verunreinigung der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente mit Cytochrom b_5 zurückzuführen ist. Verantwortlich ist vielmehr eine Interaktion der Apoproteine, da für eine vollständige Umsetzung mit allen drei Komponenten, im Gegensatz zum Zweikomponentensystem, drei intakte Proteine erforderlich sind. Bei der

Umsetzung bei Anwesenheit aller drei Komponenten handelt es sich zudem zweifelsfrei um eine enzymatische Reaktion.

Auf der Suche nach dem neben Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase verantwortlichen dritten Protein konnte die Beteiligung des zuvor in der gereinigten mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente nachgewiesene Cytochrom P450 2A6 an der Benzamidoxim Reduktion eindeutig ausgeschlossen werden, nachdem zuvor die Markerenzymaktivität erfolgreich rekonstituiert wurde.

Auch für rekombinantes Cytochrom P450 3A4 wurde eine erfolgreiche Rekonstitution der Markerenzymaktivität aber keinerlei *N*-reduktive Aktivität gezeigt. Demnach kann die Beteiligung von Cytochrom P450 3A4 an der mikrosomalen Reduktion stickstoffhaltiger Verbindungen ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, ebenso wie die der flavinhaltigen Monooxygenase 3, der NAD(P)H Chinonoxidoreduktase und der Ω -Gluthathion-S-Transferase.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten umfangreichen Testungen von gereinigten und rekombinanten Proteinen haben die Notwendigkeit einer verbesserten Charakterisierung und Aufreinigung des Proteingemischs der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente, um den Kreis der in Frage kommenden Proteine weiter einzugrenzen, deutlich gemacht.

4 CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN MIKROSOMALEN *N*-REDUKTIVEN KOMPONENTE

4.1 EINFÜHRUNG

4.1.1 CHARAKTERISIERUNG VON GEREINIGTEN ENZYMEN

Um die Wirkungsweise eines einzelnen Enzyms oder eines Enzymsystems zu untersuchen, muss es aus dem entsprechenden Gewebe isoliert und damit von den Begleitproteinen, die das entsprechende Enzym beeinflussen können, gereinigt werden (Kornberg, 1990). Der Erfolg dieser Enzymreinigung spiegelt sich in der Zunahme des Verhältnisses der Enzymaktivität zum Gesamtprotein (spezifische Aktivität) und der Abnahme der Zahl der Begleitproteine (Kornberg, 1990).

Die Messung der enzymatischen Aktivität des zu reinigenden Enzyms ist die aussagekräftigste Methode, den Reinigungsverlauf zu verfolgen. Alternativ gibt es aber auch andere analytische Verfahren, wie die Absorptionsmessung bei einer spezifischen Wellenlänge, z. B. 417 nm für Hämgruppen (Smith *et al.*, 1994; Clement *et al.*, 1997) oder 450 nm für den Kohlenmonoxid-Komplex von reduzierten Cytochrom P450 Enzymen (Clement *et al.*, 1997; Omura und Sato, 1964).

Es ist nicht möglich ein Protein absolut homogen zu isolieren. Folglich ist die Reinheit eines Proteins nur indirekt überprüfbar, indem man nachweist, dass ein Protein frei von detektierbaren Verunreinigungen ist (Kornberg, 1990). Die übliche Methode hierfür ist die SDS-Gelelektrophorese (Rhodes und Laue, 1990). Je nach hierbei verwendetem Färbeverfahren werden unterschiedliche Nachweisgrenzen für Verunreinigungen erreicht. Für Coomassie gefärbte Gele werden diese mit 100 ng/Bande (Miller *et al.*, 2006; Chrambach *et al.*, 1967), für Silber gefärbte Gele mit 0,1 bis 1 ng/Bande angegeben (Miller *et al.*, 2006; Merril *et al.*, 1979).

Erscheinen auf einem SDS-Gel mehrere Banden, gilt es zu bestimmen, welche der Banden zu dem Enzym gehört, welches die Reaktion katalysiert. Bei Gemischen, die eine Vielzahl von Proteinen enthalten, kann eine weitere Aufreinigung erforderlich sein. Insbesondere, wenn sich in einer Proteinbande mehrere Proteine ähnlichen Molekulargewichts befinden, kann eine Identifizierung erschwert sein (Bradshaw und Burlingame, 2005). Um die Auflösung zwischen einzelnen Proteinen zu verbessern, entwickelte O'Farrell 1975 eine zweidimensionale Elektrophorese. Mit dieser Methode wird eine Auflösung von bis zu 10000 Proteinen in einer Probe in Form einer Proteinkarte erreicht, weil zusätzlich zum Molekulargewicht eine Auftrennung nach der Ladung der Proteine erfolgt (Dunbar *et al.*, 1990).

Zur Methode der Wahl für die Identifizierung eines oder mehrerer Proteine hat sich die Massenspektrometrie entwickelt (Bradshaw und Burlingame, 2005). Diese erfolgt im Anschluss an die ein- oder zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese. Nach dem Färben eines Gels werden die erhaltenen Banden (eindimensionale SDS-PAGE) bzw. Spots (zweidimensionale SDS-PAGE) herausgeschnitten und das Protein direkt im Gel durch eine Protease verdaut (Baldwin, 2004). Die entstehenden Peptide bilden aufgrund der Sequenzspezifität der verwendeten Protease für jedes Protein ein charakteristisches Gemisch, das mit einem Fingerabdruck vergleichbar ist.

Nach massenspektrometrischer Untersuchung dieses Peptidgemisches ergeben sich drei verschiedene Methoden die gesuchten Proteine zu identifizieren. Die erste bezeichnet man als *Peptide Mass Fingerprinting*. Hierfür werden mit dem erhaltenen Massenspektrum Proteindatenbanken computergestützt durchsucht. Das Protein wird durch Übereinstimmung zwischen den experimentell erhaltenen Peptidmassen und denen mittels eines theoretischen Verdaus jedes Proteins in der Datenbank vorhergesagten identifiziert (Henzel *et al.*, 2003). Frühere Analysen mit relativ kleinen Datenbanken ließen vermuten, dass bereits wenige Peptide, die zu einem Protein zugeordnet werden können, ausreichen, um ein Protein zu identifizieren. Aufgrund der heutigen großen Anzahl von Proteinen in Datenbanken sind die Anforderungen zur Identifizierung von Proteinen gewachsen. Es muss eine größere Anzahl von Peptiden, die zudem einen größeren Anteil der Proteinsequenz abdecken, zugeordnet werden können (Baldwin, 2004). Das *Peptide Mass Fingerprinting* beruht ausschließlich auf der Massenanalyse einzelner Peptide. Die

Masse sagt jedoch nur indirekt etwas über die strukturelle Zusammensetzung der Peptide und somit des Proteins aus. Für eine genauere Analyse misst man nicht mehr nur die Massen der einzelnen Peptide, sondern zusätzlich die ihrer Peptidfragmente (CID = *collision induced decay*) nach Tandem-Massenspektrometrie. Diese zweite Methode der Proteinidentifizierung verdrängt derzeit zunehmend das *Peptide Mass Fingerprinting* als Standardverfahren (Baldwin, 2004). Sie ist die Methode der Wahl bei der Identifizierung von bereits bekannten Proteinen, weil sie auch die Analyse von mehreren Proteinen in einer Probe ermöglicht (Veenstra *et al.*, 2004).

Neue, bisher in keiner Datenbank erfasste Proteine, können damit aber nicht identifiziert werden. Dies gelingt nur mit dem dritten Verfahren, einer *De-Novo-Sequenzierung*, die sich ebenfalls aus dem Tandem-Massenspektrum eines Proteins ableitet. Hierbei wird direkt die gesuchte Aminosäuresequenz anhand bekannter Fragmentierungsregeln rekonstruiert (Baldwin, 2004).

4.1.2 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER MIKROSOMALEN N-REDUKTIVEN KOMPONENTE

Clement *et al.* (1997) reinigten ein Enzymsystem aus Schweinelebermikrosomen, welches in der Lage ist, basische N-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren. Dieses besteht neben Cytochrom b₅ und dessen Reduktase aus einer dritten Komponente, deren eindeutige Identifizierung bis heute nicht möglich war (Clement *et al.*, 2005a).

Diese gereinigte dritte Komponente zeigt gegenüber dem Gewebe, aus dem sie gereinigt wurde, eine erhöhte spezifische N-reduktive Aktivität. Sie liefert nach Reduktion das für Cytochrom P450 charakteristische Kohlenmonoxid-Absorptionsspektrum mit dem Absorptionsmaximum bei 450 nm und ist zudem in der Lage, das CYP2D6-Substrat Dextromethorphan zu demethylieren (Clement *et al.*, 2005a; Friedrich, 2003; Abb. 4.1).

Analysiert man dieses Proteingemisch der mikrosomalen dritten Komponente mittels Gelelektrophorese und färbt das Gel anschließend mit Coomassie, zeigen sich zwei Banden, die nach massenspektrometrischer Analyse mehrere Proteine enthalten (Übersicht, s. Tab. 3.1).

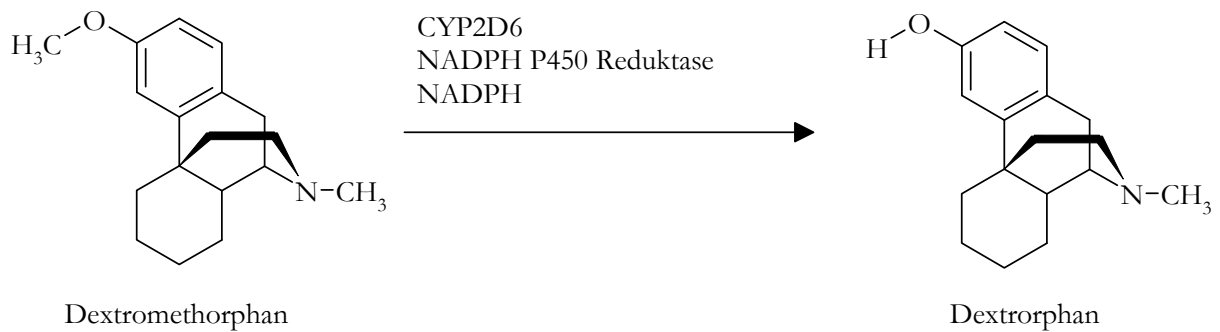


Abb. 4.1 *O*-Demethylierung des CYP2D6-Substrates Dextromethorphan zu Dextrorphan

4.1.3 THEMA UND ZIELSETZUNG

Zur Identifizierung der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente wurde in dieser Arbeit bereits eine Reihe rekombinanter Proteine erfolglos auf ihre *N*-reduktive Aktivität getestet (Kapitel 3). Deshalb sollte die entsprechende Komponente nach literaturbekannter Vorschrift (Clement *et al.*, 1997) gereinigt und die Eigenschaften des Proteins untersucht werden. Hierzu zählen die Benzamidoxim Reduktase Aktivität, die Absorption bei 450 nm und die Dextromethorphan-*O*-Demethylierungsaktivität.

Ziel war es nun, weitere Methoden zu entwickeln, um eine bessere Charakterisierung zu ermöglichen. So sollte mit der empfindlicheren Silberfärbung auf weitere Banden im SDS-Gel geprüft und die Proteine in den vorhandenen Proteinbanden mittels zweidimensionaler Elektrophorese klar voneinander abgetrennt werden.

4.2 METHODEN

4.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

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

4.2.2 ISOLIERUNG DER *N*-REDUKTIVEN KOMPONENTE AUS SCHWEINELEBER-MIKROSOMEN

4.2.2.1 Gewinnung von Schweinelebermikrosomen

Die in dieser Arbeit verwendeten Schweinelebern stammten aus weiblichen oder kastrierten Schweinen (Pietraint, 7 Monate alt) und wurden direkt nach Tötung und Ausbluten des Tieres entnommen.

Die Mikrosomen wurden nach bekannten Methoden mittels Ultrazentrifugation erhalten (Clement *et al.*, 1996; Omura und Sato, 1964) und nach Aliquotierung bei – 80 °C gelagert.

4.2.2.2 Isolierung der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente

Die Isolierung der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente erfolgte leicht modifiziert nach der Vorschrift von Clement *et al.* (1997) mittels hydrophober Interaktionschromatographie und anschließender präparativer HPLC. Ausgangsmaterial waren durch Ultrazentrifugation gewonnene Schweinelebermikrosomen (Kapitel 4.2.2.1). Diese wurden nach Solubilisation über eine Octyl-Sepharose CL 4B[®]-Säule (Amersham, Freiburg) gegeben und mittels eines Ionenstärke- und Detergenzkonzentration-Stufengradienten eluiert. Anhand von Elutionsprofilen bei 280 und 417 nm sowie durch Absorptionsmessung bei 450 nm der nach Reduktion und Kohlenmonoxidzugabe erhaltenen Differenzspektren wurde die *N*-reduktive Fraktion isoliert. Es folgte eine

Einkonzentrierung in Ultrazentrifugationszellen und eine Umpufferung über NAP[®]-Säulen (Amersham, Freiburg).

Die nach der hydrophoben Interaktionschromatographie erhaltene Cytochrom P450-haltige Fraktion wurde mithilfe präparativer HPLC durch Anionenaustausch an Fractogel[®] EMD TMAE (Merck, Darmstadt) weiter aufgereinigt. Die gewünschte Fraktion wurde ohne Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial eluiert, ein kleiner Teil unterlag einer schwachen Retention (Behrens, 1999). Die Fraktion wurde einkonzentriert, umgepuffert und enthaltenes Detergenz mittels Detergent-Out[™] (Merck, Darmstadt) entfernt.

4.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER MIKROSOMALEN *N*-REDUKTIVEN KOMPONENTE

4.2.3.1 Benzamidoxim Reduktase Aktivitätsbestimmung

Zur Rekonstitution der Enzymaktivität wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 5 µg gereinigte mikrosomale Komponente, 200 pmol Cytochrom b₅, 0,05 U NADH Cytochrom b₅ Reduktase und ein Zusatz von 40 µM DLPC wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 500 µM Benzamidoxim und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 1 mM NADH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 µl. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

4.2.3.2 CYP2D Markerenzymaktivitätsbestimmung: Dextromethorphan-*O*-Demethylierung

Es wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 5 µg gereinigte mikrosomale Komponente, 0,1 U rekombinante NADPH Cytochrom P450 Reduktase und ein Zusatz von 3,3 mM Magnesiumchlorid sowie 40 µM DLPC wurden in 40 mM

Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 1 mM Dextromethorphan und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 2 mM NADPH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 µl. Nach 60 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 g abgetrennt. Gebildetes Dextrorphan wurde mittels der in Kapitel 4.2.4. beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

4.2.4 HPLC-ANALYTIK ZUR TRENNUNG VON DEXTROMETHORPHAN UND DEXTRORPHAN

Die HPLC-Analytik erfolgte nach Friedrich (2003) unter Verwendung des folgenden HPLC-Systems:

| | |
|--------------------|--|
| HPLC-Pumpe: | Waters 600 Pumpe mit Controller (Waters, Milford, CT, USA) |
| Detektor: | Waters Fluoreszenzdetektor 474 (Waters, Milford, CT, USA) |
| Autosampler: | Waters WISP 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA) |
| Integrator: | EZChromElite™ Aufnahme und Auswertesoftware Version 2.8.3 (EZChromElite SS420x Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA) |
| Stationäre Phase: | Symmetry™ C18 5 µm, 250 × 4 mm (Waters, Milford, CT, USA) mit Waters Guard Column C18 (Waters, Milford, CT, USA) |
| Mobile Phase: | 70 % 0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5; eingestellt mit Eisessig 30 % Acetonitril (v/v) |
| Flussrate: | 0,9 ml/min |
| Detektion: | Fluoreszenz, Ex λ = 227 nm, Em λ = 311 nm |
| Injektionsvolumen: | 10 µl |

Retentionszeiten: Dextrorphan $4,4 \pm 0,1$ min
Dextromethorphan $10,7 \pm 0,1$ min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 μ m Sartorius® Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit Dextrorphan in definierten Konzentrationen (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 μ M) im Fließmittel gelöst. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r > 0,998$). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Dextrorphan wurde in 40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst, den Inkubationsansätzen 0,1 mg/ml hitzedenaturiertes Protein sowie 1 mM Dextromethorphan zugefügt. Diese wurden 65 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert, mit der entsprechenden Menge Methanol abgestoppt und nach Zentrifugation bei 10000 *g* anschließend mittels HPLC quantifiziert. Es wurde eine Wiederfindungsrate von 100 ± 16 % ermittelt.

4.2.5 PROTEINANALYTIK DER MIKROSOMALEN *N*-REDUKTIVEN KOMPONENTE

4.2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach dem von Laemmli (1970) beschriebenen diskontinuierlichen Verfahren durchgeführt.

Eine Übersicht über die zur Herstellung der Gele, Vorbereitung der Proben und Durchführung der Elektrophorese verwendeten Puffer gibt Tab. 4.1.

Die verwendete Acrylamidlösung bestand aus 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander hergestellt (Zusammensetzung s. Tab. 4.2) und zwischen die Glasplatten des Gelsystems pipettiert. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Tab. 4.1 Puffer für die SDS-PAGE

| Sammelgelpuffer, pH 6,8 | | Trenngelpuffer, pH 8,8 | |
|------------------------------------|-------------|--------------------------|---------------|
| Tris-Base | 0,25 M | Tris-Base | 0,75 M |
| SDS | 0,2 % (w/v) | SDS | 2 % (w/v) |
| <i>bei 4 °C gelagert</i> | | <i>bei 4 °C gelagert</i> | |
| Elektrophoresepuffer | | Probenauftragspuffer | |
| Tris-Base | 25 mM | Glycerol 87 % | 10 % (v/v) |
| Glycin | 192 mM | SDS | 2 % (w/v) |
| SDS | 0,1 % (w/v) | β-Mercaptoethanol | 5 % (w/v) |
| <i>bei Raumtemperatur gelagert</i> | | Bromphenolblau | 0,001 % (w/v) |
| | | Trenngelpuffer pH 8,8 | |
| | | <i>bei 4 °C gelagert</i> | |

Tab. 4.2 Zusammensetzung der SDS-Gele mit einer Dicke von 1,5 mm

| Trenngel 12 % | | Sammelgel 6 % | |
|-----------------------|---------|-----------------------|--------|
| Acrylamidlösung | 12,6 ml | Acrylamidlösung | 1,7 ml |
| Trenngelpuffer | 15,0 ml | Sammelgelpuffer | 5,0 ml |
| <i>Aqua bidest.</i> | 2,7 ml | <i>Aqua bidest.</i> | 3,3 ml |
| 20 % (w/v) APS-Lösung | 100 µl | 20 % (w/v) APS-Lösung | 30 µl |
| TEMED 30 | 30 µl | TEMED 30 | 10 µl |

Die Proteinproben wurden je nach Reinheitsgrad mit Probenauftragspuffer auf einen Proteingehalt von 5 – 20 µg pro Bahn, ggf. nach vorheriger Aufkonzentrierung mittels MicroconTM YM10 (Millipore, Schwalbach), eingestellt

und ebenso wie der Größenmarker (Low Molecular Weight Standard, Amersham, Freiburg) für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Dieser bestand aus den folgenden Proteinen: Phosphorylase (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa). Vor dem Probenauftrag wurden die Proben 5 Minuten bei 10000 g zentrifugiert.

Bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA wurden die Proteine im Sammelgel aufkonzentriert. Nach Durchlauf des Sammelgels wurde die Stromstärke auf 50 mA erhöht und die Proteine innerhalb einer ca. 10 cm langen Laufstrecke aufgetrennt. Die Temperatur während der Trennung betrug 10 °C.

4.2.5.1.1 Coomassiefärbung

Das Gel wurde zunächst zwei Stunden in Coomassielösung gefärbt und anschließend über Nacht entfärbt (Tab. 4.3).

Tab. 4.3 Lösungen für die Coomassiefärbung und -entfärbung von SDS-Gelen

| Coomassielösung | | Entfärbelösung | |
|--------------------------------|------------|----------------|--------------|
| Coomassie® Brilliant Blue R250 | 2 % (w/v) | Eisessig | 12,5 % (w/v) |
| Eisessig | 10 % (w/v) | Isopropanol | 12,5 % (w/v) |
| Isopropanol | 25 % (w/v) | | |

4.2.5.1.2 Silberfärbung

Zur Färbung wurde der Bio-Rad Silver Staining Kit (Bio-Rad, München) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Bei den Gelen, die im Anschluss massenspektrometrisch analysiert werden sollten, wurde jedoch auf den Zusatz von Form- sowie Glutardialdehyd verzichtet.

4.2.5.1.3 Molekulargewichtsbestimmung

Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurden die R_f -Werte für die einzelnen Banden des Molekulargewichtsmarkers gemessen, gegen den jeweiligen Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen und über lineare Regression eine Geradengleichung bestimmt. Die Berechnung der Molekulargewichte der Proteinbanden in den Proben erfolgte über die so ermittelte Kalibriergerade.

4.2.5.2 Elektrophorese-Automat Experion™

Mit dem Elektrophorese-Automat Experion™ (Bio-Rad, München) können innerhalb kurzer Zeit Proteinproben unter Verwendung geringster Mengen von Probenmaterial analysiert werden. Analog zum Elektrophoreseegel werden Chips (Experion Pro260 Chip®, Bio-Rad, München) mit Proteinproben beladen und die Proteine dieser Proben in dem Automaten ähnlich einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Trennung erfolgt in einem elektrokinetischen Fluss, in einer Gelmatrix mit Siebeffekt. Detektiert werden die Proteine über eine Fluoreszenzmarkierung, deren Emission nach Anregung über einen Laserlichtimpuls gemessen wird. Durch die Verwendung von Molekülgrößenmarkern, die ebenfalls in jedem Chip als Bezugsgröße aufgetrennt werden, erfolgt die Berechnung der Molekülgröße. Als Auswertung erhält man ein Elektropherogramm, das in einer Peak-Ansicht alle Proteinbanden anzeigt (Neusser, 2004).

Die Probenvorbereitung und Beladung des Chips erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

4.2.5.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) ermöglicht die Trennung komplexer Proteingemische in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Die Separation in der ersten Dimension erfolgt durch isoelektrische Fokussierung aufgrund der Ladung der Proteine. Als zweite Dimension schließt sich eine SDS-

PAGE an, bei der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Diese verläuft senkrecht zu den nach Ladung aufgetrennten Proteinen.

4.2.5.3.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die IEF wurden Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) verwendet. Die Gradienten hatten einen pH-Bereich von 3 – 10 und eine Länge von 11 cm (Immobiline Dry Strip, Amersham, Freiburg). Die Rehydratisierung der IPG-Streifen und das Auftragen der Proben erfolgten in einer dafür vorgesehenen Rehydratisierungskassette. Die Proben wurden mit 200 µl Rehydrierungslösung (Zusammensetzung s. Tab. 4.4) vermischt und jeweils in die Mitte einer Quellkammer pipettiert.

Die Gelstreifen mussten anschließend so aufgelegt werden, dass sich ein luftblasenfreier Flüssigkeitsfilm unter dem Gel ausbilden konnte. Die Streifen wurden mit Paraffinöl überschichtet und über Nacht in der Kassette inkubiert.

Tab. 4.4 Rehydrierungslösung für schwer lösliche Proteine

| Rehydrierungslösung | |
|---------------------|---------------|
| Harnstoff | 8 M |
| CHAPS | 0,5 % (w/v) |
| DTT | 20 mM |
| IPG-Puffer | 0,5 % (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,001 % (w/v) |

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei konstant 20 °C mit einer Stromstärke von maximal 50 µA pro Streifen nach dem in Tab. 4.5 angegebenen Programm mit dem Multiphor II System (Amersham, Freiburg). Unter die Elektroden wurden mit *Aqua bidest.* angefeuchtete Filterpapiere gelegt und die Gele mit Paraffinöl überschichtet.

Tab. 4.5 Programm für die isoelektrische Fokussierung

| Phase | U/V | t/h:min | kVh | Spannungsverlauf |
|-------|------|---------|-------|-------------------|
| 1 | 200 | 0:01 | 0,001 | Stufe |
| 2 | 3500 | 1:30 | 2,9 | Linearer Gradient |
| 3 | 3500 | 2:30 | 8,75 | Stufe |

4.2.5.3.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Um einen optimalen Proteintransfer von der ersten in die zweite Dimension zu gewährleisten, mussten die Gelstreifen in einem Äquilibrierungsschritt mit einem SDS-haltigen Puffer gesättigt werden, welcher außerdem DTT zur Reduzierung der Disulfidbrücken enthält. Die Gelstreifen wurden in verschließbare Kunststoffröhrchen überführt und für 15 Minuten in 15 ml Äquilibrierungspuffer (Zusammensetzung s. Tab. 4.6) geschwenkt.

Tab. 4.6 Äquilibrierungspuffer

| SDS-Äquilibrierungspuffer | |
|---------------------------|---------------|
| Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) | 50 mM |
| Harnstoff | 6 M |
| Glycerol (87 %) | 30 % (v/v) |
| SDS | 2 % (w/v) |
| Bromphenolblau | 0,001 % (w/v) |
| DTT | 1 % (w/v) |

bei -20 °C gelagert, DTT erst kurz vor Gebrauch zugegeben

Für die Trennung in der zweiten Dimension wurde das Ettan Dalt II System verwendet (Amersham, Freiburg). Die Durchführung der SDS-PAGE ist in Kapitel

4.2.5.1 beschrieben, es wurde jedoch nur ein Trenngel gegossen (Zusammensetzung s. Tab. 4.7).

Tab. 4.7 Zusammensetzung der SDS-Gele für die 2D-Gelelektrophorese (1,0 mm)

| | |
|--------------------------|---------|
| Trenngel 12 % | |
| Acrylamidlösung (30,8 %) | 20,9 ml |
| Trenngelpuffer | 24,9 ml |
| <i>Aqua bidest.</i> | 4,5 ml |
| 20 % (w/v) APS-Lösung | 125 µl |
| TEMED 30 | 50 µl |

Statt eines Probenauftrags wurde der äquilibrierte und mit Elektrophoresepuffer abgspülte Gelstreifen mit der Gelseite nach oben zwischen die Glasplatten auf die obere Gelkante geschoben. Zum Fixieren der Gelstreifen wurde erhitzte Agaroselösung [0,5 % (w/v) mit 0,001 % Bromphenolblau (w/v) in Elektrophoresepuffer] verwendet.

Die Stromstärke für die Trennung der Proteine betrug 24 mA pro Gel, die Laufstrecke ca. 17 cm. Die Temperatur während der Trennung betrug 15 °C. Die Färbung erfolgte wie unter 4.2.5.1.1 und 4.2.5.1.2 beschrieben.

4.2.5.4 16-BAC-SDS-PAGE

Die 16-BAC-SDS-Gelelektrophorese ist eine Sonderform der zweidimensionalen Gelelektrophorese für schwer lösliche Membranproteine, die 1989 von Macfarlane beschrieben wurde. Hierbei wird bei der Auftrennung in der ersten Dimension mit einem „inversen“, diskontinuierlichen System gearbeitet unter Verwendung des

kationischen Detergenzes Benzyltrimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC), eines Sammelgels bei pH 4,1 und eines Trenngels bei pH 2,1 (Hartinger *et al.*, 1996). Ebenso wie bei der SDS-PAGE werden die Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Die Migrationseigenschaften der Proteine im sauren 16-BAC-System sind von denen des basischen SDS Systems hinreichend verschieden, um eine Auflösung in der zweiten Dimension zu erreichen (Macfarlane, 1989).

4.2.5.4.1 Erste Dimension: 16-BAC-PAGE

Eine Übersicht über die zur Vorbereitung der Proben und Durchführung der Elektrophorese verwendeten Puffer gibt Tab. 4.8.

Die verwendete Acrylamidlösung bestand aus 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander hergestellt (Zusammensetzung s. Tab. 4.9) und zwischen die Glasplatten des Gelsystems pipettiert.

Tab. 4.8 Puffer für die 16-BAC-PAGE (1,0 mm Gel)

| Elektrophoresepuffer | | Probenauftragspuffer | |
|------------------------------------|--------|---------------------------------------|----------|
| 16-BAC | 2,5 mM | Harnstoff | 4,5 g |
| Glycin | 150 mM | 16-BAC | 1,0 g |
| Phosphorsäure | 50 mM | Glycerol 87 % | 1,0 ml |
| <i>bei Raumtemperatur gelagert</i> | | DTT 1,5 M | 0,5 ml |
| | | <i>Aqua bidest.</i> | ad 10 ml |
| | | <i>bei 60 °C Probe solubilisieren</i> | |

Tab. 4.9 Zusammensetzung der 16-BAC-Gele mit einer Dicke von 1,0 mm

| Trenngel 7,5 % | | Sammelgel 4 % | |
|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| Acrylamidlösung | 10,0 | Acrylamidlösung | 1,33 |
| Harnstoff | 7,2 g | Harnstoff | 1,0 g |
| 300 mM K-phosphatpuffer | 10,0 | 500 mM K-phosphatpuffer | 2,5 ml |
| Bisacrylamid 1,7 % (w/v) | 1,4 ml | Bisacrylamid 1,7 % (w/v) | 1,38 |
| Ascorbinsäure 80 mM | 2,0 ml | Ascorbinsäure 80 mM | 0,5 ml |
| Eisen(II)sulfat 5 mM | 64 µl | Eisen(II)sulfat 5 mM | 8,5 µl |
| 16-BAC 250 mM | 400 µl | 16-BAC 250 mM | 70 µl |
| Wasserstoffperoxid | 1,6 ml | Wasserstoffperoxid | 500 µl |

Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Die Proteinproben wurden je nach Reinheitsgrad mit Probenauftragspuffer auf einen Proteingehalt von 25 – 100 µg pro Bahn, ggf. nach vorheriger Aufkonzentrierung mittels MicroconTM YM10 (Millipore, Schwalbach), eingestellt und ebenso wie der Größenmarker (Low Molecular Weight Standard, Amersham, Freiburg) für 5 Minuten bei 60 °C inkubiert. Vor dem Probenauftrag wurden die Proben 5 Minuten bei 10000 g zentrifugiert.

Die Elektrophorese fand zur Kathode hin statt. Bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA wurden die Proteine im Sammelgel aufkonzentriert. Nach Durchlauf des Sammelgels wurde die Stromstärke auf 80 mA erhöht und die Proteine innerhalb einer ca. 15 cm langen Laufstrecke aufgetrennt. Die Temperatur während der Trennung betrug 25 °C. Die Färbung mit Coomassie Blue erfolgte wie unter 4.2.5.1.1 beschrieben.

4.2.5.4.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die verwendete Acrylamidlösung bestand aus 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander hergestellt (Zusammensetzung s. Tab. 4.10) und zwischen die Glasplatten des Gelsystems pipettiert.

Tab. 4.10 Zusammensetzung der SDS-Gele für die 16-BAC-SDS-2D-Gelelektrophorese (1,5 mm)

| Trenngel 10 % | | Sammelgel 4 % | |
|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
| Acrylamidlösung | 16,2 ml | Acrylamidlösung | 3,25 ml |
| Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) | 12,5 ml | Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) | 2,08 ml |
| SDS 10 % (w/v) | 0,5 ml | SDS 10 % (w/v) | 250 µl |
| <i>Aqua bidest.</i> | 20,5 ml | <i>Aqua bidest.</i> | 19,3 ml |
| 10 % (w/v) APS-Lösung | 250 µl | 10 % (w/v) APS-Lösung | 125 µl |
| TEMED 30 | 16,5 µl | TEMED 30 | 8,8 µl |

Um einen optimalen Proteintransfer von der ersten in die zweite Dimension zu gewährleisten, mussten die Proteine für mindestens 60 Minuten unter mehrfachem Wechseln der Fixierlösung (35 % Isopropanol, 10 % Eisessig) im Gel fixiert und anschließend in einem Äquilibrationsschritt mit einem 100 mM Tris-Puffer pH 6,8 gesättigt werden.

Die Proteinbahnen wurden ausgeschnitten und die erhaltenen Gelstreifen auf das SDS-Gel überführt, so dass sich die Kanten der beiden Gele komplett berührten. Ferner wurde ein Stück Filterpapier, das mit dem vorbereiteten Molekulargewichtsmarker (wie in Kapitel 4.2.5.1 beschrieben) getränkt war, auf der Kante positioniert.

Bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA wurden die Proteine im Sammelgel aufkonzentriert. Nach Durchlauf des Sammelgels wurde die Stromstärke auf 80 mA

erhöht und die Proteine innerhalb einer ca. 10 cm langen Laufstrecke aufgetrennt. Die Temperatur während der Trennung betrug 25 °C.

Die Färbung erfolgte wie unter 4.2.5.1.1 und 4.2.5.1.2 beschrieben.

4.2.5.5 Massenspektrometrische Analyse

Ausgewählte Proteinbanden der SDS-PAGE wurden manuell mithilfe eines Skalpell unter einem Abzug ausgeschnitten, um Keratin-Kontamination zu vermeiden. Die Proteine wurden mit DTT reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und mit Trypsin verdaut (Edmondson *et al.*, 2002). Die Untersuchungen wurden von Dr. Richard Jones (Division of Systems Toxicology, FDA/NCTR, Jefferson, AR, USA) mittels nano LC/MS/MS auf einem LCQ Deca XP Plus ion trap Massenspektrometer (Thermo, San Jose, CA, USA) durchgeführt. MS/MS wurde für die vier größten Ionen jedes MS Scans durchgeführt

Die Daten wurden gegen die NCBI Protein Datenbank mithilfe der Mascot Suchmaschine (Matrix Science, London, England) verglichen.

4.3 ERGEBNISSE

4.3.1 CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN MIKROSOMALEN *N*-REDUKTIVEN KOMPONENTE

Die mikrosomalen *N*-reduktiven Komponenten werden im Folgenden mit 3rd abgekürzt. Weil mehrere Chargen untersucht wurden, sind diese zusätzlich nummeriert. Die Chargen (1) bis (8) lagen im Arbeitskreis vor. Die Chargen (9) und (10) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit isoliert.

4.3.1.1 Benzamidoxim Reduktase Aktivitätsbestimmung

Von den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Chargen der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente wurde die Benzamidoxim Reduktase Aktivität, wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben, bestimmt und mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Unter identischen Bedingungen, insbesondere unter Verwendung derselben Chargen Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase, wurden alle vorhandenen zuvor gereinigten Chargen inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.11 dargestellt.

Die gemessenen Umsetzungsraten für die Reduktion von Benzamidoxim wiesen je nach eingesetzter Charge der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente große Unterschiede zwischen $0,3 \pm 0,1$ (3^{rd} (5)) und $24,7 \pm 1,4$ (3^{rd} (9)) nmol Benzamidin/(min mg) auf. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigten Präparationen (3^{rd} (9), 3^{rd} (10)) zeigten eine im Vergleich sehr gute Aktivität.

4.3.1.2 Cytochrom P450 Gehaltsbestimmung

Der Cytochrom P450 Gehalt sowohl der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente als auch weiterer bereits vorhandener Chargen wurde unter den in 2.2.3.1.2 beschriebenen Bedingungen bestimmt und die Ergebnisse in Tab. 4.11 zusammengefasst.

Für die, wie unter 4.2.2.2 beschriebenen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigten Präparationen (3^{rd} (9), 3^{rd} (10)) konnte kein Cytochrom P450 Gehalt detektiert werden, wobei die Nachweisgrenze mit 11 pmol/ml bestimmt wurde. Bei einem Proteingehalt von 0,8 mg/ml (Bestimmung s. Kapitel 2.2.3.1.1) für 3^{rd} (9) und 3^{rd} (10) ergibt sich damit ein maximaler spezifischer Cytochrom P450 Gehalt von 13,8 pmol/mg.

Tab. 4.11 Charakterisierung der mikrosomalen N-reduktiven Komponente

| Charge 3 rd | Benzamidoxim Reduktase Aktivität | Cytochrom P450 Gehalt | CYP2D Aktivität |
|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | nmol Benzamidin/(min mg) | nmol P450/mg | nmol Dextrorphan/(min mg) |
| (1) | 10,6 ± 4,0 | 2,72 | 63,0 ± 11,0 ^c |
| (2) | 0,4 ± 0,1 | 2,55 | nd ^a |
| (3) | 17,3 ± 2,2 | nd ^a | nd ^a |
| (4) | 2,0 ± 0,2 | 2,86 | nd ^a |
| (5) | 0,3 ± 0,1 | 0,61 | nd ^a |
| (6) | 4,2 ± 0,4 | nd ^a | nd ^a |
| (7) | 4,4 ± 0,6 | 1,73 | nd ^a |
| (8) | 2,1 ± 0,1 | ND ^b | nd ^a |
| (9) | 24,7 ± 1,4 | ND ^b | 2,9 ± 0,3 |
| (10) | 8,7 ± 1,4 | ND ^b | 3,2 ± 0,1 |

^aNicht bestimmt; ^bNicht detektierbar, <13,8 pmol/mg; ^cFriedrich, 2003

Die Durchführung der Inkubationen ist in Kapitel 4.2.3.1 und 4.2.3.2 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 und Dextrorphan mittels der in Kapitel 4.2.4 beschriebenen HPLC-Analytiken quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Durchführung der Cytochrom P450 Gehaltsbestimmung ist in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben.

4.3.1.3 Dextromethorphan-*O*-Demethylierung

Des Weiteren wurde zur Charakterisierung der gereinigten Proteine die CYP2D Marker-enzymaktivität bestimmt. Die Fähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente, die Dextromethorphan-*O*-Demethylierung zu katalysieren, wurde untersucht (Kapitel 4.2.3.2) und mittels der in Kapitel 4.2.4 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tab. 4.11 dargestellt.

Im Gegensatz zu einer zuvor gereinigten Charge der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente, die bei einer hohen Benzamidoxim Reduktase Aktivität eine ebenfalls hohe CYP2D Markerenzymaktivität zeigte (3rd(1), Friedrich, 2003), konnten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigten Präparationen (3rd(9), 3rd(10)) nur wenig Dextromethorphan *O*-demethylieren. Die gemessenen Umsatzraten betragen 4,5 % (3rd(9)) bzw. 5,0 % (3rd(10)) der zuvor gemessenen CYP2D Markerenzymaktivität.

4.3.2 PROTEINANALYTIK

4.3.2.1 SDS-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Reinigungsverlaufes der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, wie in Kapitel 4.2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Nach Coomassie-Färbung (4.2.5.1.1) wurde das in Abb. 4.2 dargestellte Bild erhalten.

Die Bestimmung der Molekulargewichte ist in Kapitel 4.2.5.1.3 beschrieben. Eine Übersicht über die ermittelten Molekulargewichte gibt Tab. 4.12.

Alle untersuchten Chargen der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente zeigten die zwei charakteristischen, nicht klar voneinander trennbaren Banden bei 54 – 55 und 61 – 64 kDa (Clement *et al.*, 1997). Darüber hinaus waren sie weitgehend elektrophoretisch rein.

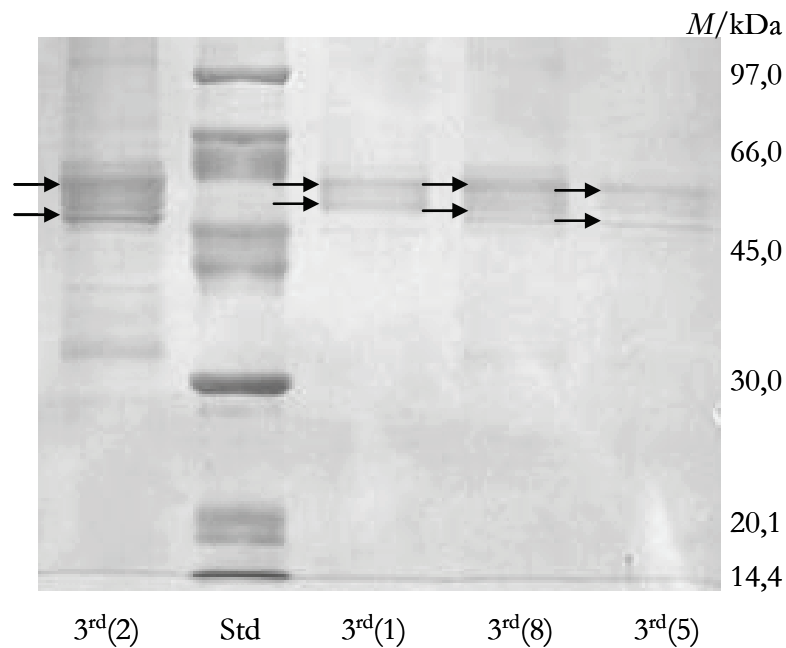


Abb. 4.2 Überprüfung der Reinheit der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung

Std = Molekulargewichtsstandard (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa)

3rd(1) bis 3rd(8) = unterschiedliche Chargen der gereinigten mikrosomalen Komponente, jeweils 5 μ g

Zur Erhöhung der Sensitivität wurden mehrere Chargen der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente, inklusive derer, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung (4.2.5.1.2) untersucht.

Wie in Abb. 4.3 zu erkennen ist, sind zusätzlich zu den beiden im Coomassie-Gel sichtbaren Banden noch einige weitere zu erkennen.

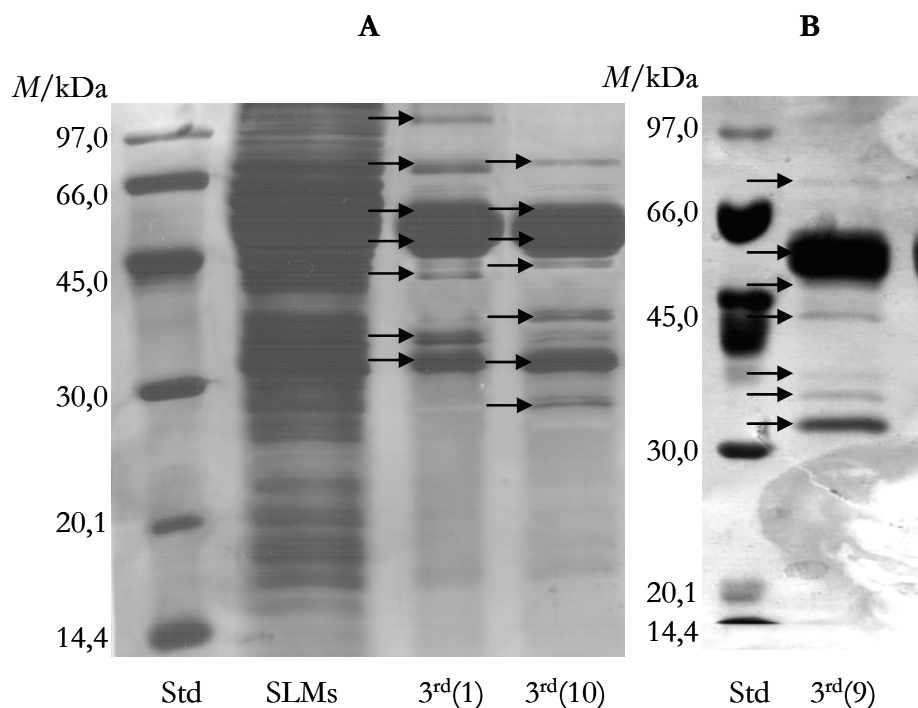


Abb. 4.3 Überprüfung der Reinheit der mikrosomalen N-reduktiven Komponente durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung, A: zuvor gereinigte Komponente (1) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierte Komponente (10), B: im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierte Komponente (9)

Std = Molekulargewichtsstandard (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa)

3rd(1) bis 3rd(10) = unterschiedliche Chargen der gereinigten mikrosomalen Komponente, jeweils 5 μ g

SLMs = Schweinelebermikrosomen, 20 μ g

Mithilfe der Silberfärbung konnten sowohl für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Chargen (*3rd(9)*, Gel **B** und *3rd(10)*, Gel **A**) als auch für die zuvor gereinigte hoch aktive und vollständig charakterisierte Charge (*3rd(1)*, Gel **A**) bis zu sechs weitere Banden neben den beiden bekannten sichtbar gemacht werden (Tab. 4.12).

In allen drei getesteten Chargen waren 4 zusätzliche Banden bei 68 – 78 kDa, 48 – 51 kDa, 39 – 40 kDa und 36 – 37 kDa vorhanden.

Tab. 4.12 Errechnete Molekulargewichte der für die einzelnen Chargen mikrosomaler N-reduktiver Komponente im SDS-Gel sichtbaren Proteinbanden

| Charge 3 rd | M/kDa |
|------------------------|--|
| (1) | 88; 68; 64; 55; 50; 40; 37 ^b bzw. 63; 57 ^a |
| (2) | 62; 56 ^a |
| (5) | 61; 55 ^a |
| (8) | 63; 58 ^a |
| (9) | 78; 61; 54; 48; 39; 36; 35 ^b |
| (10) | 75; 63; 54; 51; 44; 40; 37; 31 ^b |

^aCoomassie gefärbtes Gel, Abb. 4.2

^bSilber gefärbtes Gel, Abb. 4.3

Die Berechnung der Molekulargewichte ist in Kapitel 4.2.5.1.3 beschrieben.

4.3.2.2 Elektrophorese-Automat Experion™

Für die in Tab. 4.11 aufgeführten Chargen (1) – (10) der mikrosomalen N-reduktiven Komponente wurde eine Reinheitsüberprüfung mittels des Elektrophorese-Automaten Experion™ (4.2.5.2) durchgeführt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind beispielhaft an dem Elektropherogramm der Charge (1) in Abb. 4.4 dargestellt.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, konnten in der gereinigten Fraktion noch 17 Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts detektiert werden, wobei die mit * gekennzeichneten Peaks interne Standards waren. Von den verbleibenden 15 Proteinen, deren Molekulargewichte durch Kalibrierung mit dem Molekulargewichtsmarker zwischen 11,2 und 103,6 kDa ermittelt wurden, war keine ausreichende Auftrennung möglich.

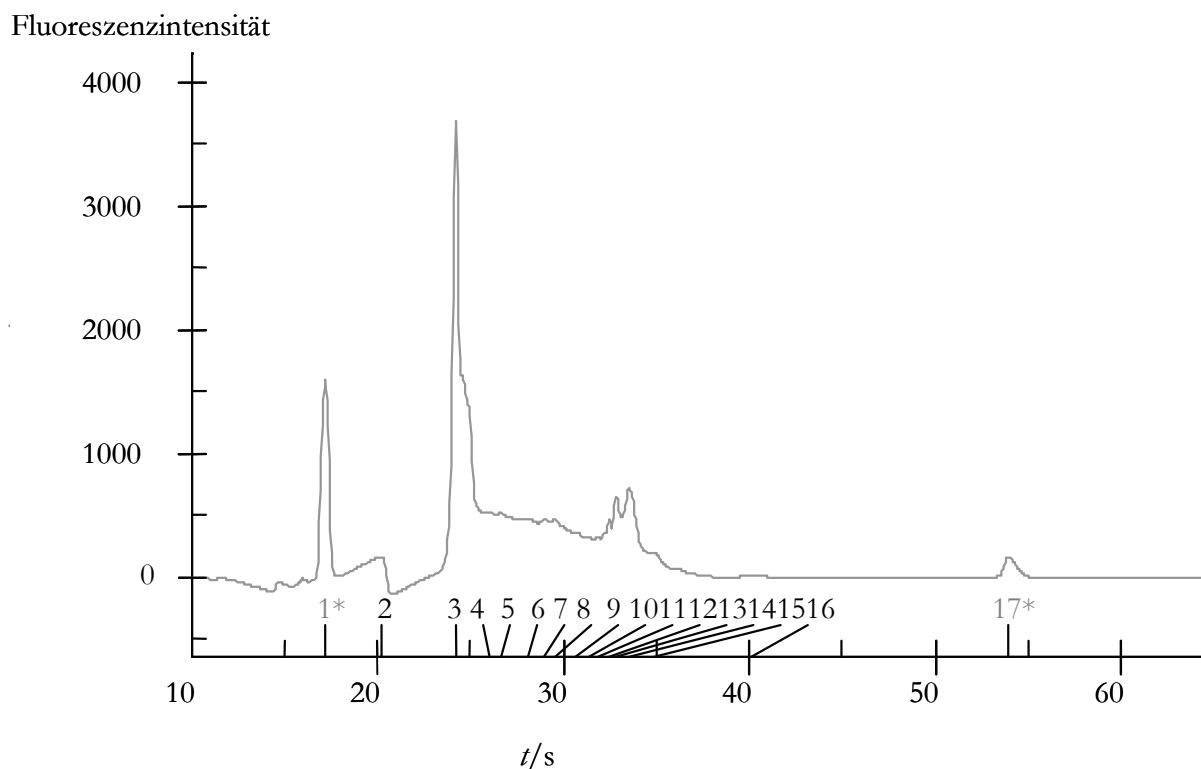


Abb. 4.4 Elektropherogramm der mikrosomalen N-reduktiven Komponente 3^d(1)

Die Durchführung für die Aufnahme der Elektropherogramme mittels des Elektrophorese-Automaten ExperionTM ist in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben.

4.3.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Verbesserung der Auflösung der aufgetrennten Proteine, insbesondere derer, die sich in der breiten 55 – 63 kDa Bande befinden, wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese wie unter 4.2.5.3 beschrieben durchgeführt.

Während der isoelektrischen Fokussierung konnte jedoch keine Auftrennung der Proteine gemäß ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte erreicht werden. Im Gel, das nach anschließender SDS-PAGE und Silberfärbung erhalten wurde, zeigten sich wenige verschmierte Proteinbanden (Abb. nicht gezeigt).

4.3.2.4 16-BAC-SDS-Gelelektrophorese

Zur verbesserten Auflösung von Membranproteingemischen kann eine Auftrennung aufgrund von unterschiedlichem Verhalten in sauren und basischen Systemen, wie es in der 16-BAC-SDS-Gelelektrophorese (4.2.5.4) durchgeführt wird, nützlich sein.

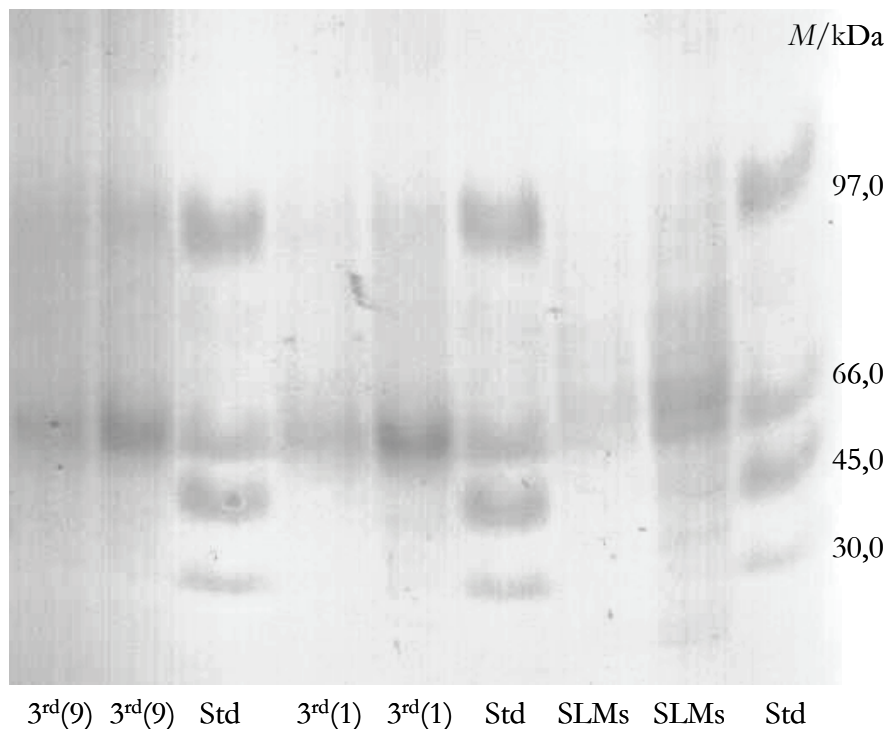


Abb. 4.5 Überprüfung der Reinheit der N-reduktiven Komponente durch 16-BAC-PAGE als erste Dimension für die 16-BAC-SDS-2D-PAGE

3rd(9) = im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnene Charge N-reduktive Komponente, 25 (linke Bahn) bzw. 50 μ g (rechte Bahn)

Std = Molekulargewichtsstandard (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa), wobei 20,1 und 14,4 kDa nicht mehr sichtbar sind

3rd(1) = zuvor gereinigte Charge N-reduktive Komponente, 25 (linke Bahn) bzw. 50 μ g (rechte Bahn)

SLMs = Schweinelebermikrosomen, 50 (linke Bahn) bzw. 100 μ g (rechte Bahn)

Das nach der Auftrennung mittels 16-BAC-PAGE (4.2.5.4.1) erhaltene Gel ist in Abb. 4.5 dargestellt.

In der ersten Dimension war für alle Proteine die Auftrennung in Proteinbanden zu erkennen, wenn auch deutlich unschärfer als in einem „klassischen“ SDS-PAGE. Nach Auftrennung in der zweiten Dimension konnte aber erneut kein aussagekräftiges Gel erhalten werden. Die Coomassie-Färbung lieferte mehrere horizontale, über die gesamte Gelbreite verschmierte Proteinbanden (ohne Abbildung).

4.3.2.5 LC/MS-Analytik der Proteinspots

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, gewonnenen mikrosomalen *N*-reduktiven Komponenten wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert (Kapitel 4.2.5.1). Im Anschluss erfolgte eine massenspektrometrische Analyse. Hierfür wurden die in 4.3.2.1 beschriebenen 7 – 8 Proteinspots mit Skalpellenschnitten ausgeschnitten und diese nach Reduktion, Alkylierung und Trypsin-Verdau der LC/MS-Analytik unterworfen (4.2.5.5).

Die erhaltenen Massenfragmente wurden gegen die NCBI Datenbank verglichen und dabei die vorhandenen Proteine identifiziert. Die Proteine, die mit der größten Wahrscheinlichkeit in den Banden vorhanden sind, besitzen den höchsten Mascot Score. In Tab. 4.13 sind für jeden Proteinspot von 3rd(9) die mit der jeweils größten Wahrscheinlichkeit vorhandenen Proteine aufgelistet.

Es wurden zwei unterschiedliche Cytochrom P450 Isoenzyme identifiziert, CYP2A19 und CYP2D25, welche bereits in früheren Analysen gefunden wurden (s. Kapitel 3). Des Weiteren konnten die NADH Cytochrom b_5 Reduktase, die AcylCoA Synthetase, die 3- β -OH-Steroid-Dehydrogenase sowie ein weiteres zur Steroid-Dehydrogenase homologes Protein gefunden werden.

Tab. 4.13 Mit dem höchsten Mascot Score identifizierte Proteine der einzelnen Proteinspots der gereinigten mikrosomalen Komponente 3^d (9)

| Name | M^a | M^b | Mascot ^c | % |
|---|-------|-------|---------------------|-------|
| AcylCoA Synthetase | 78 | 76744 | 953 | 31,77 |
| CYP2A19 | 61 | 56991 | 755 | 39,07 |
| Vit D3 25-Hydroxylase (CYP2D25) | 54 | 56875 | 391 | 16,60 |
| 3- β -OH-Steroid-Dehydrogenase | 48 | 42312 | 388 | 28,95 |
| „MOCO sulphurase C-terminal | 39 | 38569 | 227 | 11,04 |
| Steroid-Dehydrogenase homolog | 36 | 34644 | 182 | 18,59 |
| NADH Cytochrom b ₅ Reduktase | 35 | 31039 | 255 | 22,06 |

^aaus dem R_f -Wert berechnetes Molekulargewicht in kDa (s. Tab. 4.12); ^bMolekulargewicht des ermittelten Proteins in Da; ^cMascot Score = $-10 \cdot \lg(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der Zuordnung um ein zufälliges Ereignis handelt, darstellt (Perkins et al., 1999); ^dProzentsatz des mittels der erhaltenen MS-Fragmente identifizierten Proteinanteils am Gesamtprotein

Die LC/MS-Analytik der Proteinbanden erfolgte wie unter 4.2.5.5 beschrieben.

Erstmalig konnte ein hypothetisches Protein mit der Bezeichnung „Moco sulphurase C-terminal domain containing 2“ mittels massenspektrometrischer Analyse in der mikrosomalen Präparation aus porciner Leber nachgewiesen werden, welches auch in der N-reduktiven Fraktion aus Lebermitochondrien gefunden und dort als die für die Reduktion verantwortliche Komponente identifiziert werden konnte (Havemeyer et al., 2006).

4.4 DISKUSSION

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach literaturbekannter Vorschrift (Clement *et al.*, 1997) gereinigten Chargen der mikrosomalen N-reduktiven Komponente zeigten eine im Vergleich zu zuvor gereinigten Präparationen sehr gute Benzamidoxim Reduktase Aktivität. Im Unterschied zu früheren Chargen (Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a) konnte jedoch kein Cytochrom P450 Gehalt über die Absorption bei 450 nm des Kohlenmonoxid-Differenzspektrums bestimmt werden.

Sofern noch vorhanden, wurden die früheren Chargen unter identischen Bedingungen charakterisiert. Die für den Cytochrom P450 Gehalt gemessenen Werte ließen sich nicht mit denen für die Benzamidoxim Reduktase Aktivität korrelieren (Tab. 4.11).

Um auszuschließen, dass der fehlende Zusammenhang auf der Anwesenheit „falscher“ Cytochrom P450 Isoenzyme beruht, wurde zusätzlich die Anwesenheit des mutmaßlich verantwortlichen Cytochrom P450 Isoenzym CYP2D durch Markerenzymaktivität getestet. Auch hier zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigten Chargen im Vergleich nur eine sehr geringe CYP2D Markerenzymaktivität (Friedrich, 2003). Die vollständige Charakterisierung aller Chargen wäre zur besseren Interpretation wünschenswert gewesen, war jedoch aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nicht mehr möglich. Dennoch erscheint die vielfach postulierte Beteiligung dieses Cytochrom P450 Isoenzym an der mikrosomalen Benzamidoxim Reduktion (Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a) aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse äußerst fragwürdig.

Die SDS-PAGE der gereinigten mikrosomalen Komponente lieferte nach Coomassie-Färbung die bereits bekannten zwei Proteinbanden (Clement *et al.*, 2005a). Eine Erhöhung der Empfindlichkeit durch Verwendung der Silberfärbung zeigte jedoch für die neuen und die alten Chargen weitere Proteinbanden. Bei der als CYP2D identifizierten Proteinbande nach Coomassie-Färbung handelte es sich um eine von zwei Banden. Die Silberfärbung machte darüber hinaus fünf bis sechs weitere Banden sichtbar, welche noch nie massenspektrometrisch analysiert

wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass eine dieser neuen Banden das gesuchte Protein enthält.

Aufgrund der geringen Probenmenge, die für eine Analyse mit Hilfe des Elektrophorese-Automaten Experion™ notwendig ist, konnten alle Chargen der mikrosomalen N-reduktiven Komponente bezüglich ihrer elektrophoretischen Reinheit untersucht werden. Es konnte in allen Proben eine Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht detektiert werden, die jedoch nicht klar voneinander abgetrennt werden konnten. Es muss also davon ausgegangen werden, dass sich innerhalb der mittels SDS-PAGE gefundenen breiten, etwas diffusen Banden, mehrere verschiedene Proteine befinden.

Um die Proteine klar voneinander abgegrenzt darzustellen, wurde eine zweidimensionale Auftrennung der in der mikrosomalen N-reduktiven Komponente vorhandenen Proteine angestrebt (O'Farrell, 1975). Da es sich aber um membranständige, hydrophobe Proteine handelt und Membranproteine sich oft nicht in nativem Zustand in Lösung bringen lassen, ist dies problematisch (Macfarlane, 1989; Zahedi *et al.*, 2005). Gelingt eine Solubilisation dennoch, aggregieren die Proteine häufig schon bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF), bei der die Membranproteine bis zu ihrem isoelektrischen Punkt wandern. Die gegenseitige Abstoßung ist dort am niedrigsten, was dazu führt, dass die Proteine aggregieren. Das Ergebnis ist eine verschmierte Proteinbande in der ersten Dimension, die sich dann im Gel fortsetzt. Der beschriebenen außerordentlichen Trennleistung der konventionellen zweidimensionalen Elektrophorese steht als bedeutender Nachteil die fehlende Anwendbarkeit auf Membranproteine gegenüber (Galeva und Altermann, 2002).

Die Trennleistung und Detektion von Membranproteinen kann durch die Wahl eines geeigneten Detergenzes verbessert werden. Auf eine weitere Optimierung der Methode wurde allerdings in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da bis heute mit der Kombination aus Isoelektrischer Fokussierung und SDS-PAGE keine vollständige Proteom-Analyse von Lebermikrosomen gelungen ist (Kanaeva *et al.*, 2005; Bunai und Yamane, 2005). Insbesondere Cytochrom P450 Isoenzyme scheinen in der klassischen zweidimensionalen Elektrophorese nur schlecht detektierbar zu sein (Kanaeva *et al.*, 2005).

Im Gegensatz dazu konnten mit Hilfe der einfachen eindimensionalen SDS-PAGE einer mikrosomalen Präparation gleichzeitig mehrere Cytochrom P450 Isoenzyme identifiziert werden (Galeva und Altermann, 2002).

Um die vorhandenen Proteine klarer voneinander abzutrennen, wurde in dieser Arbeit eine Auftrennung in einer alternativen ersten Dimension versucht. Anstelle der Isoelektrischen Fokussierung wurde eine Gelelektrophorese mit einem kationischen Detergenz nach einer von Macfarlane (1989) entwickelten Methode durchgeführt. Die Auftrennung in der ersten Dimension lieferte wie gewohnt Banden, in der zweiten Dimension konnte jedoch kein aussagekräftiges Gel erhalten werden. Während Zahedi *et al.* (2005) die Überlegenheit dieser Methode für die Auftrennung von Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums gegenüber der zweidimensionalen Methode aus IEF und SDS-PAGE zeigten, konnte dies in der vorliegenden Arbeit für aus porciner Leber vorgereinigte mikrosomale Präparationen nicht bestätigt werden. Die Leistungsfähigkeit der Methode von Macfarlane (1989) gegenüber der einfachen SDS-PAGE wird aufgrund nur geringer Unterschiede im Migrationsverhalten der Proteine in den beiden Dimensionen von weiteren Arbeitsgruppen angezweifelt (Speers und Wu, 2007).

Für Cytochrom P450 Enzyme wurden hingegen neue Verfahren zur Analytik entwickelt, bei denen die Proteomik jeweils allein auf einer eindimensionalen SDS-PAGE beruhte (Altermann *et al.*, 2005; Petushkova *et al.*, 2006). Diese wurde dann mit speziellen massenspektrometrischen Verfahren (Altermann *et al.*, 2005) oder biochemischen Charakterisierungsmethoden (Petushkova *et al.*, 2006) kombiniert.

So wurden auch in der vorliegenden Arbeit die aus der mikrosomalen N-reduktiven Komponente nach der eindimensionalen SDS-PAGE erhaltenen Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert. Für die beiden auch zuvor mit Coomassie-Färbung detektierbaren Proteinbanden konnten erneut Cytochrom P450 Isoenzyme identifiziert werden (Clement *et al.*, 2005a; Clement *et al.*, 1997). Insbesondere die Anwesenheit der zuvor mehrfach beschriebenen Vitamin D3 25-Hydroxylase (Clement *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005a), welche mit porcinem CYP2D25 identisch ist (Matschke, 2004), wurde erneut nachgewiesen. In den weiteren analysierten Banden, die erst über eine Silberfärbung sichtbar gemacht werden konnten, wurde ein hypothetisches Protein, welches homolog zur „Moco sulphurase C-terminal domain containing 2“ ist, gefunden, wenn auch mit geringem Mascot-Wert. Havemeyer *et al.* (2006) hatten zuvor das identische Protein aus der

äußeren mitochondrialen Membran isoliert und identifizierten es als für die mitochondriale Reduktion stickstoffhaltiger Verbindungen verantwortliches Enzym. Dieses Protein wurde daraufhin als mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC, *mitochondrial Amidoxime Reducing Compound*) bezeichnet. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Anwesenheit dieses Proteins in einer mikrosomalen Präparation ist von grundlegender Bedeutung für die weitere Suche nach der Identität der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente. Nicht das vielfach gereinigte Cytochrom P450 Isoenzym 2D, sondern die „Verunreinigung“ mit mARC ist möglicherweise für die katalytische Aktivität der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente verantwortlich. Die Bestätigung der Beteiligung dieses Proteins an der mikrosomalen Benzamidoxim Reduktion anhand alternativer Charakterisierungsmethoden wird Gegenstand weiterer Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sein.

4.5 ZUSAMMENFASSUNG

Für die Reduktion stickstoffhaltiger Verbindungen in Mikrosomen wird bisher unter anderem die Beteiligung eines Cytochrom P450 Enzyms der Familie 2D postuliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mikrosomale stickstoffreduzierende Komponente aus Schweineleber gereinigt und ein Protein mit hoher enzymatischer Aktivität gewonnen. Dieses Protein hatte weder die spektralen Eigenschaften eines Cytochrom P450 Enzyms noch wies es nennenswerte CYP2D Markerenzymaktivität auf. Auch die Benzamidoxim Reduktase Aktivität mehrerer Chargen des gewonnenen Proteins korrelierte weder mit der Absorption des reduzierten Kohlenmonoxid-Differenzspektrums bei 450 nm noch mit der Dextromethorphan-*O*-Demethylierungs-Aktivität. Allerdings wurde nach massenspektrometrischer Analyse der Proteine der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente trotzdem ein Cytochrom P450 2D25 gefunden.

Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendete sensiblere Färbemethode konnten, zu den mittels Coomassie gefärbten, zusätzliche Proteinbanden im SDS-

Gel der gereinigten Proteinfraction gefunden werden. Dies gilt sowohl für bereits vorhandene als auch für die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Chargen der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente. Dieses Ergebnis konnte durch automatisierte Elektrophorese bestätigt werden. Darüber hinaus wurden Hinweise gewonnen, dass sich in den detektierten Proteinbanden mehrere Proteine befinden. Zweidimensionale Elektrophoresen, sowohl konventioneller Art, als auch die speziell für integrale Membranproteine entwickelte 16-BAC-SDS-PAGE, wurden durchgeführt, konnten jedoch keine Verbesserung für eine klare Abtrennung der vorhandenen Proteine und somit deren Identifikation erbringen.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals detektierten zusätzlichen Banden befand sich unter anderem das gleiche Protein, das bereits in Mitochondrien als das für die *N*-Reduktion verantwortliche Enzym isoliert wurde. Dieses wurde zuvor noch nie in mikrosomalen Präparationen aus Lebergewebe gefunden.

Wenn auch CYP2D25 in der gereinigten *N*-reduktiven Komponente massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte, stellen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung die Beteiligung von Cytochrom P450 generell und insbesondere von CYP2D an der Benzamidoxim Reduktion in Lebermikrosomen in Frage.

Stattdessen konnte in einer der erstmals über eine Silberfärbung sichtbar gemachten Banden dasselbe Protein identifiziert werden, das auch in Mitochondrien für die Benzamidoxim Reduktion verantwortlich ist. Somit ist vielleicht nicht das vielfach gereinigte Cytochrom P450 Isoenzym 2D, sondern die „Verunreinigung“ mit der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente für die katalytische Aktivität der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente verantwortlich.

5 DIE MIKROSOMALE N-REDUKTIVE KOMPONENTE – EIN MOLYBDOENZYM?

5.1 EINFÜHRUNG

5.1.1 MOLYBDOENZYME

Molybdänhaltige Enzyme katalysieren eine Reihe von Schlüsselreaktionen innerhalb des Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoff-Metabolismus (Hille, 2002; Mendel und Bittner, 2006). Hierbei handelt es sich um oxidative Hydroxylierungen oder reduktive Dehydroxylierungen (Rajagopalan und Johnson, 1992). Da bei allen Reaktionen ein Sauerstoffatom zu einem Elektronenakzeptor bzw. von einem Elektronendonator übertragen wird, werden die Molybdoenzyme in die Gruppe der Oxotransferasen eingeordnet.

Bis heute sind mehr als 50 verschiedene solcher Enzyme bekannt. Der Großteil von ihnen ist bakteriellen Ursprungs. In Eukaryoten hingegen gibt es nur eine begrenzte Zahl molybdänhaltiger Enzyme, die in zwei Klassen unterteilt werden können (Mendel und Bittner, 2006). Man unterscheidet die Xanthinoxidase- und die Sulfitoxidase-Familie. Zur ersten Gruppe zählen unter anderem die Xanthin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.204) sowie die Aldehydoxidase (EC 1.2.3.1), zur zweiten die Sulfitoxidase (EC 1.8.3.1) und die Nitratreduktase (EC 1.6.6.1). Letztere findet man nur in autotrophen Organismen (Hille, 2005).

Alle Molybdoenzyme enthalten einen mononukleären Molybdäncofaktor (Moco), in dem das Übergangsmetall Molybdän über eine 1,2-Dithiolengruppe an ein Pyranopterin gebunden ist (Hille, 1996; Kisker *et al.*, 1997). Die einzige Ausnahme ist die bakterielle Nitrogenase, bei der das Molybdän in einem Eisen-Schwefel-Cluster gebunden vorliegt (Kisker *et al.*, 1997). Die Biosynthese dieses Cofaktors ist in Pro- und Eukaryoten hochkonserviert und geschieht in vier Stufen, wobei aus dem Guanosinderivat GTP über eine Zwischenstufe der molybdänfreie Cofaktor Molybdopterin (MPT) gebildet und im letzten Schritt das Molybdän eingefügt wird (Mendel und Bittner, 2006; Abb. 5.1).

Schließlich wird der fertige Molybdäncofaktor in die entsprechenden Targetenzyme eingebaut. Dies geschieht möglicherweise über so genannte Moco-Carrier-Proteine (Mendel und Bittner, 2006).

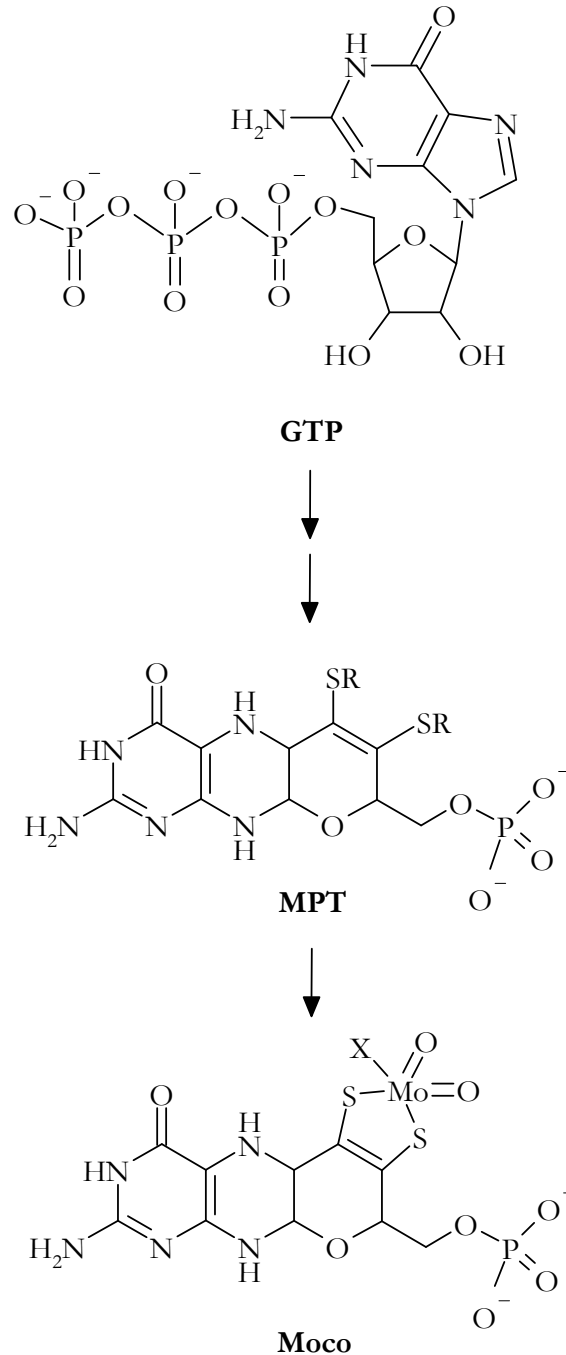


Abb. 5.1 Biosynthese des Molybdäncofaktors (modifiziert nach Mendel und Bittner, 2006)

GTP = Guanosintriphosphat, MPT = Molybdopterin, Moco = Molybdäncofaktor

Neben der molybdänhaltigen Domäne besitzen alle Molybdoenzyme weitere, in den Elektronentransport einbezogene, prosthetische Gruppen wie Flavin, Häm oder Eisen-Schwefel-Zentren (Mendel, 1997).

Die zwei Klassen der eukaryotischen Molybdoenzyme können nicht nur aufgrund von Sequenzhomologien und unterschiedlichen spektralen Eigenschaften (Hille, 2005), sondern auch anhand der Struktur des Molybdäncofaktors (Mendel und Bittner, 2006) unterschieden werden. Während die Enzyme der Sulfitoxidase-Familie bereits durch den Einbau des Cofaktors funktionsfähig sind, benötigen Xanthin-Dehydrogenase sowie Aldehydoxidase aus der Xanthin-oxidase-Familie nach Einbau des Molybdäncofaktors noch einen terminalen Schwefelliganden (Wahl und Rajagopalan, 1982) im Molybdänzentrum, um katalytisch aktiv zu werden (Abb. 5.2).

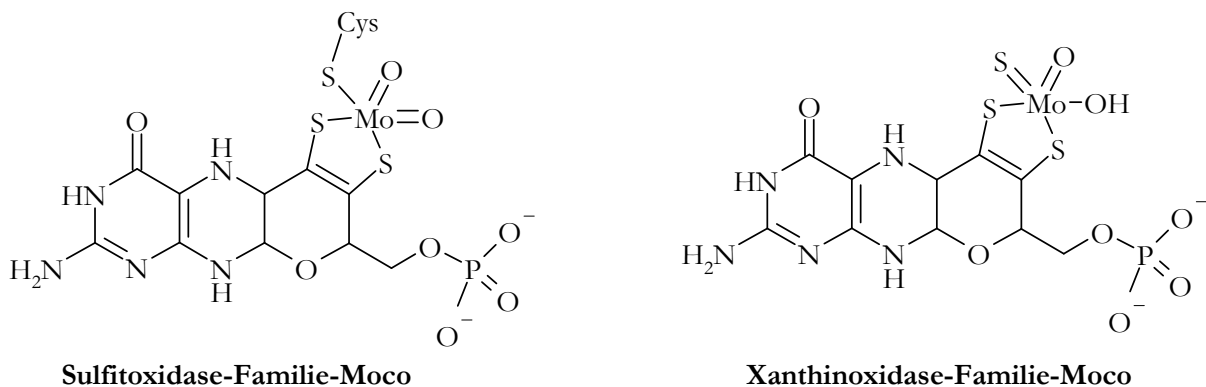


Abb. 5.2 Strukturen der für die katalytische Aktivität der entsprechenden eukaryotischen Molybdoenzyme notwendigen Molybdäncofaktoren (modifiziert nach Mendel und Bittner, 2006)

Moco = Molybdäncofaktor

Hierfür wird die Moco Sulfurase, ein ebenfalls molybdänhaltiges Enzym, benötigt (Bittner *et al.*, 2001). Es handelt sich hierbei um ein homodimeres Protein, das aus zwei Domänen besteht. Die N-terminale Domäne besitzt Cystein-Desulfurase-Aktivität. Die C-terminale Domäne, die den Molybdäncofaktor bindet, ist für die Wechselwirkung mit den Zielproteinen verantwortlich (Bittner *et al.*, 2001).

5.1.2 N-REDUKTIVER ARZNEISTOFFMETABOLISMUS DURCH MOLYBDOENZYME

Neben der zentralen Rolle im Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoffmetabolismus sind insbesondere die Xanthin-Dehydrogenase sowie die Aldehydoxidase auch an der Umwandlung von Fremd- und Arzneistoffen beteiligt. Für beide ist überwiegend die Katalyse oxidativer Reaktionen beschrieben (Beedham, 1997). Darüber hinaus können sie aber auch Reduktionen verschiedener stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen, wie Nitro-Verbindungen (Tatsumi *et al.*, 1986; Nakao *et al.*, 1991), Hydroxylaminen (Stöhrer, 1968), N-hydroxylierten Amiden (Stöhrer, 1968; Sugihara *et al.*, 1983), Azoverbindungen (Stoddart und Levine, 1992; Kitamura und Tatsumi, 1983), Hydroxamsäuren (Kitamura *et al.*, 1994; Sugihara und Tatsumi, 1986), Nitrosaminen (Tatsumi *et al.*, 1983), N-Oxiden (Sugihara *et al.*, 1996; Kitamura *et al.*, 2001) und Oximen (Tatsumi und Ishigai, 1987) katalysieren. Diese Reduktionen sind in der Regel jedoch auf anaerobe Bedingungen angewiesen. Aerobe Reduktionen sind sowohl für 6-N-Hydroxylaminopurin (Clement und Kunze, 1992) und Guanoxabenz (Dambrova *et al.*, 1998) durch Xanthin-Dehydrogenase, als auch für die Nitroguanidinverbindung Imidacloprid (Dick *et al.*, 2005; Dick *et al.*, 2006) durch die Aldehydoxidase beschrieben.

5.1.3 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN ZUR BENZAMIDOXIM REDUKTION DURCH MOLYBDOENZYME

Von Havemeyer *et al.* (2006) wurden Präparationen aus Schweinelebermitochondrien gewonnen. Hieraus wurde ein bislang unbekanntes Protein isoliert, welches, im Zusammenspiel mit Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase, in der Lage war Amidoxime unter aeroben Bedingungen zu reduzieren. Dieses Protein weist eine hohe Sequenzhomologie zum C-Terminus der Moco Sulfurase auf und wird heute als mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC, *mitochondrial Amidoxime Reducing Compound*) bezeichnet.

Die zu der mARC homologe C-terminale Domäne der pflanzlichen Moco Sulfurase aus der Schaumkressenart *Arabidopsis thaliana* wurde kloniert und in verschiedenen E. Coli-Stämmen zur Expression gebracht (Bittner *et al.*, 2001). Für

diesen rekombinanten C-Terminus der Moco Sulfurase konnte die Benzamidoxim Reduktion gezeigt werden (Havemeyer *et al.*, 2006).

Wie in Kapitel 4.3.2.5 beschrieben, konnte die mARC auch in der N-reduktiven Fraktion aus Schweinelebermikrosomen mittels massenspektrometrischer Analyse gefunden werden.

5.1.4 THEMA UND ZIELSETZUNG

Die Anwesenheit der mARC in der mikrosomalen Präparation sollte mit alternativen Methoden bestätigt werden. Ziel war ein funktioneller Nachweis einer „Molybdäncofaktoraktivität“. Zur Bestimmung dieser „Molybdäncofaktor Aktivität“ wird mit dem *nit-1* Assay die Aktivität einer Nitratreduktase-defizienten *Neurospora crassa*- Mutante *nit-1* rekonstituiert. Weil die Mutante *nit-1* den Molybdäncofaktor nicht selbst bilden kann, ist für eine erfolgreiche Rekonstitution die Zugabe eines externen Molybdäncofaktors erforderlich. Zum Nachweis, dass ein Protein einen aktiven Molybdäncofaktor enthält, wird nach Zugabe dieses Proteins zu einem *nit-1* Extrakt das nur in diesem Fall entstehende Nitrit über eine Azokupplung nachgewiesen (Nason *et al.*, 1971).

Darüber hinaus sollte die Anwesenheit der mARC immunochemisch, mit Hilfe eines gegen den C-Terminus der Moco Sulfurase gerichteten Antikörpers, bestätigt werden. Dieser erkennt auch die zum C-Terminus homologe mARC (Havemeyer *et al.*, 2006).

Anschließend sollte überprüft werden, ob es sich bei der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente auch um die Benzamidoxim reduzierende Komponente in Mikrosomen handelt. Hierzu sollten Hemmstudien mit Natriumvanadat, einem Hemmstoff für molybdänhaltige Enzyme, mit Mikrosomen und der gereinigten mikrosomalen N-reduktiven Komponente durchgeführt werden.

Abschließend sollte überprüft werden, ob die in Mikrosomen vorhandene mARC wirklich mikrosomalen Ursprungs ist oder es sich um eine Kontamination der mikrosomalen Präparation mit dem entsprechenden mitochondrialen Protein handelt, welches für die Benzamidoxim Reduktase Aktivität der Mikrosomen verantwortlich ist.

Mitochondrien besitzen eine etwa 15-fach höhere spezifische Benzamidoxim Reduktase Aktivität als Mikrosomen, die äußere mitochondriale Membranpräparation sogar eine fast 60-fache (Tab. 5.1). Die Voraussetzung für eine durch Kontamination verursachte Benzamidoxim Reduktion in Mikrosomen ist also eine Verunreinigung mit mindestens 6 % mitochondrialem Protein oder 1,8 % Protein der äußeren mitochondrialen Membran (OMV).

Tab. 5.1 Benzamidoxim Reduktase Aktivität der subzellulären Fraktionen (Clement *et al.*, 2005b)

| Subzelluläre Fraktion | Spezifische Aktivität |
|-------------------------------|--------------------------|
| | nmol Benzamidin/(min mg) |
| Mikrosomen | 5,3 |
| Mitochondrien | 84 |
| Äußere mitochondriale Membran | 297 |

Die Überprüfung der Reinheit der gewonnenen Mikrosomen kann prinzipiell anhand von enzymatischen Testverfahren oder mittels spezifischer immunochemischer Methoden erfolgen (Archakov *et al.*, 1973). Die enzymatischen Testverfahren basieren auf der Bestimmung der Enzymaktivitäten mitochondrialer Leitenzyme in Mikrosomen. Verwendete Markerenzyme sollten idealerweise ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert sein (Sottocasa *et al.*, 1976).

Cytochrom c Oxidase und Succinat Cytochrom c Reduktase werden hierbei für die Bestimmung der Mikrosomenreinheit hinsichtlich mitochondrialer Verunreinigung herangezogen. Für das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Mikrosomengewinnung (Clement *et al.*, 1996; Omura und Sato, 1964) konnte gezeigt werden, dass die über die Leitenzyme ermittelte Kontamination mit Mitochondrien zu niedrig ist, um für die Benzamidoxim Reduktion der Mikrosomen verantwortlich zu sein (Clement, 2002).

Da die Benzamidoxim-Reduktion in der OMV lokalisiert ist, die zuvor genannten Markerenzyme aber Proteine der inneren Mitochondrienmembran sind, ist es entscheidend, ein Markerenzym der entsprechenden mitochondrialen Subfraktion zu verwenden. Die literaturbekannten OMV-Markerenzyme sind die Monoaminoxidase und die Rotenon-insensitive NADH Cytochrom c Reduktase (Schnaitman und Greenawalt, 1968). Diese eignen sich jedoch nicht zur Prüfung einer mikrosomalen Präparation auf Kontamination mit OMV sondern nur zur Charakterisierung der Mitochondriensubfraktionen OMV, innere mitochondriale Membran und periplasmatischer Raum. Die exklusive Lokalisation von Monoaminoxidase und Rotenon-insensitiver Cytochrom c Reduktase in der OMV besteht nur innerhalb der Mitochondrien, nicht aber gegenüber Mikrosomen. Diese enthalten ebenfalls Monoaminoxidase und lassen deshalb eine Unterscheidung über die Herkunft des Enzyms nicht zu. Gleiches gilt für die Rotenon-insensitive NADH Cytochrom c Reduktase, da der zu ihrer Bestimmung verwendete Cytochrom c Assay unter Zusatz des Inhibitors Rotenon ebenfalls nicht spezifisch für Mitochondrien ist.

Ein exklusiv in der OMV lokalisiertes Protein ist der *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC; Yu und Forte, 1996). Ein immunochemischer Nachweis mit einem gegen den VDAC gerichteten Antikörper zur Überprüfung auf Kontamination mikrosomaler Präparationen mit OMV wurde von Andersson *et al.* (2005) beschrieben und sollte für die Mikrosomenpräparation in dieser Arbeit durchgeführt werden.

5.2 METHODEN

5.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

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

5.2.2 *NIT-1* REKONSTITUTIONS ASSAY

Der *nit-1* Rekonstitutionsassay (Kapitel 5.1.4) zur Messung der „Molybdäncofaktor Aktivität“ (Nason *et al.*, 1971) wurde an der Technischen Universität Braunschweig nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Der Ansatz aus 20 μ l zellfreiem *nit-1* Extrakt mit 5 mM Molybdat und 2 mM Gluthathion wurde mit den mikrosomalen Proteinproben (4 bzw. 8 μ g) versetzt und anschließend für 5 Minuten entgast. Nach einer zweistündigen Inkubation im Dunkeln bei 25 °C wurde dem Reaktionsgemisch 0,1 mg NADPH zugefügt. Es folgte eine weitere Inkubation im Dunkeln für 10 – 15 Minuten bei Raumtemperatur. Das 1,5-fache Volumen einer Reaktionslösung, bestehend aus 100 mM Kaliumnitrat und 0,1 M FAD im Verhältnis 2:1, wurde zugesetzt, um die Nitratreduktase zu induzieren, und weiter für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch fünfminütiges Denaturieren bei 95 °C wurde die Induktion abgestoppt.

Die durch die rekonstituierte Nitratreduktase katalysierte Nitritbildung wurde über eine Azokupplung mit je 250 μ l 1 % (w/v) Sulfanilamid (in 3 M HCl) und 0,02 % (w/v) Naphthylethylendiamin nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 540 nm und die aus der Nitritbildung resultierende „Molybdäncofaktor Aktivität“ wird in der vorliegenden Arbeit in $\Delta A_{540}/(h \text{ mg})$ angegeben.

5.2.3 IMMUNOBLOT-ANALYSE

5.2.3.1 Anti-ABA3

5.2.3.1.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 4.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die Proteinproben wurden nach vorheriger Aufkonzentrierung mittels MicroconTM YM10 (Millipore, Schwalbach) mit Probenauftragungspuffer auf einen Proteingehalt von 8 bzw. 15 μ g pro Bahn eingestellt und ebenso wie der Größenmarker (Low Molecular Weight Standard, Amersham, Freiburg) für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert.

5.2.3.1.2 Immunoblot

Die Immunoblot-Analyse wurde an der Technischen Universität Braunschweig nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Nach Beendigung der Gelelektrophorese (Durchführung s. Kapitel 5.2.3.1.1 und 4.2.5.1) wurde das Gel für 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die Blotmembran (HybondTM-P, Amersham, Freiburg; Roti[®]-PVDF, Roth, Karlsruhe) wurde in Methanol aktiviert und danach in *Aqua bidest.* überführt. Nachdem sie abgesunken war, wurde sie in Transferpuffer bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Membran und das Gel wurden folgendermaßen geschichtet und in die Blot-Apparatur eingesetzt: vier Lagen Whatman-Papier; Blotmembran; Gel (Oberseite nach unten); vier Lagen Whatman-Papier.

Die Proteine wurden bei 0,8 mA/cm² für 120 Minuten geblottet. Im Anschluß wurde der Proteintransfer vom Gel auf die Blotmembran durch eine reversible Färbung mit Ponceau S [5 % (w/v) in TBS] überprüft. Die Proteinmembran wurde in TBS und anschließend für 60 Minuten in der Blockinglösung gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (gerichtet und aufgereinigt gegen den rekombinanten C-Terminus der Moco Sulfurase ABA3 aus *A. thaliana*, 1:7000 verdünnt) für 120 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 8 Minuten mit TBSTXS (Tab. 5.2) wurde noch einmal für 10 Minuten mit 0,8 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Vor der 30-minütigen Inkubation mit dem Peroxidase-beladenen Sekundärantikörper (Anti-rabbit-IgG-horseradish peroxidase, Sigma, Taufkirchen) wurde noch einmal für 5 Minuten Blockinglösung zugegeben. Der Sekundärantikörper wurde 1:10000 verdünnt. Nach erneutem Waschen mit TBSTXS und 0,8 % (w/v) NaCl-Lösung wurde mit ECL-Reagenz (Amersham, Freiburg) gemäß den Herstellerangaben detektiert. Es wurden drei Western Blots durchgeführt. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für alle Ergebnisse. Eine Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen gibt Tab. 5.2.

Tab. 5.2 Puffer für den Western Blot mit dem gegen den rekombinanten C-Terminus der Mocosulfurase ABA3 aus *A. thaliana* gerichteten Antikörper

| | | | |
|---------------------------|--------------|----------------|-----------|
| Transferpuffer | | TBS, pH 7,5 | |
| Methanol | 10 % (v/v) | Tris-HCl | 10 mM |
| Tris-HCl | 25 mM | NaCl | 150 mM |
| Glycin | 190 mM | | |
| TBSTXS | | Blockinglösung | |
| BSA | 0,1 % (w/v) | BSA | 2 % (w/v) |
| Triton [®] X-100 | 0,05 % (w/v) | in TBS | |
| SDS | 0,05 % (w/v) | | |
| in TBS | | | |

5.2.3.2 Anti-VDAC

5.2.3.2.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 4.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit Probenauftragspuffer auf einen Proteingehalt von 0,1 bis 60 µg pro Bahn eingestellt und ebenso wie der Größenmarker (Low Molecular Weight Standard, Amersham, Freiburg) für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert.

5.2.3.2.2 Immunoblot

Nach Beendigung der Gelelektrophorese (Durchführung s. Kapitel 5.2.3.2.1 und 4.2.5.1) wurde das Gel für 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die Blotmembran (Hybond[™]-P, Amersham, Freiburg) wurde in Methanol aktiviert und danach in *Aqua bidest.* überführt. Nachdem sie abgesunken war, wurde sie in Transferpuffer bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Membran und das Gel wurden folgendermaßen geschichtet und in die Blot-Apparatur eingesetzt: drei Lagen Whatman-Papier; Blotmembran; Gel (Oberseite nach unten); drei Lagen Whatman-Papier.

Die Proteine wurden bei 400 mA für 60 Minuten geblottet. Im Anschluß wurde der Proteintransfer vom Gel auf die Blotmembran durch eine reversible Färbung mit Ponceau S [5 % (w/v) in TBS] überprüft. Die Proteinmembran wurde in TBS und anschließend für 60 Minuten in der Blockinglösung gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (gerichtet und aufgereinigt gegen den *Voltage-Dependent Anion Channel* der äußeren mitochondrialen Membran, 1:2000 verdünnt, Sigma, Taufkirchen) bei 4 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBST gewaschen und für 60 Minuten mit dem Peroxidase-beladenen Sekundärantikörper (Anti-rabbit-IgG-horseradish peroxidase, Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde 1:5000 verdünnt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST für jeweils 5 Minuten wurde mit ECL-Reagenz (Amersham, Freiburg) gemäß den Herstellerangaben detektiert. Es wurden drei Western Blots durchgeführt. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für alle Ergebnisse.

Eine Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen gibt Tab. 5.3.

Tab. 5.3 Puffer für den Western Blot mit dem gegen den *Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC)* in der äußeren Mitochondrienmembran gerichteten Antikörper

| | | | |
|----------------|-------------|------------------|-----------|
| Transferpuffer | | TBS, pH 7,6 | |
| Methanol | 20 % (v/v) | Tris-HCl | 20 mM |
| Tris-HCl | 5 mM | NaCl | 135 mM |
| Glycin | 40 mM | | |
| TBST | | Blockinglösung | |
| Tween-20 | 0,1 % (w/v) | Magermilchpulver | 5 % (w/v) |
| in TBS | | in TBST | |

5.2.4 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN

5.2.4.1 Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen

Es wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 1 mg/ml Schweinelebermikrosomen und 500 μ M Benzamidoxim wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 drei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde die Reaktion gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 μ l. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

5.2.4.2 Inkubationen mit der gereinigten mikrosomalen Komponente

Zur Rekonstitution der Enzymaktivität wurde der folgende Inkubationsansatz verwendet: 5 μ g gereinigte mikrosomale Komponente, 200 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase und ein Zusatz von 40 μ M DLPC wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 zwei Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von 500 μ M Benzamidoxim und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 1 mM NADH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 μ l. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

5.2.4.3 Inhibitorstudien mit Natriumvanadat

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in den Kapiteln 5.2.4.1 und 5.2.4.2 angegeben. Die Durchführung wurde wie folgt modifiziert: Es erfolgte eine fünfminütige Vorinkubation des Proteins mit 0 –

300 μ M Natriummetavanadat. Nach Zugabe von 1 mM NADH und erneuter dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion mit 500 μ M Benzamidoxim gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 μ l. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 g abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

IC₅₀-Inhibitorkonzentrationen wurden über eine nichtlineare Regressionsanalytik (Sigma Plot 8.0; SPSS Inc., Chicago, USA) nach der Funktion $y = y_0 + [(a/b)/(b+x)]$ berechnet.

5.3 ERGEBNISSE

5.3.1 MESSUNG DER „MOLYBDÄNCOFAKTOR AKTIVITÄT“

Durch Zusatz zweier Mikrosomenchargen und den jeweils daraus gewonnenen mikrosomalen N-reduktiven Komponenten (3rd(9), 3rd(10)) zu dem Extrakt der *Neurospora Crassa* – Mutante *nit-1* konnte die Nitratreduktaseaktivität erfolgreich rekonstituiert werden (Tab. 5.4). Sowohl in den Mikrosomen als auch in den daraus gereinigten Fraktionen konnte somit die Anwesenheit eines molybdäncofaktorhaltigen Proteins gezeigt werden.

Basierend auf den ermittelten Werten lässt sich ein Anreicherungsfaktor des Molybdoenzym von ~ 17 in 3rd(9) und 1,5 in 3rd(10) aus den entsprechenden Mikrosomenchargen berechnen. Diese Anreicherungsfaktoren korrespondieren in etwa mit den jeweiligen Anreicherungen der N-reduktiven Aktivität der gereinigten Komponenten (~ 10 für 3rd(9) und $\sim 3,5$ für 3rd(10)).

Tab. 5.4 Rekonstitution der Nitratreduktaseaktivität der *Neurospora crassa* Mutante *nit-1* durch die mikrosomalen N-reduktiven Komponenten

| Mikrosomale N-reduktive Fraktion | „Molybdäncofaktor Aktivität“ | Benzamidoxim Reduktase Aktivität |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | $\Delta A_{540}/(\text{h mg})$ | nmol Benzamidin/(min mg) |
| 3 rd (9) | 333 ± 7 | 24,7 ± 1,4 |
| SLMs(9) | 20 ± 1 | 2,5 ± 0,6 |
| 3 rd (10) | 33 ± 1 | 8,7 ± 1,4 |
| SLMs(10) | 22 ± 2 | 2,5 ± 0,5 |

Die mikrosomalen Fraktionen wurden auf „Molybdäncofaktor Aktivität“ im *nit-1* Rekonstitutionsassay getestet. Die Durchführung ist in Kapitel 5.2.2 beschrieben. Gebildetes Nitrit wurde durch die Absorption bei 540 nm nach Azokupplung gemessen.

Die Durchführung der Inkubationen zur Bestimmung der Benzamidoxim Reduktase Aktivität ist in den Kapiteln 5.2.4.1 und 5.2.4.3 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

Die aufgeführten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallelen Inkubationsansätzen.

5.3.2 WESTERN BLOT

In der gereinigten Fraktion konnte mit dem gegen den rekombinanten C-Terminus der Mocosulfurase ABA3 aus *A. thaliana* gerichteten Antikörper spezifisch das als „Moco Sulfurase C-terminal domain containing 2“ bezeichnete Protein erkannt werden (Abb. 5.3).

Der Western Blot wurde für die beiden im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Chargen der mikrosomalen N-reduktiven Komponente ebenso durchgeführt, wie für diejenige, die in Kapitel 4 als 3rd(1) bezeichnet wurde. Diese zeigte eine vergleichbar gute Benzamidoxim Reduktase Aktivität, wurde aber nicht im Rahmen

dieser Arbeit gewonnen und wies das für Cytochrom P450 charakteristische Kohlenmonoxid-Differenzspektrum auf (Kapitel 4.3.1). Für alle getesteten Proteine konnte die beschriebene Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 5.3; 3rd(10) ohne Abb.).

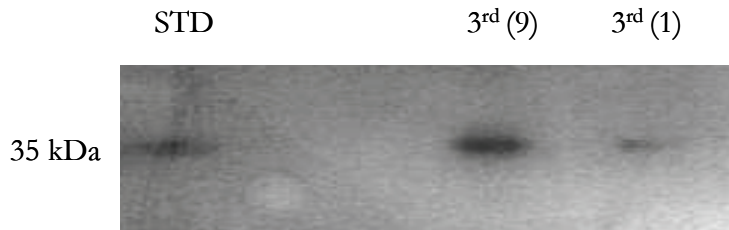


Abb. 5.3 Western Blot der aufgereinigten Proteinfraktion

STD = Molekulargewichtsstandards

3rd(9) = im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigte N-reduktive mikrosomale Fraktion (15 μ g)

3rd(1) = zuvor gereinigte N-reduktive mikrosomale Fraktion (8 μ g)

5.3.3 INHIBITORSTUDIEN

Es wurden *in vitro*-Inkubationsstudien sowohl mit Schweinelebermikrosomen (Abb. 5.4) als auch mit dem gereinigten N-reduktiven Enzymsystem (Abb. 5.5) unter Zusatz des Inhibitors Natriummetavanadat in Konzentrationen von 0 bis 300 μ M durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Hemmstoff für Molybdoenzyme, der aber nicht spezifisch für diese ist (Krivanek und Novakova, 1991; Ramadoss, 1980), sondern unter anderem auch Succinyl-CoA-Ligase und P-Typ ATPasen hemmt (Krivanek und Novakova, 1991; Nawarathna *et al.*, 2005).

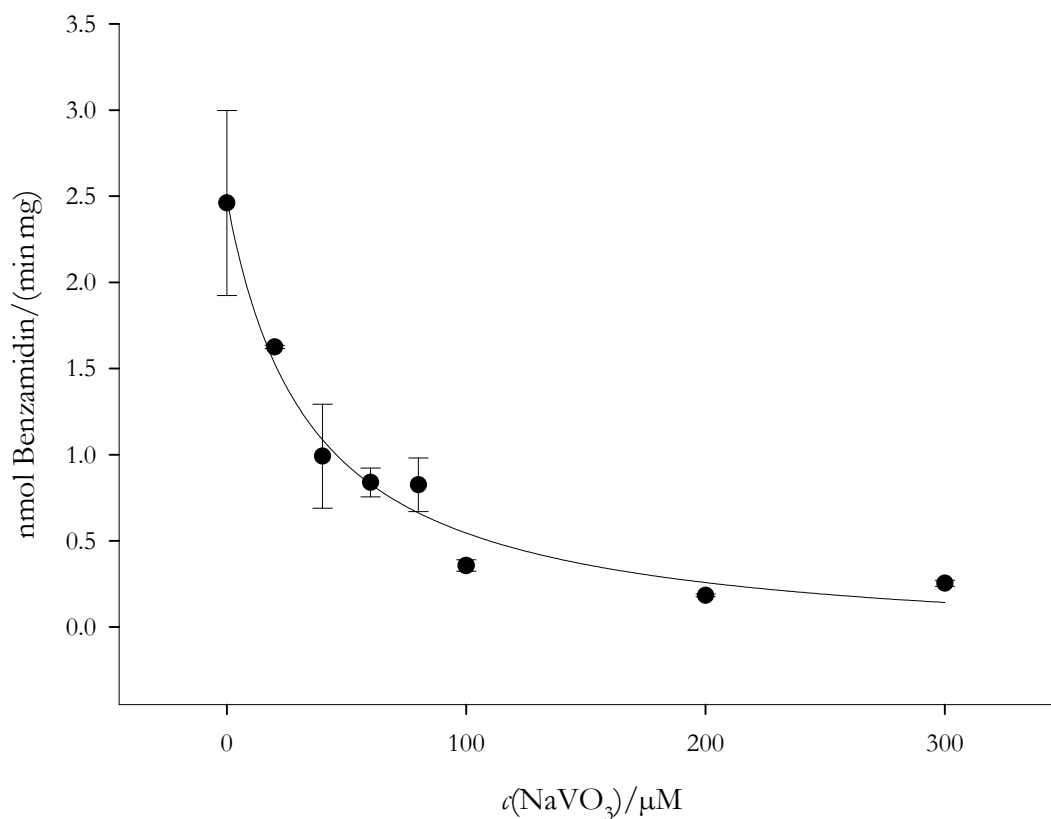


Abb. 5.4 Einfluss von Natriummetavanadat auf die Reduktion des Benzamidoxims durch Schweinelebermikrosomen

Die Durchführung der Inkubationen ist in den Kapiteln 5.2.4.1 und 5.2.4.3 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Der Zusatz dieses Hemmstoffes sowohl zu Schweinelebermikrosomen (Abb. 5.4) als auch zum mikrosomalen Enzymsystem (Abb. 5.5) führte jeweils zum massiven Verlust der N-reduktiven Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von $34,8 \pm 8,6 \mu\text{M}$ für Schweinelebermikrosomen und $27,7 \pm 9,5 \mu\text{M}$ für das N-reduktive Enzymsystem.

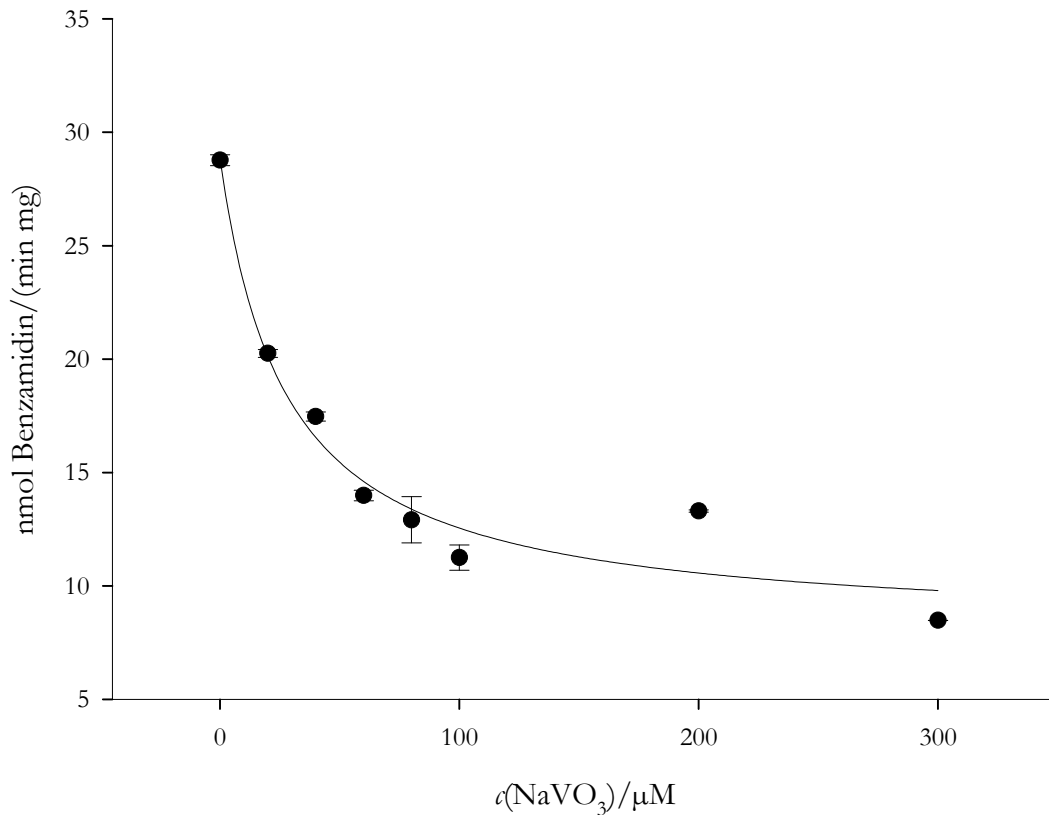


Abb. 5.5 Einfluss von Natriummetavanadat auf die Reduktion des Benzamidoxims durch das mikrosomale N-reduktive Enzymsystem

Die Durchführung der Inkubationen ist in den Kapiteln 5.2.4.2 und 5.2.4.3 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

5.3.4 PRÜFUNG AUF KONTAMINATION MIT DER ÄUßEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN

Die Beurteilung der mitochondrialen Kontamination der Mikrosomen erfolgte semiquantitativ mittels eines immunochemischen Verfahrens. Es wurde auf die Anwesenheit eines exklusiv in der äußeren Mitochondrienmembran (OMV) lokalisierten *Voltage dependent anion channels* (VDAC) geprüft. Diese Methode

erlaubte eine Prüfung auf Kontamination der Mikrosomen speziell mit derjenigen Mitochondriensubfraktion, die für die Benzamidoxim Reduktion verantwortlich ist. Eine Antikörperreaktion ließ sich ab einer Proteinmenge von 0,1 µg OMV detektieren. Der polyklonale Anti-VDAC-Antikörper sollte spezifisch den in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Ionenkanal (Abb. 5.6) erkennen, zeigte aber auch eine Kreuzreaktion mit einem Protein des Molekulargewichtsstandards. Es wurden mehrere Western Blots mit unterschiedlichen Mengen mikrosomalen Proteins durchgeführt. Bis 15 µg Protein konnte keine Reaktion mit dem Anti-VDAC-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. nicht gezeigt). Als Positivkontrolle wurde anschließend zu einer Probe von 20 µg mikrosomalem Protein 0,1 µg OMV zugesetzt und zur Prüfung auf Kontamination die Proteinmengen auf bis zu 60 µg pro Probe erhöht.

Bei dem so erhaltenen Western Blot zeigte sich bei der Positiv-Kontrolle sowie den mikrosomalen Proteinproben die der OMV entsprechende Bande durch die Antikörperreaktion sowie eine zusätzliche Bande (Abb. 5.6). Beide waren konzentrationsabhängig. Die zusätzliche Bande war im SDS-Gel weiter gelaufen als das zu detektierende Protein. Der Grund für das Auftreten dieser zusätzlichen Bande konnte nicht weiter aufgeklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Degradationsprodukt.

Die Anwesenheit des Ionenkanals in Mikrosomen, die gleichbedeutend mit einer OMV-Kontamination ist, wurde ab einer Proteinmenge von 20 µg Mikrosomen gefunden. Weil eine Proteinmenge von 0,1 µg OMV ein vergleichbar starkes Signal wie 40 µg Mikrosomen lieferte, kann auf eine Kontamination mit ca. 0,25 % äußerer Mitochondrienmembran geschlossen werden.

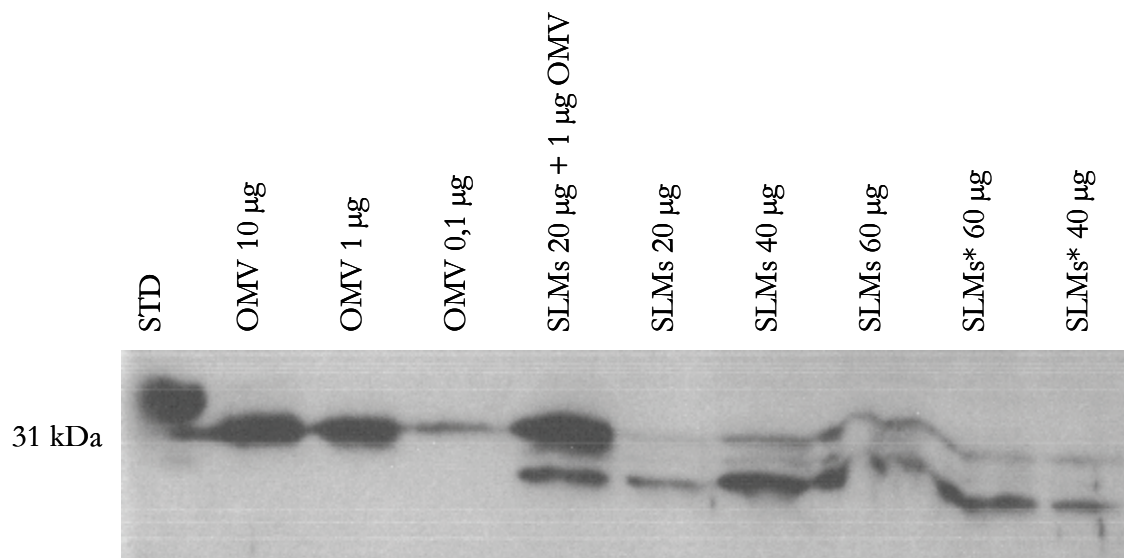


Abb. 5.6 Western Blot zur Überprüfung der Mikrosomen auf Kontamination mit der äußeren Mitochondrienmembran

STD = Molekulargewichtsstandards

OMV = äußere Mitochondrienmembran

SLMs = Schweinelebermikrosomen, Charge 9

SLMs* = Schweinelebermikrosomen, Charge 10

5.4 DISKUSSION

Ziel der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen der „Molybdäncofaktoraktivität“ war die Bestätigung der Aktivität des massenspektrometrisch in der N-reduktiven Fraktion aus Schweinelebermikrosomen nachgewiesenen molybdäncofaktorhaltigen Proteins. Mit allen getesteten Präparationen konnte die Aktivität der Nitratreduktase-defizienten Mutante aus *Neurospora crassa nit-1* erfolgreich rekonstituiert werden. Die mikrosomalen Fraktionen besitzen damit ebenso wie Mitochondrien eindeutig eine „Molybdäncofaktoraktivität“. Darüber hinaus ist diese in den N-reduktiven Fraktionen gegenüber den jeweiligen Mikrosomenchargen, aus denen sie gereinigt wurden, angereichert. Die ermittelten Anreicherungs faktoren lassen sich zudem in

etwa mit den spezifischen Benzamidoxim Reduktase Aktivitäten der einzelnen Präparationen korrelieren.

Sowohl die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen (Kapitel 4.2.2.2), als auch die bereits zuvor gereinigten Chargen der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente zeigten eine Reaktion mit einem gegen den rekombinanten C-Terminus der Moco Sulfurase gerichteten Antikörper. Dieser Immunoblot bestätigt somit die Anwesenheit der mARC in Mikrosomen.

Mit den erhaltenen Ergebnissen aus der massenspektrometrischen Analyse (Kapitel 4), dem *nit-1* Rekonstitutionsassay und dem immunochemischen Nachweis konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Anwesenheit und Aktivität der mARC in mikrosomalen Präparationen aus Schweineleber gezeigt werden.

Nachdem die im Verlauf der Reinigung korrelierbare Anreicherung des Molybdäncofaktors bereits einen klaren Hinweis auf die Beteiligung des Molybdoenzym an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in Lebermikrosomen lieferte, sollte dies zusätzlich durch Hemmstudien mit Natriummetavanadat bestätigt werden. Vanadat stellt zwar keinen selektiven Hemmstoff für Molybdoenzyme dar, allerdings ist eine Enzymhemmung durch Vanadat typisch für molybdäncofaktorabhängige Reaktionen (Ramadoss, 1980).

Die nach Reduktion von Benzamidoxim in dieser Arbeit gemessene Bildung des Metaboliten Benzamidin wurde sowohl in Mikrosomen als auch in der daraus gereinigten *N*-reduktiven Komponente durch Natriumvanadat deutlich gehemmt. Es wurden ähnliche IC₅₀-Werte von $34,8 \pm 8,6 \mu\text{M}$ für Schweinelebermikrosomen und $27,7 \pm 9,5 \mu\text{M}$ für das *N*-reduktive Enzymsystem bestimmt. Die gemessenen IC₅₀-Werte sind darüber hinaus mit dem für die äußere Mitochondrienmembran (OMV) von $8 \mu\text{M}$ vergleichbar (Havemeyer, 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Vanadat-Hemmung zeigen eindeutig die Beteiligung der mARC an der mikrosomalen Benzamidoxim Reduktion. Ob zusätzlich zu der mARC weitere Proteine daran beteiligt sind, soll Gegenstand weiterer Forschung sein.

Abschließend sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob die in der mikrosomalen Präparation gefundene mARC wirklich mikrosomalen Ursprungs ist oder es sich um eine mitochondriale Verunreinigung handelt. Die Kontamination der Mikrosomen mit mitochondrialen Proteinen konnte über enzymatische Testverfahren kaum detektiert werden (Clement, 2002). Die hierbei untersuchten

Enzyme waren jedoch nicht in der für die Benzamidoxim Reduktion verantwortlichen äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, sondern in der inneren. Um spezifisch die Kontamination der Mikrosomen mit der *N*-reduktiven mitochondrialen Subfraktion zu messen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein immunochemisches Verfahren mit einem gegen den exklusiv in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) gerichteten Antikörper entwickelt.

In dem semiquantitativen Immunoblot zeigten 0,1 µg der OMV bei 31 kDa noch eine eindeutige Reaktion mit dem Antikörper und somit die Nachweisgrenze an. Zur Überprüfung auf eine Kontamination der Mikrosomen mit der OMV, die maximal im Bereich von 1-2 % erwartet wurde, mussten hohe Proteinmengen eingesetzt werden. Diese sind für den nicht ganz gleichmäßigen Lauf der Proteine im Gel verantwortlich (Abb. 5.6). Auf einer Höhe von 31 kDa konnte ab einer Proteinmenge von 40 µg Schweinelebermikrosomen ein mit dem von 0,1 µg OMV vergleichbares Signal detektiert werden. Daraus ergibt sich eine maximale Kontamination der Proben mit 0,25 % äußerer Mitochondrienmembran. Wie in Kapitel 5.1.4 erläutert, müssten die Mikrosomen aber mit mindestens 1,8 % OMV verunreinigt sein, damit ihre spezifische Benzamidoxim Reduktase Aktivität allein durch die OMV hervorgerufen sein kann.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse für zwei unabhängig gewonnene Mikrosomenchargen deuten nicht darauf hin, dass Kontamination mit OMV für deren Benzamidoxim Reduktase Aktivität verantwortlich ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den durch enzymatische Methoden gewonnenen Erkenntnissen über präparationsbedingte mikrosomale Kontamination mit Mitochondrien überein (Clement, 2002).

Bei diesen Berechnungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente nur um eines von drei an der Benzamidoxim Reduktion beteiligten Enzyme handelt. Die äußere Mitochondrienmembran und Mikrosomen unterscheiden sich allerdings nicht nur in der Quantität der vorhandenen dritten Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems, sondern auch in der der beiden anderen beteiligten Enzyme und in ihrer Stöchiometrie. In Mikrosomen wird ein physiologisches Cytochrom b_5 /NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Verhältnis mit einem 10- bis 15-fachen Überschuss des Hämproteins gegenüber dem Flavinenzym beschrieben

(Rogers und Strittmatter, 1974; Spatz und Strittmatter, 1971; Kadlubar und Ziegler, 1974; Yang und Cederbaum, 1996). Über die Stöchiometrie der beiden Enzyme in der OMV ist wenig bekannt (Borgese und Pietrini, 1986; D' Arrigo *et al.*, 1993). Von Havemeyer (2006) wurde über eine Näherungsberechnung (Yubisui und Takeshita, 1980) ein dem Cytochrom b_5 überlegener NADH Cytochrom b_5 Reduktase Gehalt in der OMV ermittelt.

Für die Reduktion von Amidoximen und Hydroxylaminen wurde ein optimales stöchiometrisches Verhältnis mit einem 8 – 10-fachen Überschuss von Cytochrom b_5 gegenüber seiner Reduktase postuliert (Kurian *et al.*, 2004). Die in Mikrosomen vorliegenden Verhältnisse sind demnach für die Reduktion als optimal anzusehen, wohingegen in der OMV ein Mangel an Cytochrom b_5 vorherrschen müsste. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die spezifische Benzamidoxim Reduktase Aktivität in der OMV durch zugesetztes Cytochrom b_5 verdoppelt werden kann (Havemeyer, 2006).

Durch die in einer mikrosomalen Präparation vorliegenden verhältnismäßig großen Mengen an Cytochrom b_5 kann demzufolge möglicherweise bereits bei einer geringeren Kontamination mit der OMV die spezifische Benzamidoxim Reduktase Aktivität der Mikrosomen erreicht werden. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese durch eine Kontamination der Mikrosomen mit der OMV zustande gekommen ist. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, ob die in der mikrosomalen Präparation gefundene mARC nicht doch mitochondrialen Ursprungs ist.

Um die mARC als die Benzamidoxim reduzierende Komponente eindeutig zu identifizieren, konnten bislang nur Untersuchungen mit dem zu mARC homologen C-Terminus der pflanzlichen Moco Sulfurase durchgeführt werden (Havemeyer *et al.*, 2006). Mittlerweile ist ebenfalls eine Klonierung der cDNA der mARC mit anschließender Exprimierung des rekombinanten Proteins erfolgt (Veröffentlichung in Vorbereitung). Diese war aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Eine Reduktion durch die rekombinante mARC konnte für eine Vielzahl von bekannten Reduktionen, wie der von Amidoximen, aliphatischen und aromatischen Hydroxylaminen, *N*-Hydroxyguanidinen, *N*-Hydroxyamidinohydrasonen und Oximen, gezeigt werden (Veröffentlichung in Vorbereitung). Die Kenntnis der enzymatischen Grundlagen der *N*-reduktiven Biotransformation ist von großer Bedeutung zur Beurteilung der Pharmakokinetik,

zur Abschätzung von resultierenden Interaktionspotentialen und zur Beurteilung der Toxizität von *N*-hydroxylierten Prodrugs.

Da es sich bei der mARC um ein erstmals in Säugetieren beschriebenes Enzymsystem handelt, ist die Aufklärung ihrer physiologischen Funktion von zentraler Bedeutung für die Anwendbarkeit *N*-hydroxylierter Verbindungen. Diese soll Gegenstand weiterer Forschung sein.

5.5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Anwesenheit der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente in der aus Schweinelebermikrosomen gereinigten *N*-reduktiven Proteinfraktion anhand massenspektrometrischer und immunochemischer Methoden nachgewiesen werden. Durch Zusatz dieser *N*-reduktiven Fraktionen oder der Mikrosomen, aus denen sie gereinigt wurden, zu einem Extrakt einer Nitratreduktase-defizienten Mutante konnte die Rekonstitution ihrer Aktivität gezeigt werden. Für eine erfolgreiche Nitratreduktion war hierbei die Zugabe eines externen Molybdäncofaktors erforderlich. Mittels der erhaltenen Ergebnisse konnte somit bewiesen werden, dass Schweinelebermikrosomen und die daraus gereinigte *N*-reduktive Fraktion auch einen funktionsfähigen Molybdäncofaktor enthalten.

Die darüber hinaus im Verlauf der Reinigung korrelierbare Anreicherung des Molybdäncofaktors und die durchgeführten Hemmstudien mit Natriummetavanadat bestätigen zudem die Beteiligung des Molybdoenzym an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in Lebermikrosomen.

Ob diese Komponente in der *N*-reduktiven Fraktion wirklich mikrosomalen Ursprungs ist, oder durch eine bei der Präparation entstandene mitochondriale Kontamination hervorgerufen wurde, konnte anhand enzymatischer und immunochemischer Verfahren nicht eindeutig geklärt werden. Sowohl der Nachweis der Aktivität von mitochondrialen Enzymen, als auch die Anwesenheit eines exklusiv in der, für die Benzamidoxim Reduktion in Mitochondrien verantwortlichen, äußeren mitochondrialen Membran lokalisierten Proteins, des

Voltage Dependent Anion Channel, zeigten nur eine sehr geringe Kontamination der Mikrosomen.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente nur um eines von drei an der Benzamidoxim Reduktion beteiligten Enzyme handelt und Mikrosomen und die äußere Mitochondrienmembran sich in der Quantität und Stöchiometrie der beiden anderen Enzyme unterscheiden. So liegt Cytochrom b_5 in Mikrosomen in einem etwa 10-fachen Überschuss gegenüber seiner Reduktase vor, während in der äußeren Mitochondrienmembran äquimolare Verhältnisse herrschen. Ein 10:1-Verhältnis zwischen Cytochrom b_5 und seiner Reduktase wird aber als optimal für die Benzamidoxim Reduktion postuliert.

So kann selbst die in der vorliegenden Arbeit nur in geringem Ausmaß gefundene Kontamination der Mikrosomen mit dem Protein der äußeren Mitochondrienmembran für die vorhandene Benzamidoxim Reduktase Aktivität verantwortlich sein.

6 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEN ARYLAMIDOXIMEN

6.1 EINFÜHRUNG

6.1.1 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Die Affinitätschromatographie ermöglicht die Isolierung und Reinigung von Proteinen basierend auf ihren biologischen Aktivitäten und Funktionen (Ostrove, 1990). Diese hochspezifischen Eigenschaften der Proteine sind für die ausgesprochene Leistungsfähigkeit der Methode verantwortlich (Phillips und Dickens, 2000; Mondal und Gupta, 2006).

Viele Proteine können spezifische, nicht-kovalente und reversible Bindungen mit bestimmten Molekülen eingehen, die als Liganden bezeichnet werden (Cuatrecasas, 1970). Zu ihnen zählen unter anderem Antikörper-Antigen-, Enzym-Substrat- oder Hormon-Rezeptor-Interaktionen.

Für eine Affinitätschromatographie wird ein spezifischer Ligand des zu isolierenden Proteins kovalent an ein Trägermaterial gebunden. Bleiben dabei die Bindungseigenschaften des Liganden erhalten, bindet das derivatisierte Trägermaterial selektiv das gesuchte Protein (Abb. 6.1). Schickt man eine Probe über diese stationäre Phase, so wird das gewünschte Protein spezifisch vom immobilisierten Liganden zurückgehalten, während der Rest von der Säule gewaschen werden kann. Die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein können bedingt durch Van-der-Waal's Kräfte oder durch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischer oder hydrophober Natur sein.

Durch Wahl geeigneter Elutionsbedingungen lässt sich im Anschluss das angereicherte Protein von der Matrix ablösen und in reiner Form gewinnen. Dies kann spezifisch durch Zugabe eines kompetitiven Liganden (Abb. 6.1) oder

unspezifisch durch Veränderungen des pH-Wertes, der Ionenstärke und der Polarität erfolgen (Phillips und Dickens, 2000).

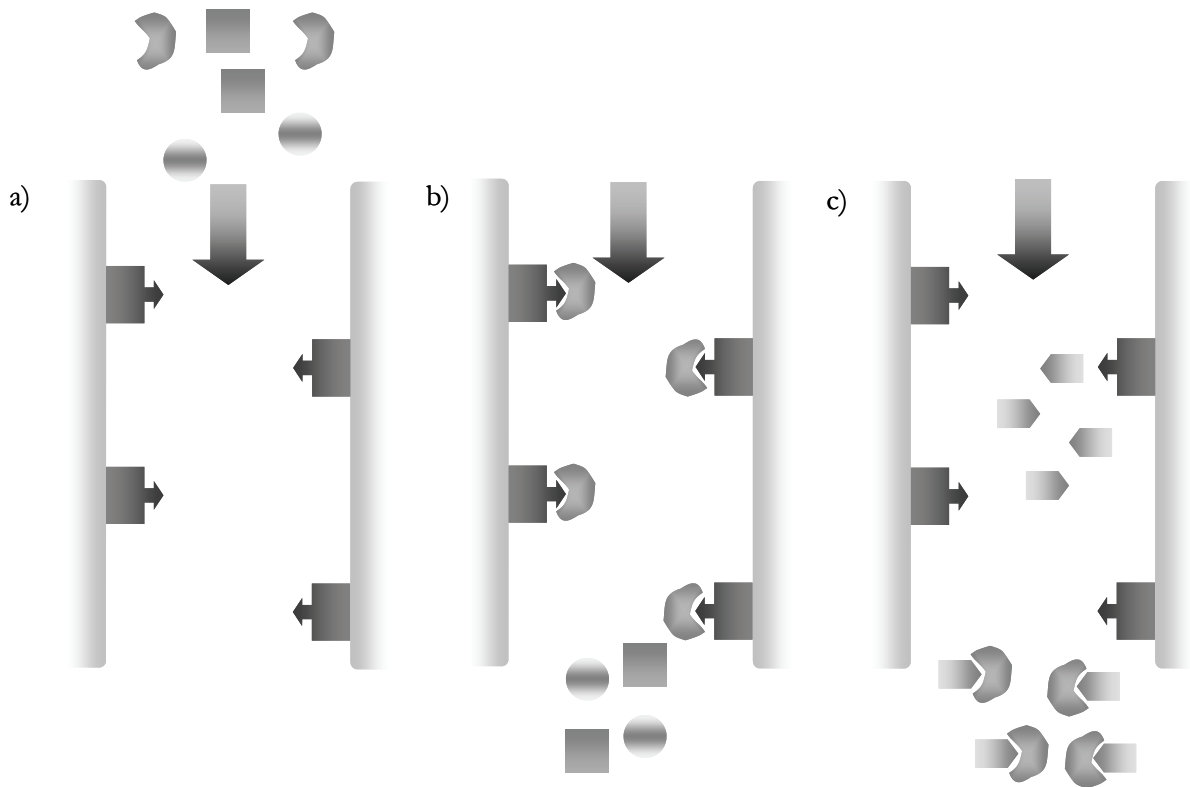


Abb. 6.1 Prinzip der Affinitätschromatographie: a) Proteinauftrag auf die Affinitätsmatrix, b) spezifische Proteinbindung und Elution ungebundener Proteine, c) spezifische Elution der gebundenen Proteine durch Zugabe eines kompetitiven Liganden

6.1.1.1 Trägermaterialien

Trägermaterialien, die für eine Affinitätschromatographie verwendet werden, müssen bestimmte Eigenschaften besitzen (Ostrove, 1990; Cuatrecasas, 1970). Wichtigste Voraussetzung ist das Vorhandensein von funktionellen Gruppen, an denen nach entsprechender Aktivierung die Liganden kovalent gebunden werden können. Um unerwünschte Wechselwirkungen mit den Proteinen zu vermeiden, sollte das Trägermaterial außerdem über neutrale und hydrophile Eigenschaften verfügen. Zusätzlich führt ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu einer

hohen Bindungskapazität und erleichtert die Interaktion von Liganden mit höhermolekularen Substanzen. Die weitere Verwendung des Trägermaterials, z. B. für die Derivatisierung zwecks Aktivierung und Autoklavierung zur Sterilisation erfordert eine gute chemische und physikalische Stabilität.

Quervernetzte Agarose, Dextrane und Polyacrylate zählen zu den Stoffen, die über diese Eigenschaften verfügen und vielfach in der Affinitätschromatographie zum Einsatz kommen (Ostrove, 1990; Phillips und Dickens, 2000).

6.1.1.2 Liganden

Liganden, die in der Affinitätschromatographie verwendet werden, sollten spezifische und reversible Bindungen mit hoher Affinität (Dissoziationskonstante $K_{\text{diss}} < 10 - 100 \mu\text{M}$) zu dem zu isolierenden Protein eingehen können (Kasche, 2001; Ohlson *et al.*, 1988). Dieser Komplex sollte ohne irreversible Veränderungen der beteiligten Partner durch einfache Variation des Mediums wieder dissoziierbar sein. Darüber hinaus muss ein Ligand über mindestens eine chemisch modifizierbare Gruppe verfügen, die eine Immobilisierung am aktivierten Trägermaterial ermöglicht, ohne dabei die spezifische Bindung an das Protein zu beeinflussen. Außerdem muss der Ligand mit den in Kupplungs- und Proteinbindungs- sowie Proteinelutionsprozessen verwendeten Reagenzien und Lösungsmitteln kompatibel sein (Phillips und Dickens, 2000).

6.1.1.3 Immobilisierung

Die Immobilisierung eines Liganden verläuft in drei Schritten. Im ersten Schritt wird das Trägermaterial aktiviert. Die Art und Weise der Aktivierung richtet sich dabei nach der im Liganden enthaltenen funktionellen Gruppe. Diverse Trägermaterialien dieser Art können in aktivierter Form kommerziell bezogen werden (Phillips und Dickens, 2000). Im zweiten Schritt erfolgt die Kupplungsreaktion des Liganden mit dem Trägermaterial. Verbleibende aktivierte Gruppen müssen zur Vermeidung von unerwünschten Wechselwirkungen im letzten Schritt durch geeignete Reagenzien deaktiviert werden (Ostrove, 1990).

Bei der Immobilisierung niedermolekularer Liganden wird häufig ein sogenannter Spacer verwendet, weil es zu sterischen Hinderungen zwischen der Matrix und dem zu isolierenden hochmolekularen Protein kommen kann. Der Spacer besteht aus einer linearen Molekülkette und ermöglicht dem Analyten ausreichend Zugang zum immobilisierten Liganden (Phillips und Dickens, 2000).

Spacer können sowohl über kommerziell erhältliche, modifizierte, aktivierte Trägermaterialien, als auch über eine zweite Reaktion eines zuvor konstruierten Spacers an die aktivierten Gruppen eingeführt werden. In jedem Fall wird der Ligand chemisch an die reaktive Gruppe des Spacer-Endes gebunden, die vom Trägermaterial am weitesten entfernt ist. Alternativ zur Verwendung eines Spacers kann auch der Ligand mit einer linearen Molekülkette versehen werden, die man in diesem Fall als Linker bezeichnet. Vorhersagen über die Eignung bestimmter Liganden in Kombination mit Linkern, Spacern und Trägermaterialien sind in der Regel nicht möglich, sondern müssen empirisch ermittelt werden. Ein Abstand, der dem von sechs bis acht Methylengruppen zwischen Ligand und Trägermaterial entspricht, ist in den meisten Fällen erfolgreich (Phillips und Dickens, 2000).

Affinitätschromatographien wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich an einer Reihe von niedermolekularen Arzneistoffen durchgeführt, wodurch Zielproteine dieser Verbindungen ermittelt werden konnten (Knockaert *et al.*, 2002).

6.1.2 THEMA UND ZIELSETZUNG

Die Identifizierung des für die Reduktion basischer, stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen verantwortlichen mikrosomalen Proteins ist für die Klärung des Aktivierungsmechanismus der Amidoxim-Prodrugs von großer Bedeutung.

Bei den in vorangegangenen Arbeiten gereinigten mikrosomalen Fraktionen handelte es sich stets um eine Mischung mehrerer Proteine (Kapitel 4). Um aus dieser vorgereinigten Fraktion das für die Benzamidoxim Reduktion verantwortliche Protein zu isolieren, sollte in dieser Arbeit eine Affinitätschromatographie als „polishing step“ der literaturbekannten Reinigung nachgeschaltet werden. Über die Immobilisierung des Substrates Benzamidoxim sollte damit spezifisch die substratbindende Komponente aus der *N*-reduktiven

mikrosomalen Fraktion an das Säulenmaterial gebunden und von den Begleitproteinen abgetrennt werden.

Bei Amidoximen war es naheliegend, die für die Anknüpfung vorgesehene Seitenkette in *para*-Position anzubringen, da die im Vorweg durchgeführten Struktur-Aktivitätsuntersuchungen gezeigt hatten, dass in dieser Position Substituenten ohne Abnahme der Reduktionsraten toleriert werden (Karhan, 2002; Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit).

6.2 METHODEN

6.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

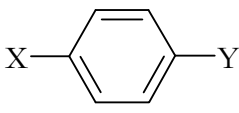
Sofern nicht anders angegeben, befindet sich eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit.

6.2.2 LIGANDEN FÜR DIE IMMOBILISIERUNG

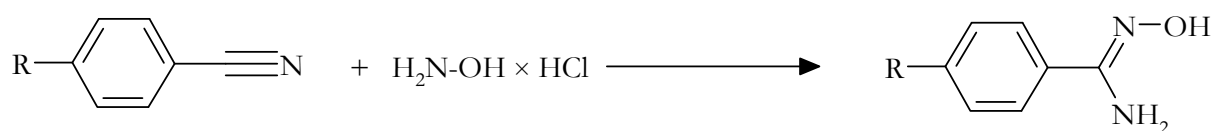
6.2.2.1 *Para*-substituierte Benzamidoximderivate, 4-Aminobenzamidin und 4-Amino-methylbenzonnitril

Eine Übersicht über die für die Immobilisierung verwendeten Liganden gibt Tab. 6.1.

Tab. 6.1 Für die Kupplung an das Trägermaterial verwendete Liganden

| Ligand |  | |
|--------|---|---------------------------|
| | X | Y |
| 1 | -NH ₂ | -C(NH ₂)=N-OH |
| 2 | -OH | -C(NH ₂)=N-OH |
| 3 | -NH ₂ | -C(NH ₂)=N-H |
| 4 | -H | -C(NH ₂)=N-OH |
| 5 | -C(NH ₂)=N-OH | -C(NH ₂)=N-OH |
| 6 | -CH ₂ -NH ₂ | -C(NH ₂)=N-OH |
| 7 | -CH ₂ -NH ₂ | -C≡N |

Die für die Immobilisierung verwendeten Liganden 4-Aminobenzamidoxim (**1**), 4-Hydroxybenzamidoxim (**2**) und Benzamidoxim (**4**) wurden ausgehend von den jeweiligen kommerziell erhältlichen Benzonitrilen über eine Reaktion mit Hydroxylamin erhalten (Abb. 6.2; Krüger, 1885; Tiemann, 1884; Girreser *et al.*, 2002), das Terephthaldiamidoxim (**5**) analog aus dem Benzodinitril (Bruton *et al.*, 2003; Klein und Fouty, 1968). Alle Produkte wurden durch Umkristallisation und/oder Säulenchromatographie aufgereinigt und von den jeweiligen Benzamiden, den Nebenprodukten der Reaktion, abgetrennt. Die Verbindungen lagen im Arbeitskreis vor und wurden nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisiert.

**Abb. 6.2 Reaktionsschema der Amidoximsynthese nach Krüger (1885) und Tiemann (1884)**

4-Aminobenzamidin (**3**) und 4-Aminomethylbenzonnitril (**7**) waren kommerziell erhältlich (Sigma, Taufkirchen).

4-Aminomethylbenzamidoxim (**6**) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert (Ho *et al.* 2002).

6.2.2 Benzamidoxime mit geschützten Amidoximfunktionen

Benzamidoxim wurde in Dichlormethan gelöst und Dihydropyran (DHP) sowie Pyridinium- *p*-Toluolsulfonat (PPTS) zugegeben. Die Umsetzung von Benzonnitril mit Tetrahydropyran (THP)-geschütztem Hydroxylamin wurde in Dioxan sowie in Dimethyl-formamid (DMF) in Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIPEA) durchgeführt.

6.2.3 MODELLKUPPLUNG DER LIGANDEN AN *N*-SUCCINIMIDYLPALMITAT

Die potentiellen Liganden (Kapitel 6.2.2) wurden zunächst an eine Modellverbindung gekuppelt. Verwendet wurde hierfür *N*-Succinimidylpalmitat (Sigma, Taufkirchen). Die Aktivierung über einen *N*-Succinimid-Ester ist damit analog zu der des Säulenmaterials, die eine Kupplung über primäre Aminfunktionen ermöglichen soll. Die Spacerlänge, über die das *N*-Succinimid an die Sepharose gebunden ist, beträgt 10 Methylengruppen. Diese ist bei *N*-Succinimidylpalmitat zwar etwas länger, wurde aber dennoch näherungsweise eingesetzt. Der Vorteil dieser Modellverbindung und der gekuppelten Produkte ist ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Diese ermöglicht daher eine Strukturaufklärung der gelösten Produkte mittels NMR-Spektroskopie.

6.2.3.1 Kupplung von 4-Aminobenzamidoxim (1), 4-Aminobenzamidin (3), Benzamid-oxim (4), 4-Hydroxybenzamidoxim (2), 4-Aminomethylbenzamidoxim (6) und 4-Aminomethylbenzocnitril (7)

Zur Modellkupplung wurden jeweils 176 mg *N*-Succinimidylpalmitat (0,5 mmol) in 50 ml Kupplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3), in dem 1 mmol des jeweiligen potentiellen Liganden gelöst war, suspendiert. Nach mindestens 12-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Rückstand abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen.

6.2.3.2 Kupplung von Terephthaldiamidoxim (5)

194 mg (1 mmol) Terephthaldiamidoxim (5) wurde in 50 ml Kupplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3), dem 20 % (v/v) DMSO zugesetzt waren, gelöst. Hierin wurden 176 mg *N*-Succinimidylpalmitat (0,5 mmol) suspendiert. Nach mindestens 12-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Rückstand abfiltriert und mehrmals zunächst mit 20 % (v/v) DMSO, dann mit Wasser gewaschen.

Der 20 %ige DMSO-Zusatz war nötig, um Terephthaldiamidoxim (5) in Lösung zu bekommen.

6.2.3.3 2-Stufen-Synthese: Amidoximsynthese nach Kupplung des 4-Aminobenzonitrils an *N*-Succinimidylpalmitat

Zur Modellkupplung wurden 440 mg *N*-Succinimidylpalmitat (1,25 mmol) in 50 ml Kupplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3), in dem 1,05 g (6,25 mmol) 4-Amino-methylbenzocnitril (7) gelöst war, suspendiert. Nach mindestens 12-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Rückstand abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen.

Der Rückstand wurde mit 1,04 g Hydroxylamin-Hydrochlorid (15 mmol) und 0,8 g Natrium-carbonat (7,5 mmol) in 16 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Wasser und Ethanol suspendiert. Nach 6-stündigem Rühren bei 65 °C wurde der Rückstand abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen.

6.2.4 NMR-SPEKTROSKOPIE

Die erhaltenen Verbindungen wurden mit Hilfe von ^1H -NMR- (300,13 MHz) und ^{13}C -NMR- (75,47 MHz) Spektren (Kernresonanzspektrometer ARX 300, Bruker, Rheinstetten) identifiziert. Die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden in $\text{DMSO}-d_6$ aufgenommen. Als innerer Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) verwendet.

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett; d = Dublett; dd = Dublett eines Dubletts; t = Triplet; dt = Dublett eines Triplets; J = Kopplungskonstante in Hz (1J = direkte Kopplung; 2J = geminale Kopplung; 3J = vicinale Kopplung). Die Auswertung erfolgte nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Des Weiteren wurden Inkrementberechnungen mittels ChemDraw Ultra 8.0 miteinbezogen.

6.2.5 TRÄGERMATERIAL

Für die Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Arylamidoximen wurde *N*-Hydroxysuccinimid-aktivierte-Sepharose (NHS activated Sepharose 4 Fast FlowTM, Amersham, Freiburg) verwendet. Diese dient zur kovalenten Bindung von Liganden mit primären Aminogruppen. Die Matrix besteht aus hochquervernetzter Agarose, an die ein 10-Atom Spacer (6-Aminohexansäure) über Epichlorhydrin gebunden ist. Die Aktivierung erfolgt mittels *N*-Hydroxysuccinimid (NHS). Liganden, die primäre Aminogruppen tragen, sollen schnell und spontan über einen nukleophilen Angriff an der Esterbindung kuppeln und eine stabile Amidbindung ausbilden (Abb. 6.3).

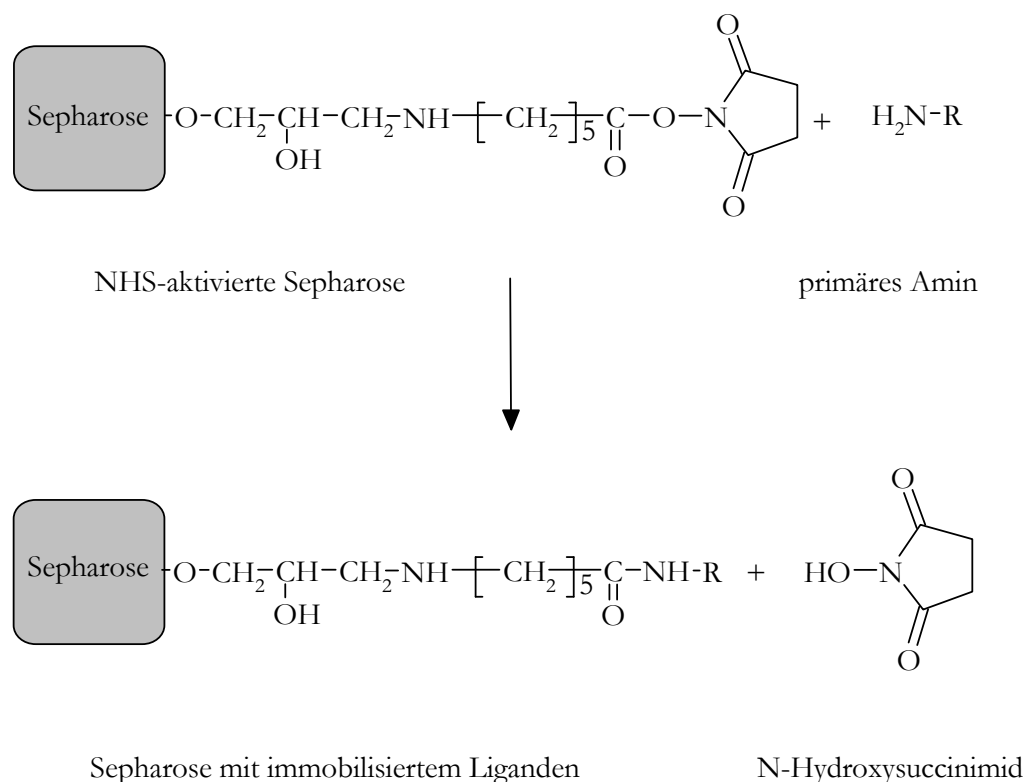


Abb. 6.3 Kupplung von Liganden mit primären Aminogruppen an die aktivierte Matrix

Eine analog aufgebaute Affinitätssäule mit immobilisiertem 4-Aminobenzamidin ist ebenfalls kommerziell erhältlich (Amersham, Freiburg) und wird vielfach für die Abtrennung von Serin-Proteasen verwendet (Braga *et al.*, 2007; Grant und Hermon-Taylor, 1976). Weil davon ausgegangen werden kann, dass die Spacerlänge für eine Wechselwirkung des niedermolekularen Liganden mit den entsprechenden Proteinen geeignet ist, wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung unternommen.

6.2.6 KUPPLUNGSREAKTION

Die Kupplungsreaktion erfolgte in einem wässrigen Kupplungspuffer pH 8,3 (Zusammensetzung s. Tab. 6.2). Es wurde eine Konzentration von ca. 50 μmol 4-Aminomethylbenzotrionitril (**7**) pro ml Trägermaterial-Suspension verwendet. Diese ist laut Herstellerangaben mit ca. 18 μmol freien NHS-Gruppen pro ml substituiert.

Nach Beendigung der Kupplungsreaktion wurden die verbleibenden aktivierten Gruppen durch alternierendes Waschen mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte (Block- und Waschpuffer, Zusammensetzung s. Tab. 6.2) deaktiviert. Schließlich wurde dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen und die Waschflüssigkeit durch Filtration über einen 0,45 µm Sartorius® Membranfilter abgetrennt.

Das fertig gekuppelte Trägermaterial wurde im Überschuss mit Hydroxylamin-Hydrochlorid und Natriumcarbonat in 16 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Wasser und Ethanol suspendiert. Nach 6-stündigem Rühren bei 65 °C wurde der Rückstand abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen (Ho *et al.*, 2002; Krüger, 1885).

Tab. 6.2 Puffer für die Ligandenkupplung an das aktivierte Säulenmaterial

| Kupplungspuffer, pH 8,3 | | Blockpuffer, pH 8,3 | | Waschpuffer, pH 4,0 | |
|-------------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| NaHCO ₃ | 0,2 M | Ethanolamin | 0,5 M | Acetat | 0,1 M |
| NaCl | 0,5 M | NaCl | 0,5 M | NaCl | 0,5 M |
| <i>Aqua bidest.</i> | | <i>Aqua bidest.</i> | | <i>Aqua bidest.</i> | |

Zur quantitativen Auswertung der Ligandenkupplung wurden 0,3 ml NHS-aktivierte Sepharose in den Einsatz eines Microcon™ YM100 (Millipore, Schwalbach) gegeben und das vorhandene Lösungsmittel durch zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 *g* abgetrennt. Anschließend wurde dreimal je 0,45 ml 1 mM gekühlte HCl zugegeben, kurz geschüttelt und erneut abzentrifugiert. 15 µmol 4-Aminomethylbenzotrinitril (**7**) wurden in 0,3 ml Kupplungspuffer gelöst, mit der vorbereiteten NHS-aktivierten Sepharose für zwei Stunden leicht geschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert.

Es folgte dreimaliges Waschen mit je 0,45 ml Kupplungspuffer und sechsmaliges Waschen alternierend mit Block- und Waschpuffer. Nach kurzem Schütteln wurde die Waschlösung durch Zentrifugation abgetrennt. Die erhaltenen Filtrate wurden zur quantitativen Auswertung der HPLC zugeführt (Kapitel 6.2.7).

6.2.7 HPLC-ANALYTIK ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON 4-AMINOMETHYLBENZONITRIL

Es wurde eine HPLC-Analytik unter Verwendung des folgenden HPLC-Systems entwickelt:

| | | |
|--------------------|--|----------------------------|
| HPLC-Pumpe: | Waters 616 Pumpe mit Controller (Waters, Milford, CT, USA) | |
| Detektor: | Waters 486 TAD UV-Detector (Waters, Milford, CT, USA) | |
| Autosampler: | Waters WISP 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA) | |
| Integrator: | EZChromElite™ Aufnahme und Auswertesoftware Version 2.8.3 (EZChromElite SS42ox Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA) | |
| 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: | 75 % 10 mM 1-Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> 25 % Acetonitril (v/v) | |
| Flussrate: | 1,0 ml/min | |
| Detektion: | $\lambda = 232 \text{ nm}$ | |
| Injektionsvolumen: | 10 µl | |
| Retentionszeit: | 4-Aminomethylbenzonitril | $16,7 \pm 0,5 \text{ min}$ |

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius® Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der Ligand 4-Aminomethylbenzonitril in definierten Konzentrationen (25, 50, 100, 250, 500, 1000 µM) im Fließmittel gelöst. Die Kalibriergerade war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ($r > 0,999$).

6.2.8 BATCH-SERIENVERSUCHE

Die Methodenentwicklung der chromatographischen Reinigung erfolgte an der in Kapitel 6.2.6 beschriebenen Affinitätsmatrix mit immobilisiertem Arylamidoxim.

Die Batch-Versuche wurden mit Schweinelebermikrosomen durchgeführt. Auf den Zusatz von Detergentien wurde verzichtet, weil diese die Bindung zwischen Protein und immobilisiertem Ligand beeinflussen (Robinson *et al.*, 1980). Stattdessen wurden größere Volumina an Proteinlösung mit geringeren Konzentrationen (2 mg/ml) eingesetzt.

6.2.8.1 Variation des pH-Wertes

Die Schweinelebermikrosomen wurden jeweils mit Bindungspuffer pH 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 und 8,0 (Zusammensetzung s. Tab. 6.3) auf einen Proteingehalt von 2 mg/ml eingestellt.

Tab. 6.3 Bindungspuffer für die Affinitätschromatographie

| Bindungspuffer | |
|---------------------------------|-------|
| KH ₂ PO ₄ | 10 mM |
| Na ₂ EDTA | 2 mM |
| DTT | 2 mM |
| <i>Aqua bidest.</i> | |

Die Serienversuche erfolgten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen, die jeweils mit 100 mg Affinitätsmatrix und 400 µl der entsprechenden Proteinlösung versetzt wurden. Parallel wurden für jeden pH-Wert entsprechende Ansätze ohne Trägermaterial pipettiert.

Die Proben wurden 30 Sekunden gevortext, 10 Minuten auf Eis äquilibriert, erneut 30 Sekunden gevortext und dann zwei Minuten bei 10000 g zentrifugiert, um die Affinitätsmatrix abzutrennen. Jeweils 50 µl des Überstandes wurden auf *N*-

reduktive Aktivität (Kapitel 6.2.9.1) geprüft. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

6.2.8.2 Bestimmung der Bindungskapazität

Die Schweinelebermikrosomen wurden mit Bindungspuffer pH 7,4 auf einen Proteingehalt von 2 mg/ml eingestellt. Die Serienversuche erfolgten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen, die mit ansteigenden Mengen Affinitätsmatrix (10, 100, 500 mg) und 400 µl Proteinlösung versetzt wurden. Parallel wurde ein doppelter Kontrollansatz ohne Trägermaterial pipettiert.

Die Proben wurden 30 Sekunden gevortext, 10 Minuten auf Eis äquilibriert, erneut 30 Sekunden gevortext und dann zwei Minuten bei 10000 g zentrifugiert, um die Affinitätsmatrix abzutrennen. Jeweils 50 µl des Überstandes wurden auf *N*-reduktive Aktivität (Kapitel 6.2.9.1) geprüft. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

6.2.8.3 Variation der Konzentration an kompetitivem Liganden

Die Schweinelebermikrosomen wurden jeweils mit Bindungspuffer pH 7,4, dem 0,5; 1,0; 2,0 oder 5,0 mM Benzamidoxim zugesetzt war, auf einen Proteingehalt von 2 mg/ml eingestellt.

Die Serienversuche erfolgten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen, die jeweils mit 100 mg Affinitätsmatrix und 400 µl der entsprechenden Proteinlösung versetzt wurden. Parallel wurden für jede Benzamidoxim-Konzentration entsprechende Ansätze ohne Trägermaterial pipettiert.

Die Proben wurden 30 Sekunden gevortext, 10 Minuten auf Eis äquilibriert, erneut 30 Sekunden gevortext und dann zwei Minuten bei 10000 g zentrifugiert, um die Affinitätsmatrix abzutrennen. Jeweils 50 µl des Überstandes wurden auf *N*-reduktive Aktivität (Kapitel 6.2.9.1) geprüft. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

6.2.8.4 Variation der Natriumchlorid-Konzentration

Die Schweinelebermikrosomen wurden jeweils mit Bindungspuffer pH 7,4, dem 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 oder 1,0 M Natriumchlorid zugesetzt war, auf einen Proteingehalt von 2 mg/ml eingestellt.

Die Serienversuche erfolgten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen, die jeweils mit 100 mg Affinitätsmatrix und 400 µl der entsprechenden Proteinlösung versetzt wurden. Parallel wurden für jede Salzkonzentration entsprechende Ansätze ohne Trägermaterial pipettiert.

Die Proben wurden 30 Sekunden gevortext, 10 Minuten auf Eis äquilibriert, erneut 30 Sekunden gevortext und dann zwei Minuten bei 10000 g zentrifugiert, um die Affinitätsmatrix abzutrennen. Jeweils 50 µl des Überstandes wurden auf *N*-reduktive Aktivität (Kapitel 6.2.9.1) geprüft. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

6.2.9 BESTIMMUNG DER *N*-REDUKTIVEN AKTIVITÄT

Die *N*-reduktive Aktivität wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit über die Reduktion des Modellsubstrates Benzamidoxim zum korrespondierenden Amidin bestimmt.

6.2.9.1 *In vitro* Inkubationsansatz mit mikrosomalen Präparationen

Die Inkubationen wurden bei 37 °C im Schüttelwasserbad in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Der Inkubationsansatz war wie folgt zusammengesetzt: 50 µl der entsprechenden Proteinprobe, 0,5 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates gestartet und nach 30 Minuten durch Zugabe von Methanol gestoppt. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 g abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

6.2.9.2 *In vitro* Inkubationsansatz des rekonstituierten Enzymsystems

Für die Inkubationen mit dem rekonstituierten Enzymsystem wurde zu der mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer gepufferten Suspension aus 200 pmol Cytochrom b_5 , 0,05 U NADH Cytochrom b_5 Reduktase und 50 μ l eluierter Fraktion bzw. 2 μ g *N*-reduktiver Komponente 40 μ M Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) zugesetzt und zwei Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde Benzamidoxim in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben und die Reaktion nach einer erneuten Vorinkubation von zwei Minuten mit 1 mM NADH gestartet. Die Ansatzgröße betrug 150 μ l. Nach 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit der gleichen Menge kaltem Methanol. Die Proben wurden 5 Minuten geschüttelt und das Protein durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 *g* abgetrennt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

6.2.10 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN IMMOBILISIERTEM ARYLAMIDOXIM

Die nach dem Verfahren von Clement *et al.* (1997) gereinigte mikrosomale *N*-reduktive Komponente (Kapitel 4.2.2.2) wurde mit Bindungspuffer pH 7,4 (Zusammensetzung s. Tab. 6.3) auf einen Proteingehalt von 3 mg/ml eingestellt. 1,2 ml dieser Proteinlösung wurden auf die mit Bindungspuffer (Zusammensetzung s. Tab. 6.3) konditionierte Affinitätschromatographiesäule (0,7 \times 7,5 cm, 3 ml Gelvolumen) aufgetragen. Nach dem Proteinauftrag wurde mit 50 ml Bindungspuffer nachgewaschen. Durch Zusatz des Elutionspuffers (1 M NaCl in Bindungspuffer pH 7,4) wurde anschließend über einen Gradientenmischer ein linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl über ein Volumen von 100 ml erzeugt und das Eluat in Fraktionen von 4 ml aufgefangen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei einer Flussrate von 0,4 ml/min und bei 4 °C. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mittels der in Kapitel 6.2.11 angegebenen Methoden untersucht. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

6.2.11 ÜBERPRÜFUNG DES REINIGUNGSVERLAUFES

6.2.11.1 Monitoring der *N*-reduktiven Aktivität

Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte wie in Kapitel 6.2.9.2 beschrieben über die Reduktion des Modellsubstrates Benzamidoxim zu Benzamidin.

6.2.11.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 4.2.5.1 beschrieben durchgeführt.

Die Proteinproben wurden nach vorheriger Aufkonzentrierung mittels Microcon™ YM10 (Millipore, Schwalbach) mit Probenauftragspuffer auf einen Proteingehalt von 5 µg pro Bahn verdünnt und ebenso wie der Größenmarker (Low Molecular Weight Standard, Amersham, Freiburg) für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert.

Die Detektion der Proteine erfolgte durch Silberfärbung (Kapitel 4.2.5.1.2).

6.3 ERGEBNISSE

6.3.1 STRUKTURAUFKLÄRUNG DER LIGANDENKUPPLUNG AN DIE MODELLVERBINDUNG *N*-SUCCINIMIDYLPALMITAT

Die Struktur der geknüpften Ligandenbindung wurde anhand von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren der erhaltenen Rohprodukte ermittelt. Auf eine Reindarstellung der gekuppelten Verbindungen wurde verzichtet.

Im Vergleich zu 4-Aminobenzamidin (**3**), für das eine erfolgreiche Kupplung über die aromatische Aminfunktion an NHS-aktivierte Sepharose beschrieben ist (Grant und Hermon-Taylor, 1976; Kanamori *et al.*, 1986), besitzt 4-Aminobenzamidoxim (**1**) zusätzlich die Hydroxylgruppe. Die *N*-Hydroxylierung der Amidinfunktion führt zu einer Erniedrigung ihrer Basizität (Clement, 2002). Dies kann die

Kupplungsreaktion dahingehend beeinflussen, dass durch die fehlende Protonierung bei einem pH-Wert des Kupplungspuffers von 8,3 ein zweites nukleophiles Agens vorhanden ist, welches selbst kuppeln kann. Vermutet wurde das nukleophile Zentrum am Amidoximsauerstoff. Für die Kupplung von 4-Aminobenzamidoxim (**1**) an *N*-Succinimidylpalmitat wird die Entstehung zweier möglicher Produkte postuliert (Abb. 6.4).

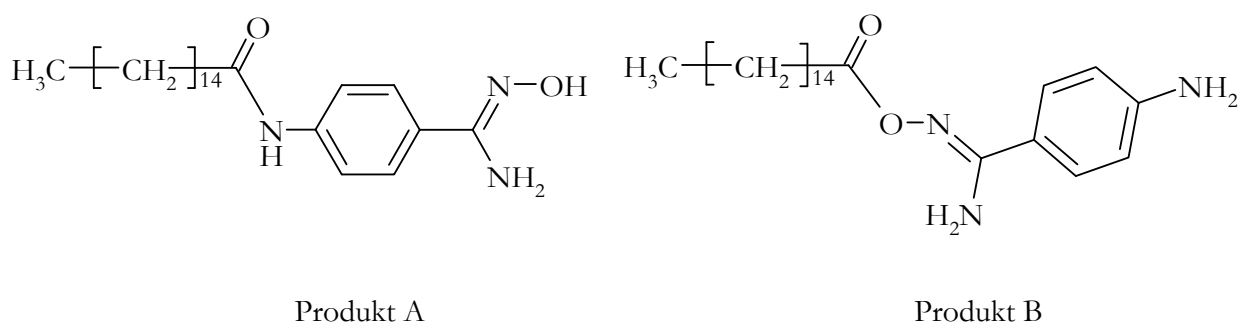


Abb. 6.4 Postulierte Kupplungsprodukte für 4-Aminobenzamidoxim (1**) mit *N*-Succinimidylpalmitat**

Die Durchführung der Ligandenkupplung an die Modellverbindung *N*-Succinimidylpalmitat ist in Kapitel 6.2.3 beschrieben.

Über Inkrementberechnungen (ChemDraw) wurden die chemischen Verschiebungen des Carbonyl-Kohlenstoffs sowie der aromatischen Kohlenstoffe im ^{13}C - und Wasserstoffe im ^1H -NMR Spektrum für beide denkbaren Produkte berechnet (Tab. 6.4). Vergleicht man die berechneten chemischen Verschiebungen mit den im Endprodukt tatsächlich gefundenen, können erste Hinweise auf die Art der Kupplung gefunden werden (Tab. 6.4).

Die tatsächlich gefundenen chemischen Verschiebungen des Carbonyl-Kohlenstoffs und der aromatischen Kohlenstoffe im ^{13}C - und Wasserstoffe im ^1H -NMR-Spektrum wichen von den theoretisch für das Produkt B (Abb. 6.4) berechneten weniger stark ab als von denen für das Produkt A (Abb. 6.4; Tab. 6.4). Eine Kupplung über den Amidoxim-Sauerstoff ist somit wahrscheinlicher als die

gewünschte Kupplung über die aromatische Aminfunktion, bei der die Amidoximstruktur erhalten bliebe.

Tab. 6.4 Kupplungsprodukt aus 4-Aminobenzamidoxim (1) und N-Succinimidylpalmitat: Tatsächlich gefundene chemische Verschiebungen des Carbonyl-Kohlenstoffs sowie der aromatischen Kohlenstoffe im ^{13}C - und Wasserstoffe im ^1H -NMR Spektrum im Vergleich zu theoretisch ermittelten

| Spektrum | Struktur A* | | | Struktur B* | |
|-----------------|--|---|-----------|---|-----------|
| | δ/ppm (gefunden) ^a | δ/ppm (berechnet) ^b | Differenz | δ/ppm (berechnet) ^b | Differenz |
| ^{13}C | 113,0 | 121,7 | 8,7 | 116,4 | 3,4 |
| | 119,6 | 124,3 | 4,7 | 118,7 | 0,9 |
| | 127,4 | 126,3 | 1,1 | 126,9 | 0,5 |
| | 149,8 | 139,9 | 9,9 | 149,8 | 0,0 |
| | 169,4 | 173,0 | 3,6 | 168,8 | 0,6 |
| | | | 28,0 | | 5,4 |
| ^1H | 6,51 | 7,60 | 1,09 | 6,50 | 0,01 |
| | 7,33 | 7,70 | 0,37 | 7,40 | 0,07 |
| | | | 1,46 | | 0,08 |

*s. Abb. 6.4

^aDie Aufnahmen der ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektren sind in Kapitel 6.2.4 beschrieben.

^bDie Inkrementberechnungen wurden mittels ChemDraw Ultra 8.0 durchgeführt.

Zusätzlich wurden noch die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 4-Aminobenzamidoxim (**1**, Abb. 6.5a)) und dem Kupplungsprodukt (Abb. 6.5b)) miteinander verglichen.

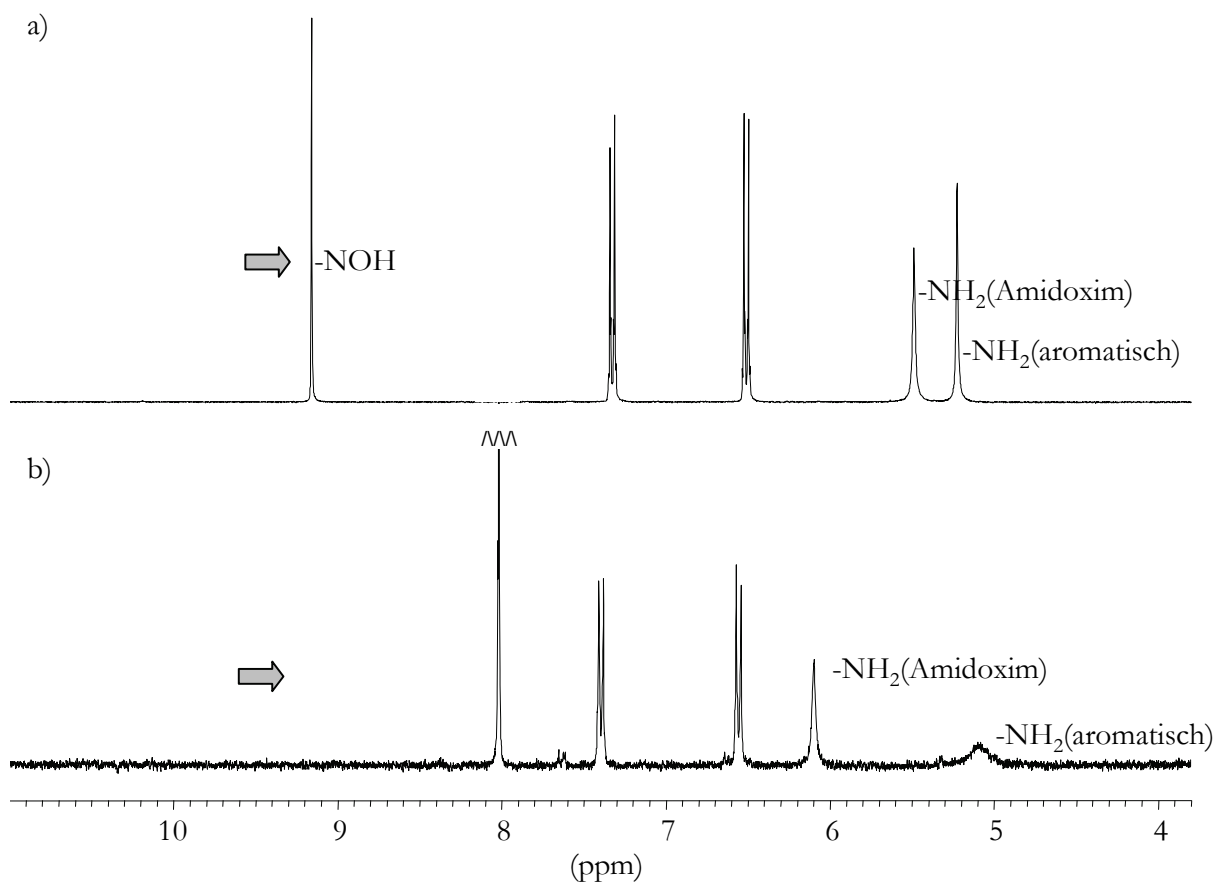


Abb. 6.5 $^1\text{H-NMR}$ Spektren von a) 4-Aminobenzamidoxim (**1**) und b) dem Kupplungsprodukt mit *N*-Succinimidylpalmitat, jeweils in DMSO-d_6

Die Aufnahme der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind in Kapitel 6.2.4 und die Durchführung der Ligandenkupplung an die Modellverbindung *N*-Succinimidylpalmitat in Kapitel 6.2.3 beschrieben.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4-Aminobenzamidoxim (**1**, Abb. 6.5a)) finden sich die breiten Singulett-Signale der NH_2 -Gruppen bei 5,22 und 5,49 ppm. Im aromatischen Bereich befinden sich 2 Dubletts. Diese zeigen die *para*-Substitution des Aromaten. Die Signale liegen bei 6,51 ppm ($^3J = 9,2$ Hz) und 7,33 ppm ($^3J =$

9,3 Hz). Bei einer Verschiebung von 9,16 ppm ist das Singulett-Signal der Hydroxylgruppe zu finden.

Im Vergleich dazu ist nach Kupplung an *N*-Succinimidylpalmitat (Abb. 6.5b)) das Signal der zur Amidoximfunktion gehörenden NH₂-Gruppe tieffeldverschoben zu 6,13 ppm und das der aromatischen NH₂-Gruppe stark verbreitert. Die Signalverbreiterung ist vermutlich auf die Anwesenheit saurer Verunreinigungen aus der Synthesaufarbeitung zurückzuführen. Besonders auffällig ist jegliches Fehlen des Hydroxylgruppen-Signals. Das Signal bei 8,06 ppm war bereits in der Ausgangsverbindung des *N*-Succinimidylpalmitats sichtbar und könnte durch nach Hydrolyse entstandenes *N*-Hydroxysuccinimid hervorgerufen werden.

Auch ein Signal für eine NH-Gruppe einer geknüpften Amidbindung konnte nicht gefunden werden. Dieses konnte für 4-Aminomethylbenzotrinitril (**7**) in Form eines Triplets bei 8,35 ppm ($^3J = 5,8$ Hz) gefunden werden.

Für die in Tab. 6.1 aufgeführten Liganden mit Amidoximfunktionen (**1**, **2**, **6**) wurden ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren erhalten, die analoge Charakteristika zeigten, auch mit dem in *para*-Position unsubstituierten Benzamidoxim (**4**). Terephthaldiamidoxim (**5**) zeigte unter den verwendeten Bedingungen gar keine Kupplung an *N*-Succinimidylpalmitat.

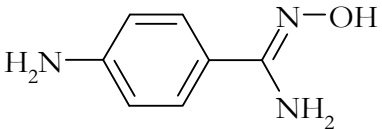
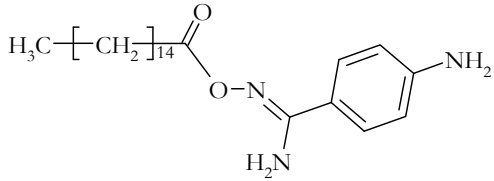
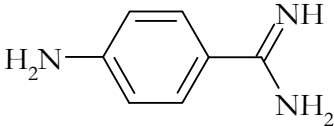
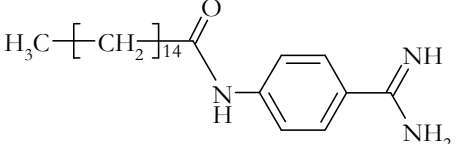
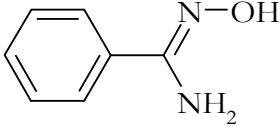
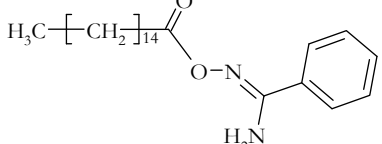
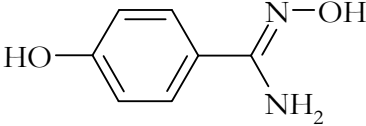
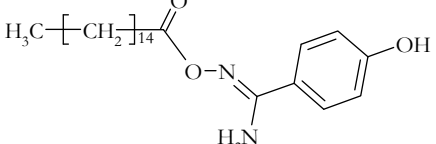
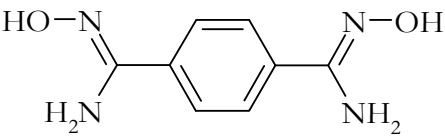
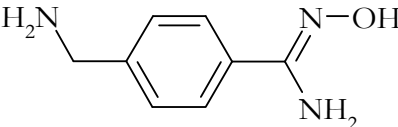
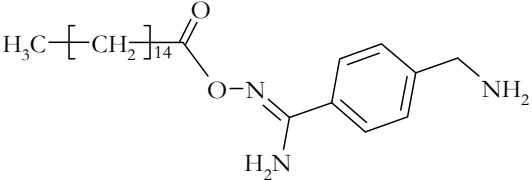
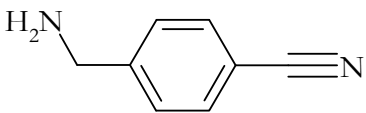
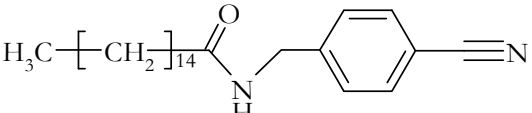
Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit aus den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren erhaltenen Ergebnissen wurden die in Tab. 6.5 dargestellten Strukturen für die jeweiligen Kupplungsprodukte ermittelt.

Von den an die Modellverbindung gekuppelten Verbindungen zeigten nur 4-Amino-benzamidin (**3**) und 4-Aminomethylbenzotrinitril (**7**) die gewünschte Kupplung über die *para*-Amino- bzw. -Aminomethyl-Funktion (Tab. 6.5).

Alle anderen getesteten Kupplungsliganden zeigten entweder gar keine Kupplungsreaktion oder kuppelten über den Amidoxim-Sauerstoff. Es konnte keine Verbindung mit einer freien Amidoximfunktion in einer einstufigen Reaktion erhalten werden (Tab. 6.5).

Auch ein aliphatisches Amin in 4-Aminomethylbenzamidoxim (**6**), welches ein im Vergleich zum aromatischen Amin stärkeres Nukleophil darstellt, kuppelt selektiv über den Amidoximsauerstoff (Tab. 6.5; Abb. 6.7 a)).

Tab. 6.5 Übersicht über die ermittelten Strukturen der mit den verschiedenen Liganden an die Modellverbindung *N*-Succinimidylpalmitat gekuppelten Produkte

| Kupplungsligand | Produkt |
|---|--|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  | --- |
|  |  |
|  |  |

6.3.2 SYNTHESESTRATEGIE ZUR EINFÜHRUNG VON SCHUTZGRUPPEN FÜR DEN SAUERSTOFF DER AMIDOXIMFUNKTION

Um zu verhindern, dass eine Kupplung über den Sauerstoff des Amidoxims erfolgt, sollte dieser mit einer Schutzgruppe versehen werden. Eine literaturbekannte Methode Hydroxylfunktionen so zu schützen, dass die Abspaltung der Schutzgruppe bereits in verdünnten Säuren erfolgen kann, ist die Bildung von Tetrahydropyran (THP)-Ethern (Kocienski, 2005). Um die Arylamidoxime mit geschützten Amidoximfunktionen zu erhalten, wurden die in Abb. 6.6 dargestellten Reaktionsvarianten getestet (s. Kapitel 6.2.2.2). Bei beiden Ansätzen konnte selbst nach mehrtägigen Reaktionszeiten keine Umsetzung zum gewünschten Produkt festgestellt werden.

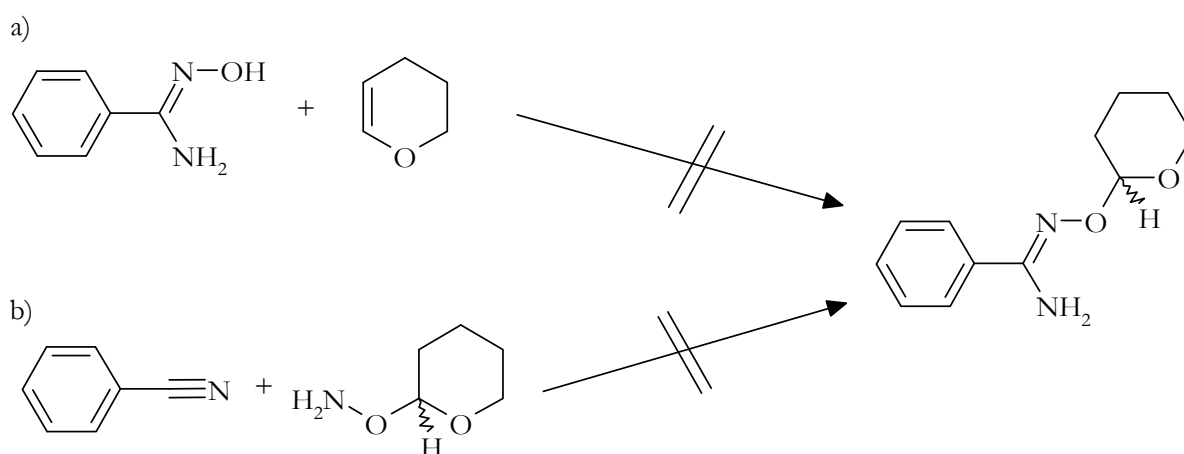


Abb. 6.6 Geplante Synthesen, um den Sauerstoff des Benzamidoxims zu schützen: a) Umsetzung von Benzamidoxim und DHP in Dichlormethan in Gegenwart von PPTS, b) Umsetzung von Benzonitril mit THP-geschütztem Hydroxylamin in Dioxan oder DMF unter Zusatz von DIPEA

Die Durchführung der Synthese für die Einführung der Schutzgruppe ist in Kapitel 6.2.2.2 beschrieben.

6.3.3 LIGANDENKUPPLUNG UNTER ERHALT DER AMIDOXIMFUNKTION

Die Kupplung des Liganden unter Erhalt der freien Amidoximfunktion sollte daher anschließend mit einer zweistufigen Reaktion, in der im ersten Schritt 4-Aminomethylbenzonitril (7) an die Modellverbindung gekuppelt wurde (Abb. 6.7 b)), erhalten werden.

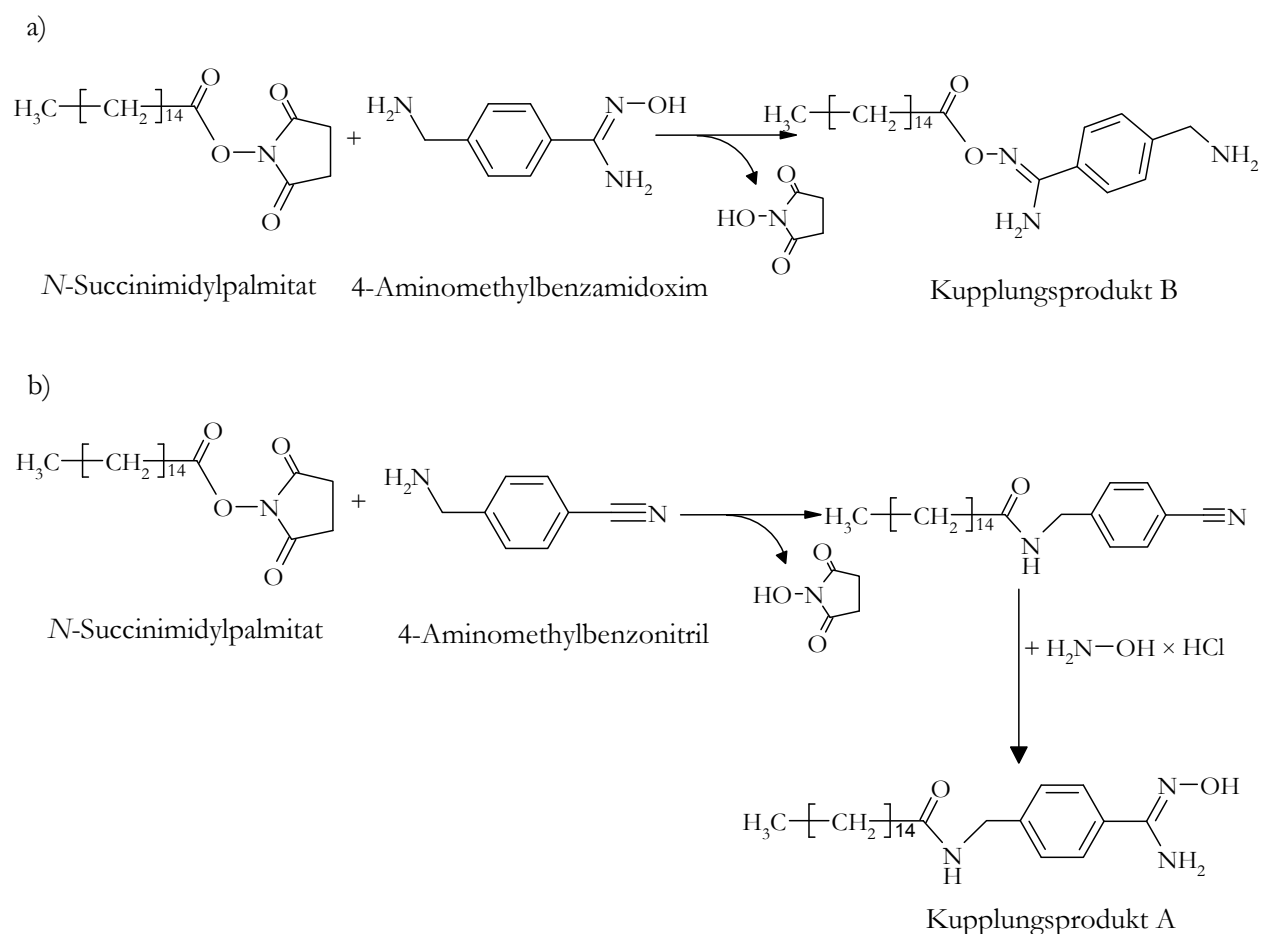


Abb. 6.7 Synthesestrategie zur Ligandenkupplung unter Erhalt der Amidoximfunktion: Kupplung von a) 4-Aminomethylbenzamidoxim (6), b) 4-Aminomethylbenzonitril (7) mit anschließender Umsetzung zum Amidoxim

Die Durchführung der Ligandenkupplung an die Modellverbindung N-Succinimidylpalmitat ist in den Kapiteln 6.2.3.1 und 6.2.3.3 beschrieben.

Die Kupplung lieferte das bereits in Tab. 6.5 dargestellte Produkt. Im zweiten Schritt wurde die Amidoximfunktion am fertig gekuppelten Produkt, wie in Kapitel 6.2.3.3 beschrieben, aufgebaut (Abb. 6.7 b); Tiemann, 1884; Krüger, 1885).

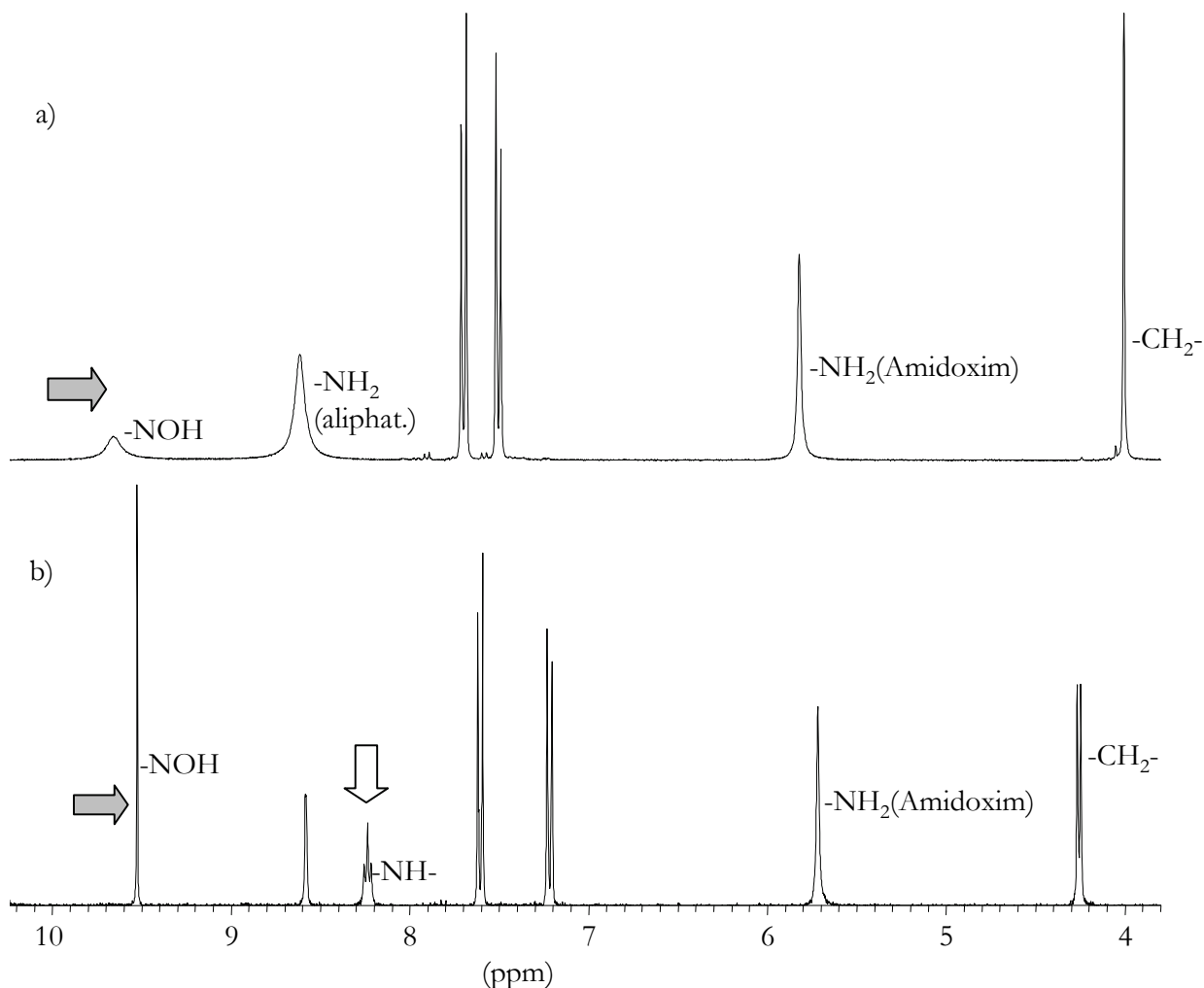


Abb. 6.8 $^1\text{H-NMR}$ Spektren von a) 4-Aminomethylbenzamidoxim (6) und b) dem Kupplungsprodukt von 4-Aminomethylbenzocnitril mit *N*-Succinimidylpalmitat nach anschließender Umsetzung mit Hydroxylamin, jeweils in DMSO-d_6

Die Aufnahmen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind in Kapitel 6.2.4 und die Durchführung der Ligandenkupplung an die Modellverbindung *N*-Succinimidylpalmitat in Kapitel 6.2.3.3 beschrieben.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 4-Aminomethylbenzamidoxim (6) und der entstandenen Verbindung sind in Abb. 6.8 dargestellt. Es konnte erstmals das

Signal der Hydroxylgruppe bei 9,52 ppm in der gekuppelten Verbindung gefunden werden (Abb. 6.8 b)), für 4-Aminomethylbenzamidoxim (**6**) lag dieses bei 9,65 ppm (Abb. 6.8 a)).

Auch anhand des Signals der NH-Gruppe einer geknüpften Amidbindung in Form eines Triplets bei 8,24 ppm ($^3J = 5,8$ Hz) konnte gezeigt werden, dass die zuvor geknüpfte Amidbindung unter den Reaktionsbedingungen stabil war und die Reaktion mit Hydroxylamin das gewünschte Produkt lieferte (Abb. 6.7 a)).

Bestätigt wird dieses Ergebnis zudem durch die Tieffeldverschiebung und die Kopplungskonstante des Dublett-Signals der Methylen-Wasserstoffe von 4,00 zu 4,25 ppm ($^3J = 5,9$ Hz).

Das Signal bei 8,58 ppm konnte nicht dem entstandenen Produkt zugeordnet werden und ist vermutlich auf eine Verunreinigung zurückzuführen, da auf eine weitere Aufreinigung der Rohprodukte verzichtet wurde.

Sowohl die Ergebnisse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums als auch die des Massenspektrums (Daten nicht gezeigt) zeigen unter den verwendeten Reaktionsbedingungen die vollständige Umsetzung des gekuppelten Nitrils zum Amidoxim.

6.3.4 LIGANDENDICHTE DES TRÄGERMATERIALS

Nachdem die Struktur der Ligandenkupplung mithilfe der Modellverbindung aufgeklärt werden konnte, wurde die an die Affinitätsmatrix gebundene Ligandenmenge, wie in Kapitel 6.2.6 beschrieben, quantitativ bestimmt. Hierzu wurde die unter 6.2.7 beschriebene HPLC-Methode verwendet.

Die auch nach mehrmaligem Waschen mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte nicht eluierbare, kovalent an 0,3 ml Affinitätsmatrix gebundene Ligandenmenge betrug 4,5 μmol . Dies entspricht einer Ligandendichte von 15 $\mu\text{mol/ml}$. Laut Herstellerangaben sind damit ca. 83 % der im Säulenmaterial vorhandenen freien *N*-Hydroxysuccinimid-Gruppen ersetzt worden.

Unter Verwendung der zur Modellkupplung identischen Reaktionsbedingungen kann von einer vollständigen Umsetzung des Nitrils zum Amidoxim ausgegangen werden (Kapitel 6.3.3).

6.3.5 ISOLIERUNG DER *N*-REDUKTIVEN KOMPONENTE

6.3.5.1 Methodenentwicklung mittels Batch-Verfahren

Durch Serienversuche im Batch-Verfahren wurden die optimalen Bedingungen für die Bindung der *N*-reduktiven Fraktion an der Affinitätsmatrix ermittelt.

Nicht nur in der Ionenaustausch- sondern auch in der Affinitätschromatographie kann der pH-Wert für die Proteinbindung an den immobilisierten Liganden eine wichtige Rolle spielen. In einer Serie von Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde das fertige Säulenmaterial vorgelegt, mit der auf verschiedene pH-Werte eingestellten Mikrosomensuspension versetzt und inkubiert (Kapitel 6.2.8). Parallel dazu wurden die gleichen Ansätze ohne Säulenmaterial inkubiert, um eine Aussage über die volle Aktivität bei den jeweiligen pH-Werten zu erhalten. Anschließend wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation abgetrennt. Die verbleibende Restaktivität des resultierenden Überstandes wurde nachfolgend bestimmt, um zu testen, ob die *N*-reduktiven Enzyme an der Affinitätsmatrix gebunden wurden.

Ab einem pH-Wert von 6,6 bis zum höchsten getesteten pH-Wert von 8 konnte nur noch etwa 45 % der Aktivität im Überstand detektiert werden (Abb. 6.9).

Das für die *N*-Reduktion verantwortliche Enzym in der gereinigten mikrosomalen Komponente musste demzufolge überwiegend an der Affinitätsmatrix gebunden vorliegen. Die Restaktivität ist vermutlich auf eine Überladung des Säulenmaterials mit Protein zurückzuführen.

Die weiteren Batch-Versuche und auch die folgende Affinitätschromatographie wurden bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 durchgeführt.

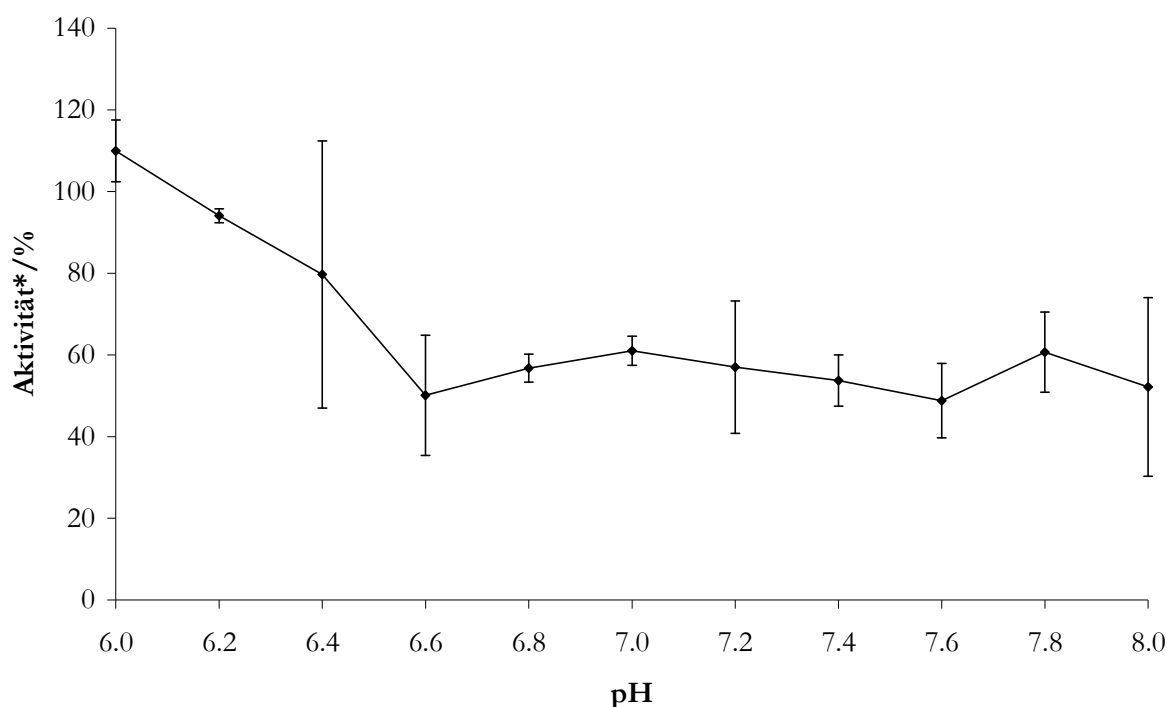


Abb. 6.9 Variation des pH-Wertes zur Bindung des N-reduktiven Enzymsystems an die Affinitätsmatrix

*Benzamidoxim Reduktase Aktivität der Kontrollansätze ohne Säulenmaterial entspricht 100 %.

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 400 μ l Mikrosomensuspension und 100 mg Säulenmaterial. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde die Affinitätsmatrix abzentrifugiert und 50 μ l des Überstandes auf N-reduktive Aktivität getestet. Kontrollansätze ohne zugesetztes Säulenmaterial wurden in gleicher Weise getestet. Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.9.1 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Nachdem noch eine N-reduktive Restaktivität von 45 % im Überstand zu finden war, wurde die Bindungskapazität der Affinitätsmatrix als nächster Parameter untersucht. Hierzu wurde bei konstanter zugesetzter Proteinmenge die vorgelegte Menge an Säulenmaterial variiert (Abb. 6.10).

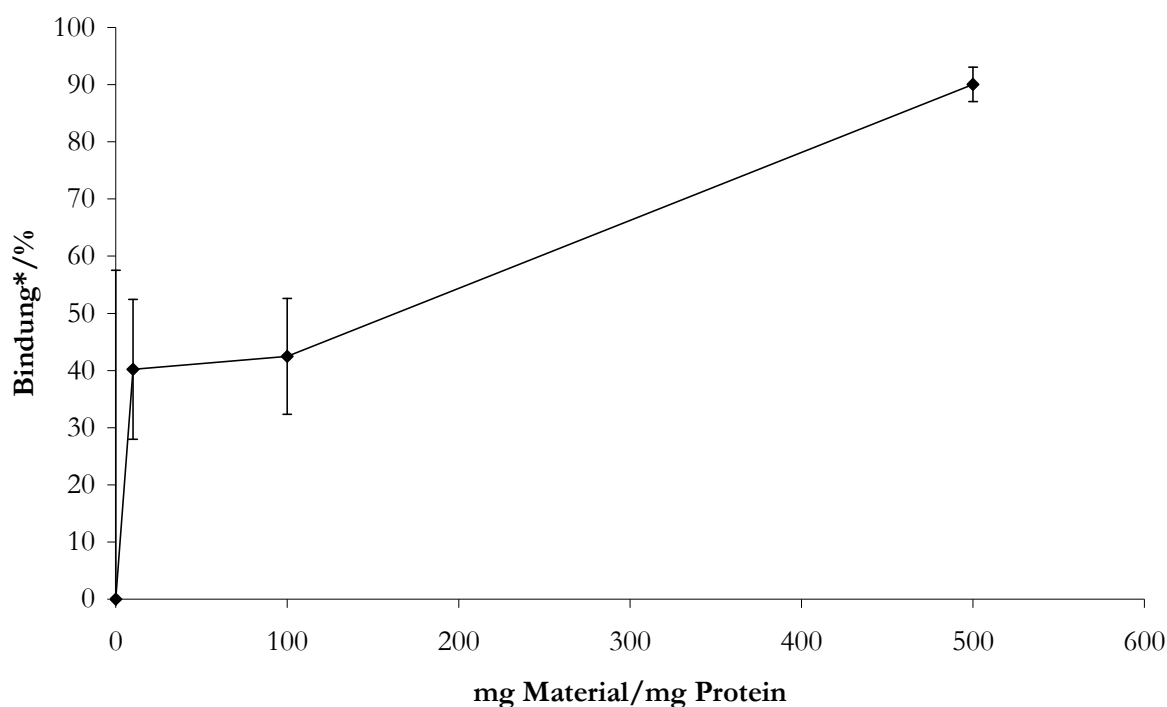


Abb. 6.10 Variation der Menge des Säulenmaterials für die Bindung des N-reduktiven Enzymsystems zur Ermittlung der Kapazität der Affinitätsmatrix

*Benzamidoxim Reduktase Aktivität der Kontrollansätze ohne Säulenmaterial entspricht 0 % Bindung.

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 400 μ l Mikrosomensuspension und 0 – 500 mg Säulenmaterial. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde die Affinitätsmatrix abzentrifugiert und 50 μ l des Überstandes auf N-reduktive Aktivität getestet. Kontrollansätze ohne zugesetztes Säulenmaterial wurden in gleicher Weise getestet. Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.9.1 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die maximale Bindung mindestens einer Komponente des N-reduktiven Enzymsystems erfolgte bei einem Affinitätsmatrix/Protein Massenverhältnis von \sim 500 (Abb. 6.10).

Als nächstes wurden die Elutionsbedingungen ermittelt. Eine spezifische Methode, die an eine Affinitätsmatrix gebundenen Proteine zu eluieren, ist die kompetitive Zugabe des immobilisierten Liganden (Abb. 6.11).

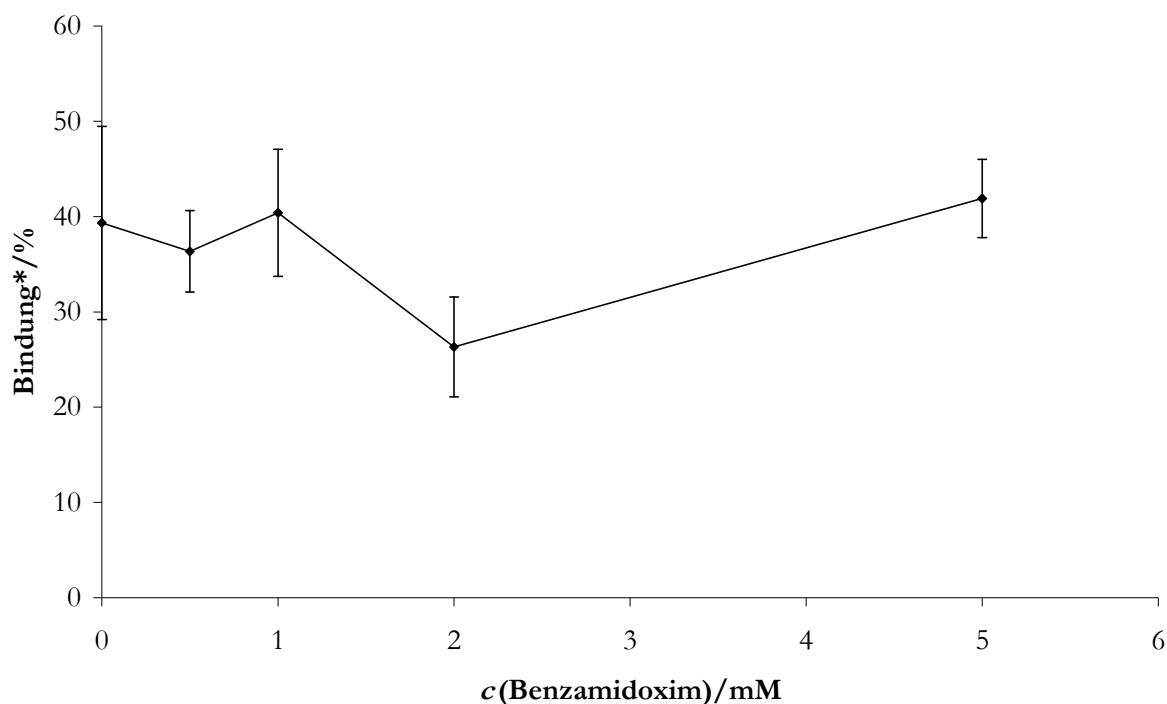


Abb. 6.11 Variation der Benzamidoximkonzentration zur Elution des N-reduktiven Enzymsystems von der Affinitätsmatrix

*Benzamidoxim Reduktase Aktivität der Kontrollansätze ohne Säulenmaterial entspricht 0 % Bindung.

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 400 μ l Mikrosomensuspension und 100 mg Säulenmaterial. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde die Affinitätsmatrix abzentrifugiert und 50 μ l des Überstandes auf N-reduktive Aktivität getestet. Kontrollansätze ohne zugesetztes Säulenmaterial wurden in gleicher Weise getestet. Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.9.1 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Zugabe von bis zu 5 mM Benzamidoxim als kompetitiven Liganden hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den an die Affinitätsmatrix gebundenen Anteil an *N*-reduktiver Fraktion (Abb. 6.11).

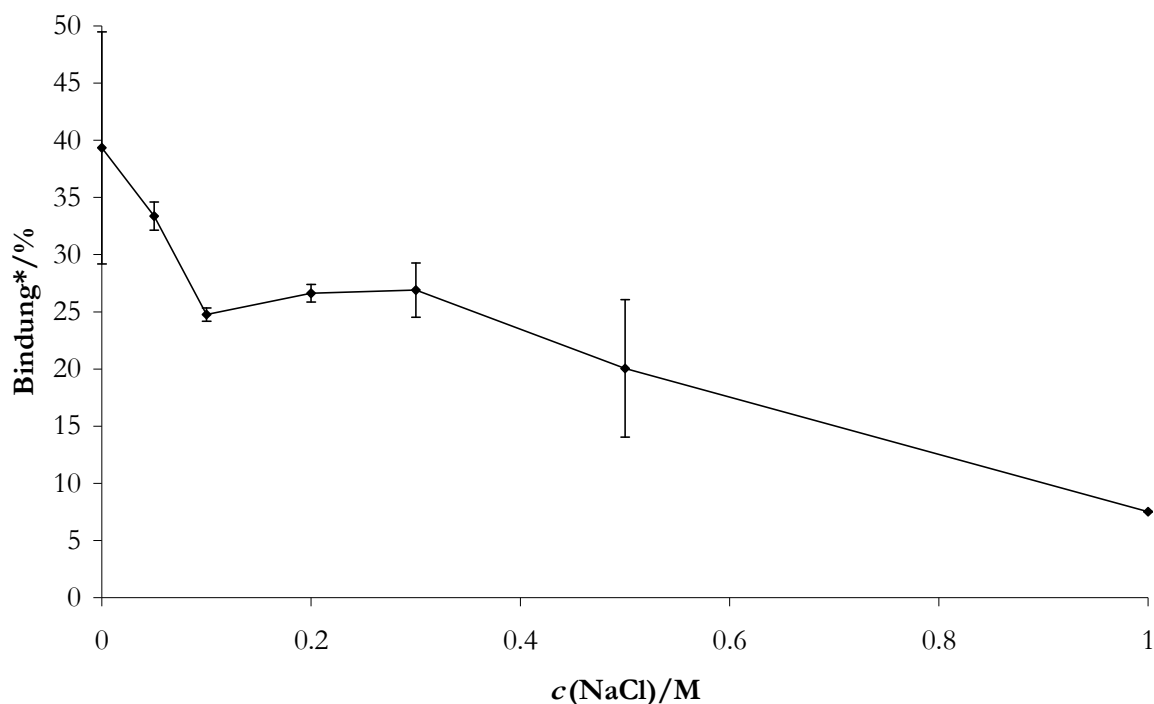


Abb. 6.12 Variation der Salzkonzentration zur Elution des *N*-reduktiven Enzymsystems von der Affinitätsmatrix

*Benzamidoxim Reduktase Aktivität der Kontrollansätze ohne Säulenmaterial entspricht 0 % Bindung.

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 400 μ l Mikrosomensuspension und 100 mg Säulenmaterial. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde die Affinitätsmatrix abzentrifugiert und 50 μ l des Überstandes auf *N*-reduktive Aktivität getestet. Kontrollansätze ohne zugesetztes Säulenmaterial wurden in gleicher Weise getestet. Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.9.1 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Nachdem mit steigenden Konzentrationen des kompetitiven Liganden die *N*-reduktive Komponente nicht eluiert werden konnte, wurden alternativ die Elutionsbedingungen durch Einstellung unterschiedlich hoher Salzkonzentrationen ermittelt (Abb. 6.12).

Bei einer 1 M Natriumchlorid-Konzentration lag nahezu die gesamte *N*-reduktive Aktivität wieder ungebunden im Überstand vor (Abb. 6.12).

6.3.5.2 Reinigung der *N*-reduktiven Komponente durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Arylamidoxim

Die chromatographische Trennung erfolgte aus der gereinigten mikrosomalen dritten Komponente (Kapitel 4.2.2.2). Basierend auf den Ergebnissen der Batch-Versuche (Kapitel 6.3.5.1) wurde ein chromatographisches Verfahren entwickelt, das die Abtrennung der *N*-reduktiven Komponente von den vorhandenen Verunreinigungen ermöglichen sollte.

Das Protein wurde bei pH 7,4 auf die Säule aufgetragen. Nicht gebundenes Protein wurde durch ausgiebiges Spülen der Säule mit dem Bindungspuffer in den Fraktionen 2 – 10 eluiert. Diese zeigten nach Rekonstitution mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase *N*-reduktive Aktivität (Abb. 6.13).

Durch Erhöhung der Ionenstärke (linearer Salzgradient 0 – 1 M NaCl) wurde in den Fraktionen 39 – 44 gebundenes Protein eluiert, welches nach Rekonstitution ebenfalls eine geringe *N*-reduktive Aktivität aufwies (Abb. 6.13).

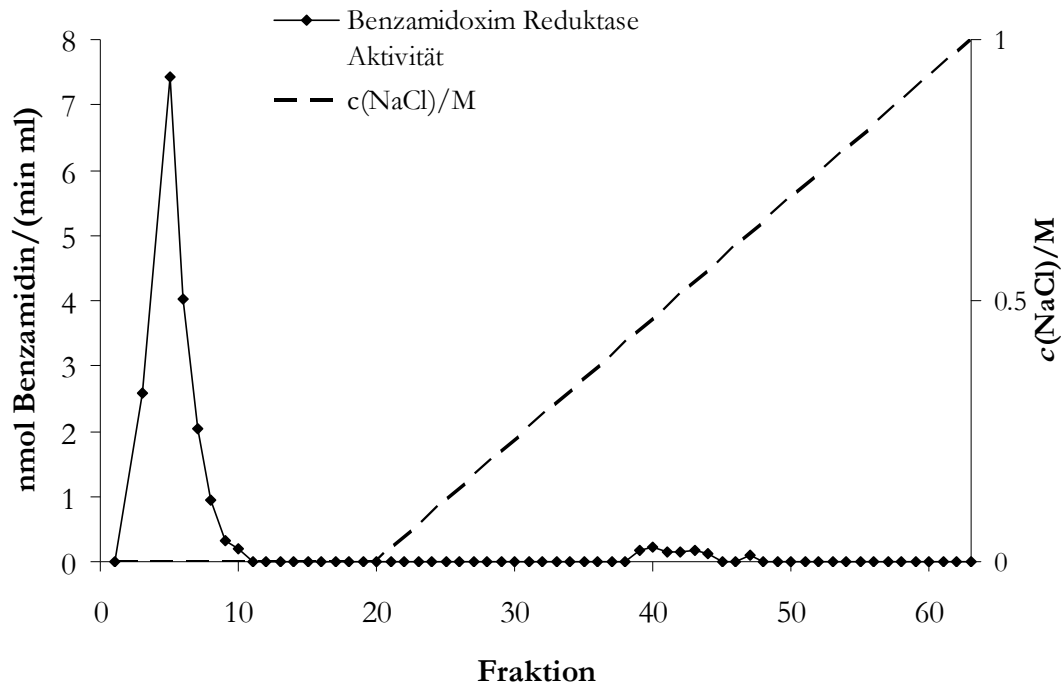


Abb. 6.13 Elutionsprofil der nach Affinitätschromatographie an immobilisiertem Benzamidoxim erhaltenen Fraktionen

In Bindungspuffer suspendierte, gereinigte mikrosomale dritte Komponente wurde auf die Säule aufgetragen und mittels eines linearen Salzgradienten eluiert (Kapitel 6.2.10). Je 50 μ l der erhaltenen Fraktionen wurden im rekonstituierten System gemeinsam mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase auf N-reduktive Aktivität getestet. Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.9.2 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind das Ergebnis von Einzelmessungen.

6.3.6 CHARAKTERISIERUNG DER AUFGETRENNTEN ENZYMFRAKTIONEN

6.3.6.1 Spezifische N-reduktive Aktivität

Zur Überprüfung des Reinigungsverlaufs von den aus der mikrosomalen N-reduktiven Komponente mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 6.3.5.2)

erhaltenen Fraktionen wurden zunächst die spezifischen *N*-reduktiven Aktivitäten bestimmt.

Die erhaltenen Fraktionen zeigten gegenüber dem Ausgangsprotein keine Anreicherung der spezifischen Aktivität (Tab. 6.6). Es wurde jedoch knapp die Hälfte der Proteinmenge abgetrennt.

Tab. 6.6 Reinigungstabelle der aus der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente nach Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen

| Stufe | Aktivität | Protein | Spezifische Aktivität ^a | Faktor | Ausbeute |
|--|-----------|---------|------------------------------------|--------|----------|
| | nmol/min | mg | nmol/(min mg) | | % |
| Mikrosomale <i>N</i> -reduktive Komponente | 443 | 3,6 | 123 | 1 | 100 |
| Fraktion 2 – 10 | 112 | 1,3 | 87 | 0,7 | 25 |
| Fraktion 39 – 44 | 4 | 0,3 | 14 | 0,1 | 0,9 |

^aspezifische Aktivität nmol Benzamidin/(min mg) von 5 µg der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente bzw. der Fraktionen im rekonstituierten Enzymsystem mit 200 pmol Cytochrom *b*₅ und 0,05 U NADH Cytochrom *b*₅ Reduktase

Durchführung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze sind in Kapitel 6.2.9.2 beschrieben. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Proteingehaltsbestimmung ist in Kapitel 2.2.3.1.1 beschrieben.

6.3.6.2 Reinheitsüberprüfung mittels SDS-PAGE

Der Reinigungsverlauf wurde auch anhand der Abnahme der Anzahl vorhandener Proteinbanden im SDS-Gel überprüft. Hierzu wurde eine SDS-PAGE, wie in

Kapitel 4.2.5.1 beschrieben, mit den aus der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente nach Affinitätschromatographie erhaltenen Fraktionen durchgeführt. Es konnte eine Abnahme der Zahl der Proteinspots erreicht werden (Abb. 6.14). Die bei der Affinitätschromatographie erhaltene Fraktion 2 – 10 (A) zeigte nur noch zwei deutliche Proteinspots bei 56 kDa und 35 kDa. In der Fraktion 39 – 44 (B) war nur noch die Doppelbande bei 59 und 56 kDa zu erkennen (Abb. 6.14). Die Bestimmung der Molekulargewichte ist in Kapitel 4.2.5.1.3 beschrieben.

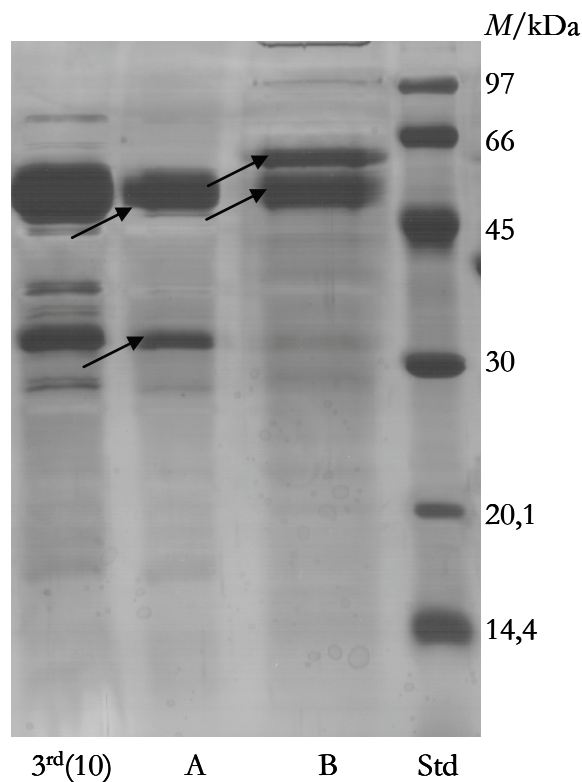


Abb. 6.14 Überprüfung der Reinheit der mikrosomalen dritten Komponente durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung

Std = Molekulargewichtsstandard (97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa)

3rd(10) = 5 µg gereinigte mikrosomale Komponente

A = 5 µg Fraktion 2 – 10

B = 5 µg Fraktion 39 – 44

6.4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine affinitätschromatographische Methode entwickelt, um die Benzamidoxim-affine Fraktion aus der vorgereinigten Proteinmischung der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente zu isolieren.

Wie alle analytischen Methoden, ist auch der Erfolg einer Affinitätschromatographie von einer Vielzahl äußerer Faktoren abhängig (Phillips und Dickens, 2000). Zu ihnen zählen Temperatur, pH-Wert, Inkubationszeit, Flussrate, Säulenausmaß, Ligandendichte und –orientierung sowie die Elutionsbedingungen.

Zunächst galt es, einen geeigneten Liganden zu finden. Die gängigste Methode zur Ligandenimmobilisierung stellt die Kupplung über primäre Aminfunktionen dar. Diese können aliphatischer oder aromatischer Natur sein (Pfeiffer *et al.*, 1982; Haga und Haga, 1983). In dieser Arbeit wurden verschiedene in *para*-Position zur Amidoximfunktion substituierte Arylamidoxime zur Immobilisierung verwendet, da bereits gezeigt werden konnte, dass in diesen Positionen Substituenten ohne Abnahme der Reduktionsrate toleriert werden (Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit; Karhan, 2002).

Als Matrix für die Affinitätschromatographie wurde eine *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) -aktivierte Sepharose mit einem 10-Atom-Spacer verwendet. Ein entsprechendes Benzamidin-substituiertes Säulenmaterial findet bereits breite Anwendung in der Affinitätschromatographie (Braga *et al.*, 2007; Grant und Hermon-Taylor, 1976; Kanamori *et al.*, 1986). NHS-Sepharose hat sich zudem als ein Säulenmaterial mit hoher Ligandenbindungskapazität und -stabilität erwiesen (van Sommeren *et al.*, 1993).

Die Arylamidoxime wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst an die Modellverbindung *N*-Succinimidylpalmitat gekuppelt, die das Säulenmaterial imitiert. Aufgrund der Löslichkeit dieser Modellverbindung und der nach Kupplung entstandenen Produkte in organischen Lösungsmitteln konnte die Struktur der geknüpften Bindung aufgeklärt werden. Die Kupplung erfolgt über einen nukleophilen Angriff an der Esterbindung des *N*-Succinimidylpalmitats bzw. der NHS-aktivierten Sepharose. Das zu dem entsprechenden Amidin analoge

4-Aminobenzamidoxim besitzt jedoch zwei nukleophile Funktionen. Neben der primären Aminfunktion ist auch für den Amidoximsauerstoff ein nukleophiler Angriff an Esterbindungen beschrieben (Prokop'eva *et al.*, 2004; Clement *et al.*, 2006b). Eine Kupplung kann nicht nur über die aromatische Aminfunktion sondern auch über den Amidoximsauerstoff erfolgen. Wie die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten NMR-Experimente zeigen konnten, erfolgt die Kupplung selektiv über den Amidoximsauerstoff.

Gleiche Ergebnisse wurden mit den weiteren *para*-substituierten Arylamidoximen erzielt. Während in der *para*-Position unsubstituiertes Benzamidoxim und 4-Hydroxybenzamidoxim ebenfalls über die Amidoxim-Funktion an die Modellverbindung kuppeln, zeigt Terephthaldiamidoxim gar keine Reaktion mit *N*-Succinimidylpalmitat.

Eine Kupplung über primäre aromatische Aminfunktionen ist zwar generell möglich (Haga und Haga, 1983; Grant und Hermon-Taylor, 1976), aber die Nukleophilie des Amidoximsauerstoffs scheint stärker zu sein als die des Stickstoffs, so dass nur darüber eine Ligandenbindung erfolgt. Um die Nukleophilie des Substituenten in der *para*-Position zu erhöhen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Arylamidoxim mit einer aliphatischen Seitenkette, 4-Aminomethylbenzamidoxim, nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert (Ho *et al.*, 2002; Krüger, 1885). Auch dieses kuppelt selektiv über die Oximfunktion, während die für die Synthese verwendete Ausgangsverbindung 4-Aminomethylbenzocarbonitril über die Aminomethyl-Gruppe gekuppelt werden konnte. Die Nukleophilie des primären aliphatischenamins ist also unter den Reaktionsbedingungen ebenfalls schwächer als die des Oximsauerstoffs.

Eine literaturbekannte Methode Hydroxylgruppen so zu schützen, dass die Abspaltung der Schutzgruppe bereits in verdünnten Säuren erfolgen kann, ist die Bildung von Tetrahydropyran (THP) -Ethern (Kocienski, 2005; Miyashita *et al.*, 1977). In der vorliegenden Arbeit wurden die entsprechenden 4-Aminomethyl-Derivate in verschiedenen Lösungsmitteln mit Dihydropyran bzw. THP-geschütztem Hydroxylamin umgesetzt. Eine Umsetzung des Amidoxims mit Dihydropyran erschien attraktiv, da nicht nur Alkohole in Gegenwart geeigneter Katalysatoren geschützt werden können, sondern auch Hydroxylgruppen, die elektronisch und sterisch einer Umsetzung mit Dihydropyran nicht so gut gegenüber stehen, wie z. B. Hydroxamsäuren (Kornreich-Leshem *et al.*, 2005). Der

Einsatz von THP-geschütztem Hydroxylamin zur Umsetzung des Benzonitrils erschien vielversprechend, da diese Umsetzungen in der Literatur mit Carbonsäuren und -estern zu Hydroxamsäuren (Becker *et al.*, 2005; Bouchain und Delorme, 2003) und mit Thioharnstoffen zu *N*-Hydroxyguanidinen beschrieben sind (Martin *et al.*, 2006). In diesen Fällen handelt es sich um Stoffklassen, die nicht allzu gut angreifbar durch vergleichsweise schwache Nukleophile, wie das sterisch anspruchsvolle THP-geschützte Hydroxylamin, sind. Es konnte jedoch keine Umsetzung zu den entsprechenden THP-geschützten Amidoximfunktionen erreicht werden, was möglicherweise durch die schlechte Löslichkeit der Ausgangsverbindungen in den verwendeten Lösungsmitteln zu erklären ist.

Weil eine direkte Kupplung der Amidoxime nicht möglich war, wurde die Ligandenkupplung in einer zweistufigen Reaktion durchgeführt. Durch die erfolgreiche Kupplung von 4-Aminomethylbenzonitril und anschließender quantitativer Umsetzung zum Amidoxim mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (Krüger, 1885; Tiemann, 1884) konnte in der vorliegenden Arbeit ein Arylamidoxim unter Erhalt seiner Amidoxim-Funktion an einem Trägermaterial immobilisiert werden.

Zur Beurteilung der Dichte des an das Säulenmaterial gebundenen Liganden wurde dessen Konzentration vor und nach Immobilisierung analysiert. Es wurde eine Ligandendichte von 15 $\mu\text{mol/ml}$ ermittelt, die mit der der kommerziell erhältlichen Benzamidin-Sepharose mit $>12 \mu\text{mol/ml}$ vergleichbar ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit eine Affinitätsmatrix mit immobilisiertem Arylamidoxim erfolgreich dargestellt werden.

Anschließend wurden die optimalen Methodenparameter für die Proteinbindung und -elution an die Affinitätsmatrix ermittelt. Wie zuvor aufgeführt, hängt die effektive Protein-Liganden-Wechselwirkung zunächst von der Temperatur ab. Viele biologische Systeme haben einen engen optimalen Temperaturbereich. Die für eine optimale Benzamidoxim Reduktion erforderliche Temperatur von 37 °C ist für eine Proteinreinigungsmethode nicht geeignet. Da die Proteine bei dieser Temperatur zu schnell an Aktivität verlieren, wurde die Reinigung bei 4 °C durchgeführt (Phillips und Dickens, 2000). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Wechselwirkung mit dem Liganden durch die niedrigere Temperatur negativ beeinflusst sein kann. Dies muss bei der Wahl der Inkubationszeit, die über die Flussrate und das Säulenausmaß variiert werden kann, berücksichtigt werden. Für affinitätschromatographische Trennungen werden Flussraten zwischen 0,4 und

1,5 ml/min empfohlen (Phillips und Dickens, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde mit 0,4 ml/min eine niedrige Flussrate gewählt, um dem Analyten ausreichend Zeit für eine Wechselwirkung zu geben. Außerdem wurde eine lange Säule mit geringem Innendurchmesser verwendet, ebenfalls mit dem Ziel, eine maximale Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand zu gewährleisten.

Der für die Proteinbindung optimale pH-Wert wurde mit Batch-Serienversuchen ermittelt. Eine maximale Proteinbindung wurde zwischen pH 6,6 und 8 erzielt. Ebenso erfolgte die Bestimmung der Kapazität des Säulenmaterials. Eine maximale Bindung der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente erfolgt bei einem Massenverhältnis von Affinitätsmatrix zu aufgetragenem Protein von 500:1. Diese Bindungskapazität ist vergleichbar mit der des von Havemeyer für die Isolierung der mitochondrialen *N*-reduktiven Komponente verwendeten Ionenaustauschers (Havemeyer, 2006).

Auch die Ermittlung der optimalen Elutionsbedingungen erfolgte mit Batch-Serienversuchen. Hierfür können verschiedene Methoden Anwendung finden: Variationen im pH-Wert oder der Ionenstärke, sowie der Zusatz chaotroper Salze oder eines kompetitiven Liganden (Phillips und Dickens, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings keine spezifische Elution der gebundenen Proteine durch Zugabe eines kompetitiven Liganden erreicht werden. Mögliche Ursachen hierfür könnten entweder eine zu feste Bindung des Proteins an den immobilisierten Liganden oder eine unspezifische Bindung an das Säulenmaterial sein. Eine zu feste Bindung tritt auf, wenn das Protein mehrere Bindungsstellen für den Liganden besitzt oder die Affinitätsmatrix hochsubstituiert ist. Eine unspezifische Bindung entsteht, wenn z. B. die Liganden Ladungen tragen, die die Affinitätsmatrix in einen Ionenaustauscher verwandeln, oder durch hydrophobe Spacer die Affinitäts- in eine hydrophobe Chromatographie umgewandelt wird.

Eine Veränderung der Ionenstärke durch Zusatz neutraler Salze ist auch in der Affinitätschromatographie für die Elution von gebundenen Proteinen geeignet (Robinson *et al.*, 1981; Phillips und Dickens, 2000) und konnte für die in dieser Arbeit verwendete Methode eingesetzt werden.

Die ermittelten optimalen Methodenparameter wurden auf das säulenchromatographische Verfahren übertragen. Die Proteine wurden in salzfreiem Puffer bei physiologischem pH-Wert auf die Säule aufgetragen,

nachgewaschen und durch lineare Erhöhung der Salzkonzentration eluiert. Da die Puffer keine Eigenabsorption im UV-Bereich zeigten, war eine UV-Detektion der säulenchromatographisch eluierten Proteine bei 280 nm theoretisch möglich. Die insgesamt aufgetragene Proteinmenge war jedoch so gering, dass in den eluierten Fraktionen ohne vorherige Aufkonzentrierung kein Protein nachweisbar war.

Der Reinigungsverlauf wurde stattdessen spezifisch anhand der enzymatischen Aktivität nach Rekonstitution mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase verfolgt. Es wurden zwei *N*-reduktive Fraktionen, die erste mit der höheren spezifischen Aktivität bereits mit dem salzfreien Auftragspuffer und die zweite mit niedrigerer spezifischer Aktivität mit dem salzhaltigen Elutionspuffer, eluiert.

Dieses Elutionsprofil von zwei *N*-reduktiven Fraktionen konnte in einer unabhängig durchgeführten Reinigung bestätigt werden. Die Elution der *N*-reduktiven Fraktion, die nicht am Säulenmaterial gebunden hat, könnte auf eine Proteinüberladung der Affinitätsmatrix zurückzuführen sein. Die zuvor ermittelte Kapazität erfolgte jedoch mit Schweinelebermikrosomen und nicht mit der *N*-reduktiven Komponente, die durch ihre im Vergleich zu Schweinelebermikrosomen größere spezifische Benzamidoxim Reduktase Aktivität auch mehr Benzamidoxim-affines Protein enthält. Darüber hinaus können die weiteren zuvor angesprochenen Methodenparameter, wie Ligandendichte, Temperatur oder Inkubationszeit dafür verantwortlich sein, dass die derivatisierte Matrix das entsprechende Protein nur zu einem kleinen Prozentsatz bindet.

Die in der vorliegenden Arbeit nach säulenchromatographischer Reinigung an immobilisiertem Arylamidoxim erhaltenen Proteinfractionen zeigten gegenüber der eingesetzten mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente keine angereicherte spezifische Enzymaktivität. Bei einer Ausbeute von 25 % der Gesamtaktivität besitzt die nicht gebundene Fraktion etwa 70 % der spezifischen Benzamidoxim Reduktase Ausgangsaktivität und die gebundene Fraktion nur etwa 10 % (Tab. 6.6). Die nach der Affinitätschromatographie gewonnenen *N*-reduktiven Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. In dem erhaltenen Gel waren im Vergleich zur aufgetragenen mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente weniger Proteinbanden zu erkennen. Begleitproteine konnten demnach abgetrennt werden. Da beide erhaltenen Fraktionen Benzamidoxim Reduktase Aktivität zeigten, müsste sich das für die Benzamidoxim Reduktion verantwortliche Protein folglich in der in

beiden *N*-reduktiven Fraktionen vorkommenden Proteinbande, also der bei 56 kDa, befinden. Andererseits zeigt die aktivere Fraktion A deutlich eine 35 kDa Bande, die in der weniger aktiven Fraktion B kaum noch zu erkennen ist. Diese könnte ebenfalls das entsprechende Protein beinhalten und aufgrund der geringeren spezifischen Aktivität in der Fraktion B nicht mehr nachweisbar sein. Denkbar wäre darüber hinaus, dass es zwei für die Benzamidoxim Reduktion verantwortliche Proteine in Mikrosomen gibt. Das 35 kDa-Protein wird bereits in Fraktion A eluiert und ist für den überwiegenden Anteil der mikrosomalen Benzamidoxim Reduktase Aktivität verantwortlich. Ein weiteres Protein, eluiert in Fraktion B, möglicherweise sogar ein Cytochrom P450 Enzym, ist aber ebenfalls in der Lage, *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren, wenn auch mit wesentlich geringerer spezifischer Aktivität. Bedingt durch die geringe spezifische Aktivität kann möglicherweise auch keine *N*-Reduktion in rekombinanten Präparationen, deren Umsetzungsraten nie die der nativen Systeme erreichen können, nachgewiesen werden.

Aufgrund fehlender Anreicherung der spezifischen Benzamidoxim Reduktase Aktivität konnte somit nicht endgültig geklärt werden, in welcher der Banden sich das für die Benzamidoxim Reduktion verantwortliche Protein befindet.

Durch die in der vorliegenden Arbeit entwickelte säulenchromatographische Reinigungsmethode mit immobilisiertem Arylamidoxim konnte nicht die erhoffte Isolierung des nach Rekonstitution mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase für die Benzamidoxim Reduktion verantwortlichen Proteins aus der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente erreicht werden. Eine mögliche Ursache dafür, dass die an die Affinitätsmatrix gebundene Fraktion eine geringere spezifische Aktivität besitzt als das aufgetragene Protein, könnte die Anwesenheit hemmender Bestandteile im Elutionspuffer sein. Die hier enthaltene hohe Konzentration von Natriumchlorid beeinflusst erwiesenermaßen die Aktivität der Proteine. Für den massiven Abfall der spezifischen Aktivität dieser eluierten Fraktion scheint dies jedoch unwahrscheinlich, nachdem in den Batch-Serienversuchen zur Ermittlung der optimalen Elutionsbedingungen auch bei einer einmolaren Salzkonzentration noch eine zufriedenstellende Benzamidoxim Reduktion messbar war.

Neben den bereits zuvor erläuterten Parametern, die für eine erfolgreiche Affinitätschromatographie eine Rolle spielen können, erfordert, wie in Kapitel

6.1.1.2 erläutert, diese eine ausreichende Affinität zwischen Ligand und zu reinigendem Protein. Die Dissoziationskonstante zwischen der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente und Benzamidoxim wurde in der vorliegenden Arbeit aus der für die Benzamidoxim Reduktion ermittelten Michaelis-Menten-Konstante von 120 μM abgeleitet (Lomb, 1995). Diese ist jedoch im Vergleich zu anderen Enzym-Substrat-Komplexen, für die erfolgreiche Affinitätschromatographien durchgeführt werden, verhältnismäßig hoch. Ausreichende Affinität wird in der Regel bei Dissoziationskonstanten kleiner als 10 – 100 μM erreicht (Ohlson *et al.*, 1988; Kasche, 2001). Beispielsweise liegt auch die Dissoziationskonstante für den Trypsin-4-Aminobenzamidin-Komplex mit 1,6 μM wesentlich niedriger (Turkova, 1978). Diese geringe Affinität zwischen Enzym und Substrat ist wahrscheinlich für die fehlende Proteinbindung verantwortlich. Auch die ermittelte niedrige Bindungskapazität deutet darauf hin, dass es sich um ein niedrig-affines System handelt oder die Proteinbindung sogar nur auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Die fehlende Affinität könnte darüber hinaus auch durch den bislang ungeklärten Mechanismus der Reduktion bedingt sein. Während zunächst eine Komplexierung der dritten hämhaltigen Komponente durch Benzamidoxim angenommen wurde (Clement, 2002), ergibt sich aus der alleinigen Umsetzung von Benzamidoxim durch Cytochrom b_5 und seine Reduktase ein neuer mechanistischer Ansatz. Der aktivitätssteigernde Effekt könnte auch durch eine durch die mikrosomale dritte Komponente vermittelte Verstärkung der Interaktion von Cytochrom b_5 und seiner Reduktase hervorgerufen werden (Clement *et al.*, 2005). Hierbei erfolgt keine Substratbindung an die mikrosomale *N*-reduktive Komponente, es muss also nicht zwangsläufig eine Affinität bestehen.

Als eine alternative affinitätschromatographische Methode zur Isolierung des für die Benzamidoxim Reduktion verantwortlichen Proteins in Mikrosomen ist eine Immobilisierung des gegen die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente gerichteten Antikörpers denkbar. Die Beteiligung dieses Proteins an der mikrosomalen Reduktion basischer, stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen konnte in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden (Kapitel 4, Kapitel 5). Eine quantitative Abtrennung über eine Immunoaffinitätschromatographie ermöglicht dann eine Aussage darüber, ob weitere Proteine an der mikrosomalen

Benzamidoxim Reduktion beteiligt sind. Dies soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6.5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Identifizierung des für die Benzamidoxim-Reduktion verantwortlichen Proteins aus der vorgereinigten mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente über eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Arylamidoximen.

Es wurden verschiedene in *para*-Position zur Amidoximfunktion substituierte Arylamidoxime als potentielle Liganden für eine Immobilisierung untersucht, weil im Vorweg gezeigt werden konnte, dass in diesen Positionen Substituenten ohne Abnahme der Reduktionsraten toleriert werden.

Die reaktive Amidoximfunktion verhinderte jedoch eine direkte Ligandenkupplung an ein aktiviertes Trägermaterial. Eine Immobilisierung eines Arylamidoxims unter Erhalt seiner Amidoxim-Struktur wurde in der vorliegenden Arbeit über die Kupplung eines *para*-substituierten Benzonnitrils erreicht, welches anschließend zum Amidoxim umgesetzt wurde.

Für die erfolgreich dargestellte Affinitätsmatrix wurden Methodenparameter für eine optimale Proteinbindung und -elution ermittelt und anschließend eine säulenchromatographische Reinigungsmethode entwickelt. Die an die Affinitätsmatrix gebundenen Proteine zeigten zwar eine Reduktion der Zahl der Begleitproteine, jedoch keine Anreicherung der spezifischen Benzamidoxim Reduktase Aktivität im Vergleich zum Ausgangsprotein.

Eine Isolierung des nach Rekonstitution mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase für die Benzamidoxim Reduktion verantwortlichen Proteins basierend auf seiner Funktion konnte somit nicht erreicht werden. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine zu geringe Affinität von Enzym und Substrat. Diese könnte zudem auch durch den bislang ungeklärten Reduktionsmechanismus bedingt sein. Der aktivitätssteigernde Effekt der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente auf die Reduktionsrate *N*-hydroxylierter

Verbindungen wird möglicherweise durch eine durch die dritte Komponente vermittelte Verstärkung der Interaktion von Cytochrom b_5 und seiner Reduktase hervorgerufen. Der so postulierte Mechanismus erfordert keine Substratbindung an die mikrosomale *N*-reduktive Komponente und somit auch keine Affinität.

7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den enzymatischen Grundlagen der mikrosomalen Reduktion stark basischer *N*-hydroxylierter Amidin- und Guanidin-Strukturen.

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Reduktion verschiedener Arylamidoxime durch mikrosomale Enzyme bereits untersucht. In dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung des reduktiven Metabolismus der zu den Arylamidoximen analogen *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine (Abb. 7.1).

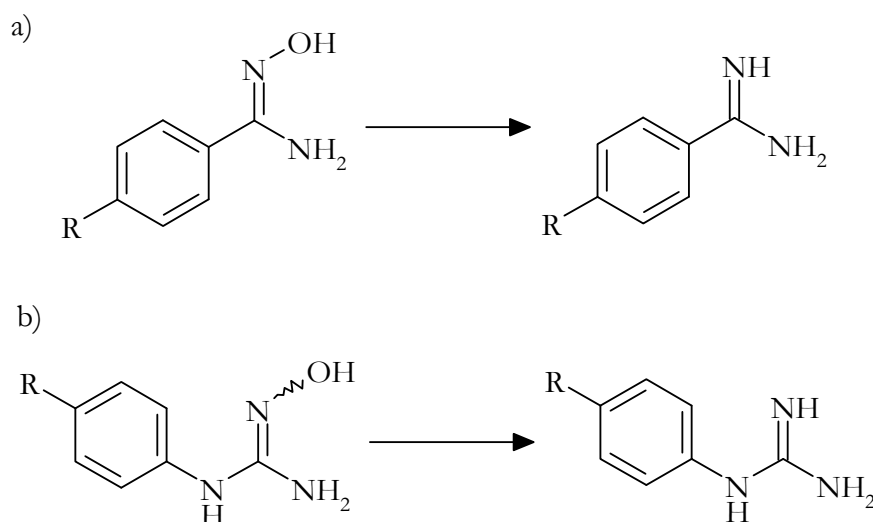


Abb. 7.1 Reduktion von a) Arylamidoximen zu Arylamidinen und b) *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen zu *N*-Arylguanidinen

Für diese war zuvor nur ein oxidativer Metabolismus durch Cytochrom P450 und Stickstoffmonoxidsynthasen beschrieben. Die vorliegende Arbeit zeigt eine effiziente Reduktion einer Reihe von *para*-substituierten *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen durch mikrosomale Enzympräparationen unterschiedlicher Spezies. Die für die Reduktion von Amidoximen verantwortlichen Enzyme sind

ebenfalls an der Reduktion von *N*-Hydroxyguanidinen beteiligt. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase, die die Reduktion allein katalysieren, wenn auch nur mit geringen Umsetzungsraten. Ihre Reduktase Aktivität kann aber durch Zusatz einer bisher nicht identifizierten mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente deutlich gesteigert werden. Die gereinigte Fraktion dieser mikrosomalen dritten Komponente zeigte im Coomassiegefärbten SDS-Gel zwei Proteinbanden. Massenspektrometrische Analysen haben neben den Cytochrom P450 Enzymen 2D25, 2A6 und 3A auch die flavinhaltige Monooxygenase 3 in dieser Fraktion identifiziert.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt eine Induktion von Cytochrom P450 Enzymen in Mikrosomen von Phenobarbital- oder Dexamethason-vorbehandelten Ratten jedoch zu einer signifikanten Erniedrigung der Reduktionsraten und nicht zu der erwarteten Erhöhung. Dies stellt einen Hinweis dafür dar, dass es sich bei der mikrosomalen dritten Komponente nicht um ein Cytochrom P450 Enzym handelt oder aber die Expression des verantwortlichen Isoenzym nicht induziert sondern unterdrückt wurde.

Die Ergebnisse über den reduktiven Metabolismus limitieren die Einsetzbarkeit der *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidine als neue potentielle NO-Donoren erheblich. Andererseits stellen sie ein hochwirksames Prodrug-Prinzip für stark basische funktionelle Gruppen dar, welches eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit einer Vielzahl von Arzneistoffen mit Guanidinfunktionen ermöglicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion der mikrosomalen dritten Komponente für die Katalyse der Reduktion der unterschiedlichen *N*-hydroxylierten Strukturen näher zu untersuchen.

Für die Steigerung der Reduktionsraten gegenüber dem Zweikomponentensystem, bestehend aus Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase, wurde ein additiver Effekt von in der dritten Komponente vorhandenem, zusätzlichem Häm postuliert. Wie aber in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist vielmehr eine Interaktion der Apoproteine für den Effekt verantwortlich, da eine vollständige Umsetzung mit allen drei Komponenten im Gegensatz zum Zweikomponentensystem deren Intaktheit erfordert. Auch kann ein Häm-Modell nur im Zweikomponentensystem Cytochrom b_5 ersetzen, während für die katalytische Aktivität des Dreikomponentensystems keine der beteiligten Komponenten gegen das Häm-Modell ausgetauscht werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von gereinigten und rekombinanten Proteinen auf ihre *N*-reduktive Aktivität untersucht, die massenspektrometrisch in der mikrosomalen gereinigten Proteinfraction nachgewiesen wurden, bzw. aufgrund anderer mechanistischer Parallelen von Interesse waren. Nach Sicherstellung der katalytischen Aktivität der einzelnen Präparationen anhand ihrer jeweiligen Markerreaktionen konnte nach Rekonstitutionsversuchen keine *N*-Reduktion nachgewiesen werden. Dies schließt eine Beteiligung aller getesteten Proteine an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen aus.

Im Hinblick auf das bedeutende Interaktionspotential, das aus einer Beteiligung von Cytochrom P450 Enzymen an der reduktiven Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrug resultieren würde, sind die erhaltenen Ergebnisse von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mikrosomale stickstoffreduzierende Komponente nach literaturbekannter Vorschrift aus Schweineleber gereinigt und ein Protein mit hoher enzymatischer Aktivität gewonnen. Dieses Protein besitzt weder die spektralen Eigenschaften eines Cytochrom P450 Enzyms noch weist es nennenswerte CYP2D Markerenzymaktivität auf. Auch die Benzamidoxim Reduktase Aktivität mehrerer Chargen des gewonnenen Proteins korreliert weder mit der Absorption des reduzierten Kohlenmonoxid-Differenzspektrums bei 450 nm noch mit der Dextromethorphan-*O*-Demethylierungs-Aktivität.

Durch die in dieser Arbeit verwendete sensiblere Silber-Färbemethode konnten, zu den mittels Coomassie gefärbten, zusätzliche Proteinbanden im SDS-Gel der gereinigten Proteinfraction gefunden werden. In diesen erstmals detektierten zusätzlichen Banden befindet sich unter anderem das gleiche Protein, das bereits in Mitochondrien als das für die *N*-Reduktion verantwortliche Enzym isoliert wurde. Dieses wurde zuvor noch nie in mikrosomalen Präparationen aus Lebergewebe gefunden.

Nicht das vielfach gereinigte Cytochrom P450 Isoenzym 2D, sondern die „Verunreinigung“ mit der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente ist möglicherweise für die katalytische Aktivität der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente verantwortlich.

Die Anwesenheit der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente in der aus Schweinelebermikrosomen gereinigten *N*-reduktiven Proteinfraction wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich anhand immunochemischer Methoden und

eines enzymatischen Assays nachgewiesen. Durch Zusatz dieser *N*-reduktiven Fraktionen oder der Mikrosomen, aus denen sie gereinigt wurden, zu einem Extrakt einer Nitratreduktase-defizienten Mutante wird deren Aktivität rekonstituiert. Für eine erfolgreiche Nitratreduktion ist hierbei die Zugabe eines externen Molybdäncofaktors erforderlich. Mittels der erhaltenen Ergebnisse konnte somit bewiesen werden, dass die *N*-reduktive Fraktion auch einen funktionsfähigen Molybdäncofaktor enthält.

Die im Verlauf der Reinigung korrelierbare Anreicherung des Molybdäncofaktors und die durchgeführten Hemmstudien mit Natriummetavanadat bestätigen darüber hinaus auch die Beteiligung des Molybdoenzym an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in Lebermikrosomen.

Ob diese Komponente in der *N*-reduktiven Fraktion eine mitochondriale Verunreinigung oder möglicherweise eine mikrosomale Isoform ist, konnte anhand enzymatischer und immunochemischer Verfahren nicht eindeutig geklärt werden.

Zur Aufklärung der Funktion dieser dritten Komponente sollte das Benzamidoxim-affine Protein aus der vorgereinigten mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente über eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Arylamidoximen isoliert und identifiziert werden.

Für die Darstellung der Affinitätsmatrix wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene in der *para*-Position zur Amidoximfunktion substituierte Arylamidoxime als potentielle Liganden für eine Immobilisierung untersucht, weil im Vorweg gezeigt werden konnte, dass in diesen Positionen Substituenten ohne Abnahme der Reduktionsraten toleriert werden.

Die reaktive Amidoximfunktion verhindert jedoch eine direkte Ligandenkupplung an ein aktiviertes Trägermaterial. Eine Immobilisierung eines Arylamidoxims unter Erhalt seiner Amidoxim-Struktur wurde über die Kupplung eines *para*-substituierten Benzonitrils erreicht, welches anschließend zum Amidoxim umgesetzt wurde.

Für die erfolgreich dargestellte Affinitätsmatrix wurden Methodenparameter für eine optimale Proteinbindung und -elution ermittelt und anschließend eine säulenchromatographische Reinigungsmethode entwickelt. Die an die Affinitätsmatrix gebundene Fraktion zeigt zwar weniger Proteinbanden im SDS-Gel, jedoch keine Anreicherung der spezifischen Benzamidoxim Reduktase Aktivität im Vergleich zum Ausgangsprotein.

Basierend auf der Affinität zum Substrat Benzamidoxim konnte somit das nach Rekonstitution mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase für die Benzamidoxim Reduktion verantwortliche Protein nicht isoliert werden. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine zu geringe Affinität von Enzym und Substrat. Diese könnte zudem auch durch den bislang ungeklärten Reduktionsmechanismus bedingt sein. Der aktivitätssteigernde Effekt der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente auf die Reduktionsrate *N*-hydroxylierter Verbindungen wird möglicherweise durch eine durch die dritte Komponente vermittelte Verstärkung der Interaktion von Cytochrom b_5 und seiner Reduktase hervorgerufen. Der so postulierte Mechanismus erfordert gar keine Substratbindung an die mikrosomale *N*-reduktive Komponente und somit auch keine Affinität.

Eine Beteiligung des gefundenen Molybdoproteins an der Benzamidoxim Reduktase Aktivität von Lebermikrosomen konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig bewiesen werden. Offen bleibt die Funktion dieses Proteins im Hinblick auf den Mechanismus der Reaktion, da offenbar kaum Affinität zum Substrat Benzamidoxim besteht. Dies wird ebenso Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, wie die Klärung der physiologischen Funktion dieses erstmals in Säugetieren beschriebenen Proteins.

Darüber hinaus bleibt zu klären, ob neben dem beteiligten Molybdoprotein weitere mikrosomale Enzyme *N*-reduktive Aktivität besitzen oder die mikrosomale Benzamidoxim Reduktase Aktivität allein auf das Molybdoprotein zurückzuführen ist.

Dieses soll mit Hilfe einer Affinitätschromatographie über eine Immobilisierung des gegen die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente gerichteten Antikörpers ermittelt werden. Eine quantitative Abtrennung des Molybdoproteins über eine Immunoaffinitätschromatographie ermöglicht dann eine Aussage darüber, ob weitere Proteine an der mikrosomalen Benzamidoxim Reduktion beteiligt sind und soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

8 MATERIALIEN UND GERÄTE

8.1 SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN

Die verwendeten Chemikalien stammten, soweit nicht anders in der Tabelle aufgeführt, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

| Substanz | Firma |
|--|-----------------------------------|
| Acetonitril | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| Acrylamid | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Agarose Low Melt | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ammoniumacetat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ammoniumperoxodisulfat | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| BCA-Kit zur Proteinbestimmung | Pierce, Rockford, USA |
| Biokompatible HPLC-Pumpe L-6210 | Merck KGaA, Darmstadt |
| β -Mercaptoethanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Merck KGaA, Darmstadt |
| Coomassie [®] Brilliant Blue R250 | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Dimethylformamid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Dithiothreitol | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Eisessig | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| Ethylendiamintetraessigsäure, | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Glycerin | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| Glycin | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Harnstoff | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |

| Substanz | Firma |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Isopropanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumcyanid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumhydroxid Plätzchen | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumhexacyanoferrat(III) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kohlenmonoxid | Messer Griesheim GmbH, Krefeld |
| Magermilchpulver | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Methanol | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| Natriumazid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumdithionit | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Nicotinamidadenindinucleotid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Nicotinamidadenindinucleotidphosphat | Roche Diagnostics, Mannheim |
| <i>N,N</i> -Methylenbisacrylamid | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| Ortho-Phosphorsäure, 85 % | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ponceau S | Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>p</i> -Toluolsulfonat | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht |
| Trishydroxymethylaminomethan | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Trishydroxymethylaminomethan- | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| Triton [®] X-100 | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Tween-20 | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Whatmanpapier | VWR, Darmstadt |

8.2 GERÄTE

| Gerät | Firma |
|--|---|
| Econo-Chromatographiesäule 0,75 × 10 cm | Bio-Rad, München |
| Einmalküvetten mikro, Zentrumshöhe 15 mm | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim |
| Einmalküvetten halbmikro | Sarstedt, Nürnberg |
| Fraktionssammler Redi Frac | Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg |
| Gelelektrophoresekammer Modell 2003 | LKB, Bromma, Schweden |
| Gelelektrophoresekammer Perfect Blue TwinS | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Gradientenformer GM-1 | Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg |
| Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA 10 und JA 14 | Beckmann, München |
| IKA-Vibrax-VXP | Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen |
| Integrator D-2500 | Merck KGaA, Darmstadt |
| ISMATEC Schlauchpumpe für Niederdruckchromatographiesäulen Typ MCP ISM 726 | ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld |
| Jupiter Fleischwolf | Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf |
| Magnetkernrührer MR mini | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Messer-Homogenisator | Eigenbau der Universität Austin, Texas |
| Microplate Reader Varian Cary 50 MPR | Varian GmbH, Darmstadt |
| Millipore Schlauchpumpe für Organperfusion Modell XX8200230 | Millipore GmbH, Schwabach |

| Gerät | Firma |
|--|---|
| pH-Messgerät inoLab [®] pH level 1 | Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim |
| Pipetten Reference [®] Eppendorf | Eppendorf AG, Hamburg |
| Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill | B. Braun Biotech International, Melsungen |
| Schüttelwasserbad GFL 1087 | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Spektralphotometer Varian Cary [®] 50 Bio mit Water Peltier System PCB 150 | Varian GmbH, Darmstadt |
| Temperiereinheit für Gelelektrophoresekammer Julabo C/F20 | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Tischzentrifuge Hettich Mikro 200 | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen |
| Trans Blot SD Semi-dry Transfer cell | Bio-Rad, München |
| Überkopfschüttler | Heidolph, Kehlheim |
| Ultrafiltrationszellen und –membranen | Amicon, Witten |
| Ultraschallbad Sonorex, Super RK 510H | Bandelin, Berlin |
| Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti | Beckmann, München |
| UV/VIS-Detektor 655A | Merck KGaA, Darmstadt |
| Vortexer VF2 | Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen |
| Waage MC1, Laboratory LC 620S | Sartorius, Göttingen |
| Waage MC1, Research RC 210P | Sartorius, Göttingen |

9 LITERATURVERZEICHNIS

- ABE K, KIMURA S, KIZAWA R, ANAN FK und SUGITA Y (1985)
Amino acid sequences of cytochrome b5 from human, porcine, and bovine erythrocytes and comparison with liver microsomal cytochrome b5. *J Biochem (Tokyo)* **97**:1659-1668.
- ALTERMAN MA, KORNILAYEV B, DUZHAK T und YAKOVLEV D (2005)
Quantitative analysis of cytochrome p450 isozymes by means of unique isozyme-specific tryptic peptides: a proteomic approach. *Drug Metab Dispos* **33**:1399-1407.
- AMSCHLER J (2004) Reduktiver Arzneistoffmetabolismus von N-Hydroxyamidinen, Hydroxylaminen und Hydroxamsäuren, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- ANDERSSON S, HOFMANN Y, NORDLING A, LI XQ, NIVELIUS S, ANDERSSON TB, INGELMAN-SUNDBERG M und JOHANSSON I (2005)
Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of N-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug Metab Dispos* **33**:570-578.
- ANDRONIK-LION V, BOUCHER JL, DELAFORGE M, HENRY Y und MANSUY D (1992)
Formation of nitric oxide by cytochrome P450-catalyzed oxidation of aromatic amidoximes. *Biochem Biophys Res Commun* **185**:452-458.
- APOSHIAN HV, ZAKHARYAN RA, AVRAM MD, SAMPAYO-REYES A und WOLLENBERG ML (2004)
A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**:327-335.
- ARCHAKOV AI, PANCHENKO LF, KAPITANOV AB, EFRON, II, KNYAZEVA TI und ZHEREBKOVA NS (1973)
A quantitative estimation of degree of purity of preparations of subcellular structures. *Anal Biochem* **54**:223-233.

ARON J, BALDWIN DA, MARQUES HM, PRATT JM und ADAMS PA (1986)
Hemes and hemoproteins. 1: Preparation and analysis of the heme-containing octapeptide (microperoxidase-8) and identification of the monomeric form in aqueous solution. *J Inorg Biochem* **27**:227-243.

AUVIN S, AUGUET M, NAVET E, HARNETT JJ, VIOSSAT I, SCHULZ J, BIGG D und CHABRIER PE (2003)
Novel inhibitors of neuronal nitric oxide synthase with potent antioxidant properties. *Bioorg Med Chem Lett* **13**:209-212.

BALDWIN MA (2004)
Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered. *Mol Cell Proteomics* **3**:1-9.

BECKER DP, VILLAMIL CI, BARTA TE, BEDELL LJ, BOEHM TL, DECRESCENZO GA, FRESKOS JN, GETMAN DP, HOCKERMAN S, HEINTZ R, HOWARD SC, LI MH, MCDONALD JJ, CARRON CP, FUNCKES-SHIPPIY CL, MEHTA PP, MUNIE GE und SWEARINGEN CA (2005)
Synthesis and structure-activity relationships of beta- and alpha-piperidine sulfone hydroxamic acid matrix metalloproteinase inhibitors with oral antitumor efficacy. *J Med Chem* **48**:6713-6730.

BEEDHAM C (1997)
The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharm World Sci* **19**:255-263.

BEHRENS D (1999) Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen durch Cytochrom P450 Isoenzyme aus Schweineleber und humaner Leber, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

BENEDETTI MS, WHOMSLEY R und CANNING M (2007)
Drug metabolism in the paediatric population and in the elderly. *Drug Discov Today* **12**:599-610.

BERANOVA P, CHALUPSKY K, KLESCHYOV AL, SCHOTT C, BOUCHER JL, MANSUY D, MUNZEL T, MULLER B und STOCLET JC (2005)
Nomega-hydroxy-L-arginine homologues and hydroxylamine as nitric oxide-dependent vasorelaxant agents. *Eur J Pharmacol* **516**:260-267.

BERNHEIM ML (1969)
The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **134**:408-413.

- BITTNER F, OREB M und MENDEL RR (2001)
ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**:40381-40384.
- BOARD PG, COGGAN M, CHELVANAYAGAM G, EASTEAL S, JERMIIN LS, SCHULTE GK, DANLEY DE, HOTH LR, GRIFFOR MC, KAMATH AV, ROSNER MH, CHRUNYK BA, PERREGAUX DE, GABEL CA, GEOGHEGAN KF und PANDIT J (2000)
Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* **275**:24798-24806.
- BORGESE N und PIETRINI G (1986)
Distribution of the integral membrane protein NADH-cytochrome b₅ reductase in rat liver cells, studied with a quantitative radioimmunoblotting assay. *Biochem J* **239**:393-403.
- BOUCHAIN G und DELORME D (2003)
Novel hydroxamate and anilide derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Synthesis and antiproliferative evaluation. *Current Medicinal Chemistry* **10**:2359-2372.
- BRADSHAW RA und BURLINGAME AL (2005)
From proteins to proteomics. *IUBMB Life* **57**:267-272.
- BRAGA MD, MARTINS AM, DE MENEZES DB, BARBOSA PS, EVANGELISTA JS, TOYAMA MH, TOYAMA DO, FONTELES MC und MONTEIRO HS (2007)
Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* **49**:329-338.
- BRUTON EA, BRAMMER L, PIGGE FC, AAKEROEY CB und LEINEN DS (2003)
Hydrogen bond patterns in aromatic and aliphatic dioximes. *New Journal of Chemistry* **27**:1084-1094.
- BUNAI K und YAMANE K (2005)
Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **815**:227-236.
- BUSS U (2005) Untersuchungen von Pyrido[1,2-a]pyrimidinen und strukturverwandten Verbindungen als Hemmstoffe von NO-Synthasen, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

CAI TB, LU D und WANG PG (2005)

N-hydroxyguanidines as substrates of nitric oxide synthases. *Curr Top Med Chem* **5**:721-736.

CHAE YH, THOMAS T, GUENGERICH FP, FU PP und EL-BAYOUMY K (1999)

Comparative metabolism of 1-, 2-, and 4-nitropyrene by human hepatic and pulmonary microsomes. *Cancer Res* **59**:1473-1480.

CHEN W, KOENIGS LL, THOMPSON SJ, PETER RM, RETTIE AE, TRAGER WF und NELSON SD (1998)

Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and nontoxic catechol metabolites by baculovirus-expressed and purified human cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chem Res Toxicol* **11**:295-301.

CHERN JW, LEU YL, WANG SS, JOU R, LEE CF, TSOU PC, HSU SC, LIAW YC und LIN HM (1997)

Synthesis and cytotoxic evaluation of substituted sulfonyl-*N*-hydroxyguanidine derivatives as potential antitumor agents. *J Med Chem* **40**:2276-2286.

CHRAMBACH A, REISFELD RA, WYCKOFF M und ZACCARI J (1967)

A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **20**:150-154.

CLEMENT B, KUNZE T und HEBERLING S (2006a)

Reduction of *N*-omega-hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **349**:869-873.

CLEMENT B, BÜRENHEIDE A, RIECKERT W und SCHWARZ J (2006b)

Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, in vitro and in vivo biotransformation. *ChemMedChem* **1**:1260-1267.

CLEMENT B, BEHRENS D, AMSCHLER J, MATSCHKE K, WOLF S und HAVEMEYER A (2005a)

Reduction of sulfamethoxazole and dapson hydroxylamines by a microsomal enzyme system purified from pig liver and pig and human liver microsomes. *Life Sci* **77**:205-219.

- CLEMENT B, MAU S, DETERS S und HAVEMEYER A (2005b)
Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* **33**:1740-1747.
- CLEMENT B und LOPIAN K (2003)
Characterization of in vitro biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab Dispos* **31**:645-651.
- CLEMENT B (2002)
Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* **34**:565-579.
- CLEMENT B, BOUCHER JL, MANSUY D und HARSDORF A (1999)
Microsomal formation of nitric oxide and cyanamides from non-physiological *N*-hydroxyguanidines: *N*-hydroxydebrisoquine as a model substrate. *Biochem Pharmacol* **58**:439-445.
- CLEMENT B (1998)
Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: importance of the reduction of genotoxic *N*-hydroxylated functional groups. *Biomedical and Health Research* **25**:59-71.
- CLEMENT B, LOMB R und MOLLER W (1997)
Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* **272**:19615-19620.
- CLEMENT B, DEMESMAEKER M und LINNE S (1996)
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* **9**:682-688.
- CLEMENT B und JUNG F (1994)
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 N^G-hydroxyarginine, citrulline, and nitric oxide. *Drug Metab Dispos* **22**:486-497.
- CLEMENT B (1993a) Methoden zur Behandlung und Prophylaxe der *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PCP) und anderen Erkrankungen sowie Verbindungen und Formulierungen zum Gebrauch bei besagten Methoden, Germany, Europe, USA, Japan.

CLEMENT B, SCHULTZE-MOSGAU MH und WOHLERS H (1993b)
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* **46**:2249-2267.

CLEMENT B und KUNZE T (1992)
The reduction of 6-*N*-hydroxylaminopurine to adenine by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* **44**:1501-1509.

CPMP (COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS, 1997)
Note for guidance on the investigation of drug interactions, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA)

CRESPI CL und MILLER VP (1999)
The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future. *Pharmacol Ther* **84**:121-131.

CUATRECASAS P (1970)
Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J Biol Chem* **245**:3059-3065.

DALY AK, CHOLERTON S, GREGORY W und IDLE JR (1993)
Metabolic polymorphisms. *Pharmacol Ther* **57**:129-160.

DAMBROVA M, UHLEN S, WELCH CJ und WIKBERG JE (1998)
Identification of an *N*-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur J Biochem* **257**:178-184.

D'ARRIGO A, MANERA E, LONGHI R und BORGESE N (1993)
The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b₅ suggests novel targeting pathways. *J Biol Chem* **268**:2802-2808.

DICK RA, KANNE DB und CASIDA JE (2006)
Substrate specificity of rabbit aldehyde oxidase for nitroguanidine and nitromethylene neonicotinoid insecticides. *Chem Res Toxicol* **19**:38-43.

DICK RA, KANNE DB und CASIDA JE (2005)
Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. *Chem Res Toxicol* **18**:317-323.

DIJOLS S, BOUCHER JL, LEPOIVRE M, LEFEVRE-GROBOILLOT D, MOREAU M, FRAPART Y, REKKA E, MEADE AL, STUEHR DJ und MANSUY D (2002)

First non-alpha-amino acid guanidines acting as efficient NO precursors upon oxidation by NO-synthase II or activated mouse macrophages. *Biochemistry* **41**:9286-9292.

DUNBAR BS, KIMURA H und TIMMONS TM (1990)

Protein analysis using high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **182**:441-459.

EBERHART DC und PARKINSON A (1991)

Cytochrome P450 IIIA1 (P450p) requires cytochrome b₅ and phospholipid with unsaturated fatty acids. *Arch Biochem Biophys* **291**:231-240.

EDMONDSON RD, VONDRISKA TM, BIEDERMAN KJ, ZHANG J, JONES RC, ZHENG Y, ALLEN DL, XIU JX, CARDWELL EM, PISANO MR und PING P (2002)

Protein kinase C epsilon signaling complexes include metabolism- and transcription/translation-related proteins: complimentary separation techniques with LC/MS/MS. *Mol Cell Proteomics* **1**:421-433.

ELIASSON M, BOSTROM M und DEPIERRE JW (1999)

Levels and subcellular distributions of detoxifying enzymes in the ovarian corpus luteum of the pregnant and non-pregnant pig. *Biochem Pharmacol* **58**:1287-1292.

ESTABROOK RW und WERRINGLOER J (1978)

The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* **52**:212-220.

ETTMAYER P, AMIDON GL, CLEMENT B und TESTA B (2004)

Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* **47**:2393-2404.

EVERETT SA, PATEL KB, DENNIS MF, SMITH KA, STRATFORD MR und WARDMAN P (1998)

Oxidative denitrication of the antitumour drug hydroxyguanidine. *Free Radic Biol Med* **24**:1-10.

FAIG M, BIANCHET MA, TALALAY P, CHEN S, WINSKI S, ROSS D und AMZEL LM (2000)

Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductases: species comparison and structural changes with substrate binding and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3177-3182.

FARACI FM und BRIAN JE, JR. (1995)

7-Nitroindazole inhibits brain nitric oxide synthase and cerebral vasodilatation in response to *N*-methyl-D-aspartate. *Stroke* **26**:2172-2175; discussion 2176.

FRIEDRICH S (2003) Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzyms, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

FUKUTO JM (1996)

Chemistry of *N*-hydroxy-L-arginine. *Methods Enzymol* **268**:365-375.

FURNES B und SCHLENK D (2004)

Evaluation of xenobiotic *N*- and *S*-oxidation by variant flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1) enzymes. *Toxicol Sci* **78**:196-203.

GALEVA N und ALTERMANN M (2002)

Comparison of one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis as a separation tool for proteomic analysis of rat liver microsomes: cytochromes P450 and other membrane proteins. *Proteomics* **2**:713-722.

GIRRESER U, KÖNIG M und CLEMENT B (2002)

Characterization of para-substituted benzamidoximes and benzamidinium salts by ¹⁵N-NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **40**:202-206.

GONZALEZ FJ und KORZEKWA KR (1995)

Cytochromes P450 expression systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**:369-390.

GRANT DA und HERMON-TAYLOR J (1976)

The purification of human enterokinase by affinity chromatography and immunoabsorption. Some observations on its molecular characteristics and comparisons with the pig enzyme. *Biochem J* **155**:243-254.

GREENLEE WF und POLAND A (1978)

An improved assay of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Pharmacol Exp Ther* **205**:596-605.

GUENGERICH FP (2006)

Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *Aaps J* **8**:E101-111.

GUENGERICH FP (2001)

Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **14**:611-650.

GUENGERICH FP (1999)

Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**:1-17.

HAGA K und HAGA T (1983)

Affinity chromatography of the muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **258**:13575-13579.

HAJOS AK und WINSTON GW (1992)

Role of cytosolic NAD(P)H-quinone oxidoreductase and alcohol dehydrogenase in the reduction of p-nitrosophenol following chronic ethanol ingestion. *Arch Biochem Biophys* **295**:223-229.

HARTINGER J, STENIUS K, HOGEMANN D und JAHN R (1996)

16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem* **240**:126-133.

HASSANI M, CAI W, HOLLEY DC, LINESWALA JP, MAHARJAN BR, EBRAHIMIAN GR, SERADJ H, STOCKSDALE MG, MOHAMMADI F, MARVIN CC, GERDES JM, BEALL HD und BEHFOROZ M (2005)

Novel lavendamycin analogues as antitumor agents: synthesis, in vitro cytotoxicity, structure-metabolism, and computational molecular modeling studies with NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *J Med Chem* **48**:7733-7749.

HAVEMEYER A (2006) Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung des molybdäncofaktorabhängigen Enzymsystems, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

HAVEMEYER A, BITTNER F, WOLLERS S, MENDEL R, KUNZE T und CLEMENT B (2006)

Identification of the Missing Component in the Mitochondrial Benzamidoxime Prodrug-converting System as a Novel Molybdenum Enzyme. *J Biol Chem* **281**:34796-34802.

HAYES JD, FLANAGAN JU und JOWSEY IR (2005)

Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:51-88.

HEBERLING S, GIRRESER U, WOLF S und CLEMENT B (2006)

Oxygen-insensitive enzymatic reduction of oximes to imines. *Biochem Pharmacol* **71**:354-365.

HENZEL WJ, WATANABE C und STULTS JT (2003)

Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**:931-942.

HEWICK DS (1982) Reductive metabolism of nitrogen-containing functional groups, in: *Metabolic basis of detoxification* (Jakoby WB, Bend JR and Caldwell J eds), pp 151-170, Academic Press, New York.

HILL RB, JR. und GORDON JA (1968)
Effect of hydroxyurea analogues in regenerating rat liver. *Exp Mol Pathol* **9**:71-76.

HILLE R (2005)
Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch Biochem Biophys* **433**:107-116.

HILLE R (2002)
Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem Sci* **27**:360-367.

HILLE R (1996)
The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev* **96**:2757-2816.

HLAVICA P (2002)
N-oxidative transformation of free and N-substituted amine functions by cytochrome P450 as means of bioactivation and detoxication. *Drug Metab Rev* **34**:451-477.

HO JZ, GIBSON TS und SEMPLE JE (2002)
Novel, potent non-covalent thrombin inhibitors incorporating p(3)-lactam scaffolds. *Bioorg Med Chem Lett* **12**:743-748.

HOFFMANN F und MASER E (2007)
Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab Rev* **39**:87-144.

HOLLENBERG PF (2002)
Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev* **34**:17-35.

HOLTKAMP D (2007) Isolierung eines Prodrug-reduzierenden Enzymsystems aus der Schweineniere, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

HORIE S (1990)
Advances in research on DT-diaphorase--catalytic properties, regulation of activity and significance in the detoxication of foreign compounds. *Kitasato Arch Exp Med* **63**:11-30.

IMAOKA S, IMAI Y, SHIMADA T und FUNAE Y (1992)
Role of phospholipids in reconstituted cytochrome P450 3A form and mechanism of their activation of catalytic activity. *Biochemistry* **31**:6063-6069.

INGELMAN-SUNDBERG M (2004)

Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**:89-104.

INGELMAN-SUNDBERG M (2001)

Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* **250**:186-200.

INGELMAN-SUNDBERG M und RODRIGUEZ-ANTONA C (2005)

Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**:1563-1570.

ISIN EM und GUENGERICH FP (2007)

Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1770**:314-329.

IYANAGI T und YAMAZAKI I (1970)

One-electron-transfer reactions in biochemical systems. V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase). *Biochim Biophys Acta* **216**:282-294.

JOSEPHY PD, GUENGERICH FP und MINERS JO (2005)

"Phase I" and "Phase II" drug metabolism: Terminology that we should phase out? *Drug Metabolism Reviews* **37**:575-580.

JOUSSERANDOT A, BOUCHER JL, HENRY Y, NIKLAUS B, CLEMENT B und MANSUY D (1998)

Microsomal cytochrome P450 dependent oxidation of *N*-hydroxyguanidines, amidoximes, and ketoximes: mechanism of the oxidative cleavage of their C=N(OH) bond with formation of nitrogen oxides. *Biochemistry* **37**:17179-17191.

JOUSSERANDOT A, BOUCHER JL, DESSEAUX C, DELAFORGE M und MANSUY D (1995)

Formation of nitrogen oxides including NO from oxidative cleavage of C=N(OH) bonds: a general cytochrome P450-dependent reaction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **5**:423-426.

KADLUBAR FF, MCKEE EM und ZIEGLER DM (1973)

Reduced pyridine nucleotide-dependent *N*-hydroxy amine oxidase and reductase activities of hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys* **156**:46-57.

KADLUBAR FF und ZIEGLER DM (1974)

Properties of a NADH-dependent *N*-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **162**:83-92.

KAMIN H, MASTERS BS, GIBSON QH und WILLIAMS CH, JR. (1965)
Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. *Fed Proc* **24**:1164-1171.

KANAEVA IP, PETUSHKOVA NA, LISITSA AV, LOKHOV PG, ZGODA VG, KARUZINA, II und ARCHAKOV AI (2005)
Proteomic and biochemical analysis of the mouse liver microsomes. *Toxicol In Vitro* **19**:805-812.

KANAMORI A, SENO N und MATSUMOTO I (1986)
Preparation of high-capacity affinity adsorbents using formyl carriers and their use for low- and high-performance liquid affinity chromatography of trypsin-family proteases. *Journal of Chromatography* **363**:231-242.

KARHAN W (2002) Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

KASCHE V (2001)
Physico-chemical boundaries in the continuous and one-step discontinuous affinity-chromatographic isolation of proteins. *J Biochem Biophys Methods* **49**:49-62.

KATO R, IWASAKI K und NOGUCHI H (1978)
Reduction of tertiary amine N-oxides by cytochrome P-450. Mechanism of the stimulatory effect of flavins and methyl viologen. *Mol Pharmacol* **14**:654-664.

KIRCHHEINER J und SEERINGER A (2007)
Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1770**:489-494.

KISKER C, SCHINDELIN H und REES DC (1997)
Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annu Rev Biochem* **66**:233-267.

KITAGAWA K, KUNUGITA N, KITAGAWA M und KAWAMOTO T (2001)
CYP2A6*6, a novel polymorphism in cytochrome p450 2A6, has a single amino acid substitution (R128Q) that inactivates enzymatic activity. *J Biol Chem* **276**:17830-17835.

KITAMURA S, OHASHI KNK, SUGIHARA K, HOSOKAWA R, AKAGAWA Y und OHTA S (2001)
Extremely high drug-reductase activity based on aldehyde oxidase in monkey liver. *Biol Pharm Bull* **24**:856-859.

- KITAMURA S, SUGIHARA K und TATSUMI K (1994)
Reductase activity of aldehyde oxidase toward the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene and the related hydroxamic acids. *Biochem Mol Biol Int* **34**:1197-1203.
- KITAMURA S und TATSUMI K (1983)
Azoreductase activity of liver aldehyde oxidase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **31**:3334-3337.
- KLEIN DA und FOUTY RA (1968)
Syntheses and investigations of polymers containing the 1,2,4-oxadiazole nucleus. *Macromolecules* **1**:318-324.
- KLOTZ U, BEIL W, GLEITER C, DREWELOW B, GARBE E, GILLESSEN A und MUTSCHLER E (2003)
[Drug interactions. Mechanisms and clinical relevance]. *Internist (Berl)* **44**:1444-1449.
- KNOCKAERT M, WIEKING K, SCHMITT S, LEOST M, GRANT KM, MOTTRAM JC, KUNICK C und MEIJER L (2002)
Intracellular Targets of Paullones. Identification following affinity purification on immobilized inhibitor. *J Biol Chem* **277**:25493-25501.
- KOCIENSKI P (2005) Tetrahydropyranyl (THP) and related Ethers, in: *Protecting Groups*, pp 315 - 320, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- KORNBERG A (1990)
Why purify enzymes? *Methods Enzymol* **182**:1-5.
- KORNREICH-LESHEM H, ZIV C, GUMIENNA-KONTECKA E, ARAD-YELLIN R, CHEN Y, ELHABIRI M, ALBRECHT-GARY AM, HADAR Y und SHANZER A (2005)
Ferrioxamine B analogues: targeting the FoxA uptake system in the pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *J Am Chem Soc* **127**:1137-1145.
- KRISHNA DR und KLOTZ U (1994)
Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* **26**:144-160.
- KRIVANEK J und NOVAKOVA L (1991)
A novel effect of vanadium ions: inhibition of succinyl-CoA synthetase. *Gen Physiol Biophys* **10**:71-82.
- KRUEGER SK und WILLIAMS DE (2005)
Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther* **106**:357-387.

KRUGER P (1885)

On derivatives of benzenylamidoxime. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*:1053.

KUMAR S, DAVYDOV DR und HALPERT JR (2005)

Role of cytochrome b₅ in modulating peroxide-supported cyp3a4 activity: evidence for a conformational transition and cytochrome P450 heterogeneity. *Drug Metab Dispos* **33**:1131-1136.

KURIAN JR, BAJAD SU, MILLER JL, CHIN NA und TREPANIER LA (2004)

NADH cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:1171-1178.

KUSHIDA H, FUJITA K, SUZUKI A, YAMADA M, NOHMI T und KAMATAKI T (2000)

Development of a Salmonella tester strain sensitive to promutagenic N-nitrosamines: expression of recombinant CYP2A6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *S. typhimurium* YG7108. *Mutat Res* **471**:135-143.

LAEMMLI UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

LAM PY, CLARK CG, LI R, PINTO DJ, ORWAT MJ, GALEMMO RA, FEVIG JM, TELEHA CA, ALEXANDER RS, SMALLWOOD AM, ROSSI KA, WRIGHT MR, BAI SA, HE K, LUETTIGEN JM, WONG PC, KNABB RM und WEXLER RR (2003)

Structure-based design of novel guanidine/benzamidine mimics: potent and orally bioavailable factor Xa inhibitors as novel anticoagulants. *J Med Chem* **46**:4405-4418.

LANG DH, YEUNG CK, PETER RM, IBARRA C, GASSER R, ITAGAKI K, PHILPOT RM und RETTIE AE (1998)

Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3. *Biochem Pharmacol* **56**:1005-1012.

LEE CS, HARTLEY JA, BERARDINI MD, BUTLER J, SIEGEL D, ROSS D und GIBSON NW (1992)

Alteration in DNA cross-linking and sequence selectivity of a series of aziridinylbenzoquinones after enzymatic reduction by DT-diaphorase. *Biochemistry* **31**:3019-3025.

LEFEVRE-GROBOILLOT D, BOUCHER JL, MANSUY D und STUEHR DJ (2006)

Reactivity of the heme-dioxygen complex of the inducible nitric oxide synthase in the presence of alternative substrates. *Febs J* **273**:180-191.

LEFEVRE-GROBOILLOT D, FRAPART Y, DESBOIS A, ZIMMERMANN JL, BOUCHER JL, GORREN AC, MAYER B, STUEHR DJ und MANSUY D (2003)

Two modes of binding of *N*-hydroxyguanidines to NO synthases: first evidence for the formation of iron-*N*-hydroxyguanidine complexes and key role of tetrahydrobiopterin in determining the binding mode. *Biochemistry* **42**:3858-3867.

LEFEVRE-GROBOILLOT D, DIJOLS S, BOUCHER JL, MAHY JP, RICOUX R, DESBOIS A, ZIMMERMANN JL und MANSUY D (2001)

N-hydroxyguanidines as new heme ligands: UV-visible, EPR, and resonance Raman studies of the interaction of various compounds bearing a C=NOH function with microperoxidase-8. *Biochemistry* **40**:9909-9917.

LI H und FÖRSTERMANN U (2000)

Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* **190**:244-254.

LLOYD E, FERRER JC, FUNK WD, MAUK MR und MAUK AG (1994)

Recombinant human erythrocyte cytochrome b5. *Biochemistry* **33**:11432-11437.

LOMB R (1995) Enzymatische Grundlagen der *N*-reduktiven Biotransformation von *N*-hydroxylierten Amidinen, Guanidinen und Amidinohydrazonen, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

LOMBARDI A, NASTRI F und PAVONE V (2001)

Peptide-based heme-protein models. *Chem Rev* **101**:3165-3189.

LOPIAN K (2002) Enzymatische Grundlagen der Aktivierung des Amidoxim- und Ester-Prodrugs Ximelagatran, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

MA Q, WANG R, YANG CS und LU AY (1990)

Expression of mammalian DT-diaphorase in *Escherichia coli*: purification and characterization of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys* **283**:311-317.

MABIC S (1999) Oxidative metabolic activation of xenobiotics, in: *Handbook of drug metabolism* (Woolf T ed), pp 49-71, Dekker, New York, NY.

MACFARLANE DE (1989)

Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride – sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal Biochem* **176**:457-463.

MANSUY D und BOUCHER JL (2004)

Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radic Biol Med* **37**:1105-1121.

MARTIN NI, WOODWARD JJ und MARLETTA MA (2006)

N^G-Hydroxyguanidines from Primary Amines. *Organic Letters* **8**:4035-4038.

MATSCHKE K (2004) Studien zur Identifizierung eines Prodrug-aktivierenden Enzymsystems, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

MC LANE KE, FISHER J und RAMAKRISHNAN K (1983)

Reductive drug metabolism. *Drug Metab Rev* **14**:741-799.

MENDEL RR (1997)

Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta* **203**:399-405.

MENDEL RR und BITTNER F (2006)

Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta* **1763**:621-635.

MERRIL CR, SWITZER RC und VAN KEUREN ML (1979)

Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4335-4339.

MIHARA K und SATO R (1978)

Detergent-solubilized NADH-cytochrome b₅ reductase. *Methods Enzymol* **52**:102-108.

MILLER I, CRAWFORD J und GIANAZZA E (2006)

Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* **6**:5385-5408.

MIYASHITA M, YOSHIKOSHI A und GRIECO PA (1977)

Pyridinium p-toluenesulfonate. A mild and efficient catalyst for the tetrahydropyranlation of alcohols. *Journal of Organic Chemistry* **42**:3772-3774.

MOELLER W (1997) Enzymatische Grundlagen der N-reduktiven Biotransformation: Isolierung und Charakterisierung eines mikrosomalen Enzymsystems, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

MONCADA S und BOLANOS JP (2006)
Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* **97**:1676-1689.

MONDAL K und GUPTA MN (2006)
The affinity concept in bioseparation: evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomol Eng* **23**:59-76.

MOREAU M, BOUCHER JL, MATTIOLI TA, STUEHR DJ, MANSUY D und SANTOLINI J (2006)
Differential effects of alkyl- and arylguanidines on the stability and reactivity of inducible NOS heme-dioxygen complexes. *Biochemistry* **45**:3988-3999.

MULLER S, GEWALTIG MT und KOJDA G (2002)
[Vasoprotection through vascular nitric oxide. Molecular basis of antiatherosclerotic actions]. *Med Monatsschr Pharm* **25**:45-51.

MUTSCHLER E, GEISSLINGER G, KROEMER HK und SCHÄFER-KORTING M (2001) *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

NAKAO M, GOTO Y, HIRATSUKA A und WATABE T (1991)
Reductive metabolism of nitro-p-phenylenediamine by rat liver. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **39**:177-180.

NASON A, LEE KY, PAN SS, KETCHUM PA, LAMBERTI A und DEVRIES J (1971)
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* **68**:3242-3246.

NAWARATHNA D, MILLER JH, JR., CLAYCOMB JR, CARDENAS G und WARMFLASH D (2005)
Harmonic response of cellular membrane pumps to low frequency electric fields. *Phys Rev Lett* **95**:158103.

NELSON D (2007) Homepage
<<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>>.

NELSON DR, KOYMANS L, KAMATAKI T, STEGEMAN JJ, FEYEREISEN R, WAXMAN DJ, WATERMAN MR, GOTOH O, COON MJ, ESTABROOK RW, GUNSALUS IC und NEBERT DW (1996)

P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**:1-42.

NEUSSER M (2004)

RNA- und Protein-Microfluidics-Systeme zur qualitativen und quantitativen Analyse auch geringster Probenmengen. *BIOspektrum* **6**:802-803.

NIEMELA O, PARKKILA S, JUVONEN RO, VIITALA K, GELBOIN HV und PASANEN M (2000)

Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* **33**:893-901.

O'FARRELL PH (1975)

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**:4007-4021.

OHLSON S, LUNDBLAD A und ZOPF D (1988)

Novel approach to affinity chromatography using "weak" monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **169**:204-208.

OMURA T und SATO R (1964)

The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* **239**:2370-2378.

ORTIZ DE MONTELLANO P (1999)

The Cytochrome P450 Oxidative System, in: *Handbook of drug metabolism* (Woolf T ed), pp 109-130, Dekker, NY.

ORTIZ DE MONTELLANO P (1995)

Cytochrome P450. Structure, Mechanism and Biochemistry. Plenum Press, New York, USA.

OSCARSON M (2001)

Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* **29**:91-95.

OSTROVE S (1990)

Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol* **182**:357-371.

- PERKINS DN, PAPPIN DJ, CREASY DM und COTTRELL JS (1999)
Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**:3551-3567.
- PETERLIN-MASIC L, CESAR J und ZEGA A (2006)
Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* **12**:73-91.
- PETUSHKOVA NA, KANAIEVA IP, LISITSA AV, SHEREMETYEVA GF, ZGODA VG, SAMENKOVA NF, KARUZINA, II und ARCHAKOV AI (2006)
Characterization of human liver cytochromes P450 by combining the biochemical and proteomic approaches. *Toxicol In Vitro* **20**:966-974.
- PFEIFFER F, GRAHAM D und BETZ H (1982)
Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* **257**:9389-9393.
- PHILLIPS KA, VEENSTRA DL, OREN E, LEE JK und SADEE W (2001)
Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *Jama* **286**:2270-2279.
- PHILLIPS T und DICKENS B (2000) *Affinity and Immunoaffinity purification techniques*. Eaton Publishing, Natick, MA 01760.
- PORTER TD und COON MJ (1991)
Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **266**:13469-13472.
- PROKOP'EVA TM, SIMANENKO YS, KARPICHEV EA, SAVELOVA VA und POPOV AF (2004)
O-nucleophilic features of amidoximes in acyl group transfer reactions. *Russian Journal of Organic Chemistry* **40**:1617-1629.
- RAHMATHULLAH SM, HALL JE, BENDER BC, MCCURDY DR, TIDWELL RR und BOYKIN DW (1999)
Prodrugs for amidines: synthesis and anti-Pneumocystis carinii activity of carbamates of 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan. *J Med Chem* **42**:3994-4000.
- RAJAGOPALAN KV und JOHNSON JL (1992)
The pterin molybdenum cofactors. *J Biol Chem* **267**:10199-10202.

RAMADOSS CS (1980)

Effects of vanadate on the molybdoproteins xanthine oxidase and nitrate reductase: kinetic evidence for multiple site interaction. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **35C**:702-707.

RENAUD JP, BOUCHER JL, VADON S, DELAFORGE M und MANSUY D (1993)

Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of *N*-omega-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in no synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem Biophys Res Commun* **192**:53-60.

RENODON-CORNIERE A, DIJOLS S, PEROLLIER C, LEFEVRE-GROBOILLOT D, BOUCHER JL, ATTIAS R, SARI MA, STUEHR D und MANSUY D (2002)

N-Aryl *N'*-hydroxyguanidines, a new class of NO-donors after selective oxidation by nitric oxide synthases: structure-activity relationship. *J Med Chem* **45**:944-954.

RENODON-CORNIERE A, BOUCHER JL, DIJOLS S, STUEHR DJ und MANSUY D (1999)

Efficient formation of nitric oxide from selective oxidation of *N*-aryl *N'*-hydroxyguanidines by inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* **38**:4663-4668.

RHODES DG und LAUE TM (1990)

Determination of purity. *Methods Enzymol* **182**:555-565.

RIECKERT W (1999) *In vivo* und *in vitro* Biotransformation von Pentamidinderivaten, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

ROBINSON JB, JR., STROTTMANN JM und STELLWAGEN E (1981)

Prediction of neutral salt elution profiles for affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:2287-2291.

ROBINSON JB, JR., STROTTMANN JM, WICK DG und STELLWAGEN E (1980)

Affinity chromatography in nonionic detergent solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:5847-5851.

ROGERS MJ und STRITTMATTER P (1974)

Evidence for random distribution and translational movement of cytochrome b5 in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **249**:895-900.

- SADEQUE AJ, FISHER MB, KORZEKWA KR, GONZALEZ FJ und RETTIE AE (1997)
Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-enevalproic acid. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:698-703.
- SAULTER JY, KURIAN JR, TREPANIER LA, TIDWELL RR, BRIDGES AS, BOYKIN DW, STEPHENS CE, ANBAZHAGAN M und HALL JE (2005)
Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b₅ and NADH cytochrome b₅ reductase. *Drug Metab Dispos* **33**:1886-1893.
- SCHENKMAN JB, REMMER H und ESTABROOK RW (1967)
Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* **3**:113-123.
- SCHNAITMAN C und GREENAWALT JW (1968)
Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* **38**:158-175.
- SELLERS EM, KAPLAN HL und TYNDALE RF (2000)
Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin Pharmacol Ther* **68**:35-43.
- SHAW PM, HOSEA NA, THOMPSON DV, LENIUS JM und GUENGERICH FP (1997)
Reconstitution premixes for assays using purified recombinant human cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b₅. *Arch Biochem Biophys* **348**:107-115.
- SHIRABE K, LANDI MT, TAKESHITA M, UZIEL G, FEDRIZZI E und BORGESE N (1995)
A novel point mutation in a 3' splice site of the NADH-cytochrome b₅ reductase gene results in immunologically undetectable enzyme and impaired NADH-dependent ascorbate regeneration in cultured fibroblasts of a patient with type II hereditary methemoglobinemia. *Am J Hum Genet* **57**:302-310.
- SMITH MA, NAPIER JA, STYMNE S, TATHAM AS, SHEWRY PR und STOBART AK (1994)
Expression of a biologically active plant cytochrome b₅ in *Escherichia coli*. *Biochem J* **303 (Pt 1)**:73-79.
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ und KLENK DC (1985)
Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.

SOTTOCASA GL, KUYLENSTIERNA B, ERNSTER L und BERGSTRAND A (1967)

An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J Cell Biol* **32**:415-438.

SPATZ L und STRITTMATTER P (1971)

A form of cytochrome b₅ that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**:1042-1046.

SPEERS AE und WU CC (2007)

Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. *Chem Rev* **107**:3687-3714.

STIBOROVA M, FREI E, WIESSLER M und SCHMEISER HH (2001)

Human enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acids: evidence for reductive activation by cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Chem Res Toxicol* **14**:1128-1137.

STODDART AM und LEVINE WG (1992)

Azoreductase activity by purified rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochem Pharmacol* **43**:2227-2235.

STOEHRER G (1968)

Reduction of hydroxylamine derivatives by xanthine oxidase. *Israel Journal of Chemistry* **6**:845-846.

STUEHR DJ (1999)

Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1411**:217-230.

STUEHR DJ und MARLETTA MA (1987)

Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* **47**:5590-5594.

SUGIHARA K, KITAMURA S und TATSUMI K (1983)

Evidence for reduction of hydroxamic acids to the corresponding amides by liver aldehyde oxidase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **31**:3366-3369.

SUGIHARA K und TATSUMI K (1986)

Participation of liver aldehyde oxidase in reductive metabolism of hydroxamic acids to amides. *Arch Biochem Biophys* **247**:289-293.

SUGIHARA K, KITAMURA S und TATSUMI K (1996)

S(-)-nicotine-1'-N-oxide reductase activity of rat liver aldehyde oxidase. *Biochem Mol Biol Int* **40**:535-541.

- TAI AW, LIEN EJ, LAI MM und KHWAJA TA (1984)
Novel N-hydroxyguanidine derivatives as anticancer and antiviral agents. *J Med Chem* **27**:236-238.
- TATSUMI K und ISHIGAI M (1987)
Oxime-metabolizing activity of liver aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys* **253**:413-418.
- TATSUMI K, KITAMURA S und NARAI N (1986)
Reductive metabolism of aromatic nitro compounds including carcinogens by rabbit liver preparations. *Cancer Res* **46**:1089-1093.
- TATSUMI K, YAMADA H und KITAMURA S (1983)
Reductive metabolism of N-nitrosodiphenylamine to the corresponding hydrazine derivative. *Arch Biochem Biophys* **226**:174-181.
- TESTA B (1995) The nature and functioning of cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases, in: *Biochemistry of Redox Reactions*, pp 71-121, Academic Press, San Diego.
- TESTA B und MAYER JM (2003) *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*. Wiley-VCH, Weinheim.
- TESTA B und MAYER J (2001) Concepts in prodrug design to overcome pharmacokinetic problems in: *Pharmakokinetic optimization in drug research: biological, physiochemical and computational strategies*, pp 86-95, Wiley-VHCA, Zürich.
- TESTAI E (2001)
The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for in vitro toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol* **17**:271-285.
- TIEMANN F (1884)
Effect of hydroxylamine on nitriles. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **17**:126-129.
- TURKOVA J (1978)
Use of affinity chromatography for determination of dissociation constants of complexes of trypsin and chymotrypsin with their free and immobilized inhibitors. *Enzyme Engineering* **4**:451-452.
- UEDA O, SUGIHARA K, OHTA S und KITAMURA S (2005)
Involvement of molybdenum hydroxylases in reductive metabolism of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian skin. *Drug Metab Dispos* **33**:1312-1318.

VAN SOMMEREN APG, MACHIELSEN PAGM und GRIBNAU TCJ (1993)
Comparison of three activated agaroses for use in affinity chromatography: effects on coupling performance and ligand leakage. *Journal of Chromatography* **639**:23-31.

VEENSTRA TD, CONRADS TP und ISSAQ HJ (2004)
What to do with "one-hit wonders"? *Electrophoresis* **25**:1278-1279.

WAHL RC und RAJAGOPALAN KV (1982)
Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J Biol Chem* **257**:1354-1359.

WALKER JB und WALKER MS (1959)
The enzymatic reduction of hydroxyguanidine. *J Biol Chem* **234**:1481-1484.

WOLF S (2003) Biotransformation studies on the *N*-reduction of para substituted *N*-aryl-*N'*-hydroxyguanidines and arylamidoximes, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

WRIGHTON SA, VANDENBRANDEN M, STEVENS JC, SHIPLEY LA, RING BJ, RETTIE AE und CASHMAN JR (1993)
In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. *Drug Metab Rev* **25**:453-484.

XIAN M, FUJIWARA N, WEN Z, CAI T, KAZUMA S, JANCZUK AJ, TANG X, TELYATNIKOV VV, ZHANG Y, CHEN X, MIYAMOTO Y, TANIGUCHI N und WANG PG (2002)
Novel substrates for nitric oxide synthases. *Bioorg Med Chem* **10**:3049-3055.

YAMAZAKI H und SHIMADA T (2006)
Cytochrome P450 reconstitution systems. *Methods Mol Biol* **320**:61-71.

YAMAZAKI H, UENG YF, SHIMADA T und GUENGERICH FP (1995)
Roles of divalent metal ions in oxidations catalyzed by recombinant cytochrome P450 3A4 and replacement of NADPH--cytochrome P450 reductase with other flavoproteins, ferredoxin, and oxygen surrogates. *Biochemistry* **34**:8380-8389.

YANG MX und CEDERBAUM AI (1996)
Interaction of ferric complexes with NADH-cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅: lipid peroxidation, H₂O₂ generation, and ferric reduction. *Arch Biochem Biophys* **331**:69-78.

YENGI LG, LEUNG L und KAO J (2007)
The evolving role of drug metabolism in drug discovery and development. *Pharm Res* **24**:842-858.

- YOUNG CW, SCHOCHETMAN G, HODAS S und BALIS ME (1967)
Inhibition of DNA synthesis by hydroxyurea: structure-activity relationships. *Cancer Res* **27**:535-540.
- YU WH und FORTE M (1996)
Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria? *J Bioenerg Biomembr* **28**:93-100.
- YUBISUI T und TAKESHITA M (1980)
Characterization of the purified NADH-cytochrome b₅ reductase of human erythrocytes as a FAD-containing enzyme. *J Biol Chem* **255**:2454-2456.
- YUN CH, SHIMADA T und GUENGERICH FP (1991)
Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Mol Pharmacol* **40**:679-685.
- ZAHEDI RP, MEISINGER C und SICKMANN A (2005)
Two-dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride/SDS-PAGE for membrane proteomics. *Proteomics* **5**:3581-3588.
- ZAKHARYAN RA, TSAPRAILIS G, CHOWDHURY UK, HERNANDEZ A und APOSHIAN HV (2005)
Interactions of sodium selenite, glutathione, arsenic species, and omega class human glutathione transferase. *Chem Res Toxicol* **18**:1287-1295.
- ZEBOITSEN I (2005) Charakterisierung, Metabolismus und Interaktionspotential zytostatisch wirksamer 6-Aminobenzo[*a*]phenanthridine, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- ZHANG Z, LI Y, SHOU M, ZHANG Y, NGUI JS, STEARNS RA, EVANS DC, BAILLIE TA und TANG W (2004)
Influence of different recombinant systems on the cooperativity exhibited by cytochrome P4503A4. *Xenobiotica* **34**:473-486.
- ZIEGLER DM (2002)
An overview of the mechanism, substrate specificities and structure of FMOs. *Drug Metab Rev* **34**:503-511.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, das mir überlassene interessante Thema und die Freiheit bei der Gestaltung und seine außerordentliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Entstehung dieser Arbeit möchte ich meinem Doktorvater herzlich danken.

Vielen Dank auch an Herrn HD Dr. Thomas Kunze, Herrn Dr. Florian Bittner und Herrn Dr. Ulrich Girreser für ihre wertvollen Tipps und Hilfestellungen.

Meinen aufmerksamen Korrekturlesern Niko, Antje, Dennis und Thomas danke ich für ihre konstruktive Kritik. An dieser Stelle auch ganz lieben Dank meinem Mann, dass er seinen Urlaub zur Beseitigung literarischer Schwächen geopfert hat, und meinem Vater für seine akribische Tippfehlersuche.

Ein herzliches Dankeschön an Dennis, Uli, Helen, Melissa und Lena für die Hilfestellung beim synthetischen Arbeiten, Aufnehmen und Auswerten der NMR-Spektren.

Sven, ohne den HPLC-technisch gar nichts geht, und Petra, ohne deren unermüdlichen Einsatz sicher kaum noch Enzymvorräte in der Tiefkühltruhe schlummern würden, vielen Dank für alles.

Judith und Chelly sei herzlich für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit und den „Kaffeeservice“ bei der Betreuung des 5. Semesters gedankt.

Meiner „Mädels-Runde“ Niko, Nina, Antje, Rike, Christiane, Judith, Meike, Ilka, Petra und Juliane danke ich für die Highlights eines jeden Arbeitstages - die Mittagspausen und die Ablenkung vom Uni-Alltag als Tagungs-Touris und bei vielen lustigen Primelparties.

Allen meinen Kollegen, insbesondere der „Reinigungsgruppe“, bin ich für ihre Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Miteinander sehr dankbar. Es hat Spaß gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten.

Niko, Regina, Agnes und Marion vielen Dank für die schöne Zeit während des Studiums und in den letzten vier Jahren und insbesondere für den einzigartigen Jungesellinnen-Abschied!

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Ihr habt Euch nie eingemischt, aber mich in allem unterstützt und mir das Gefühl gegeben, dass ihr immer für mich da seid. Ihr wisst gar nicht, wie wichtig mir das ist!

Besonders bei Moritz, ohne den ich vielleicht nie eine Promotion angefangen hätte, möchte ich mich bedanken, dass er mich bei kurzen hysterischen Attacken auf seine unverwechselbare Art schnell wieder auf den Boden der Tatsachen geholt hat.

PERSÖNLICHE DATEN

| | |
|---------------------|------------------------------|
| Name | Stephanie Kanzow (geb. Wolf) |
| Geburtsdatum | 17. Mai 1978 |
| Geburtsort | Hildesheim |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

SCHULAUSBILDUNG

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| 1984 bis 1988 | Grundschule Sibbesse |
| 1988 bis 1990 | Orientierungsstufe Lamspringe |
| 1990 bis 1997 | Gymnasium Himmelsthür, Hildesheim |

AUSLANDSAUFENTHALT

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| 1997 bis 1998 | Au Pair in Tucson / Arizona (USA) |
|---------------|-----------------------------------|

STUDIUM DER PHARMAZIE

| | |
|---------------|--|
| 1998 bis 2002 | Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel |
| 2003 | Wissenschaftliche Arbeit am Pharmakologisch-Toxikologischen Institut der Universität Paris als Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdienstes |
| 2003 | Belvedere-Apotheke, Kiel |
| Januar 2004 | Approbation als Apothekerin |

DIPLOM

| | |
|------|--|
| 2003 | Diplomarbeit zum Thema „Biotransformation studies on the <i>N</i> -reduction of <i>para</i> -substituted <i>N</i> -aryl- <i>N</i> '-hydroxyguanidines and arylamidoximes“ am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel und dem Pharmakologisch-Toxikologischen Institut der Universität Paris |
|------|--|

PROMOTION UND WEITERBILDUNG

| | |
|-----------------|---|
| seit April 2004 | wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Abteilung Pharmazeutische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Clement |
| Juni 2007 | Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik |

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Wolf S, Boucher JL, Mansuy D, Clement B.

Reductive and Oxidative Metabolism of *N*-Aryl-*N'*-Hydroxyguanidines by liver microsomes

Poster at PharmSciFair in Nice, France, 2005

Clement B, Behrens D, Amschler J, Matschke K, Wolf S, 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. 2005, 77(2):205-19

Heberling S, Girreser U, Wolf S, Clement B.

Oxygen-insensitive enzymatic reduction of oximes to imines.

Biochem Pharmacol. 2006, 71(3):354-65

Kiel, im Dezember 2007

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den enzymatischen Grundlagen der mikrosomalen Reduktion stark basischer *N*-hydroxylierter Amidin- und Guanidin-Strukturen.

Ein reduktiver Metabolismus von *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen ist relevant, weil er ihre Einsetzbarkeit als neue potentielle NO-Donoren erheblich limitiert. Andererseits stellt er ein hochwirksames Prodrug Prinzip für stark basische funktionelle Gruppen dar, welches eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit einer Vielzahl von Arzneistoffen mit Guanidinfunktionen ermöglicht.

Eine effiziente Reduktion einer Reihe von *para*-substituierten *N*-Aryl-*N'*-hydroxyguanidinen wird durch mikrosomale Enzympräparationen unterschiedlicher Spezies katalysiert. Die für die Reduktion von Amidoximen verantwortlichen Enzyme zeigen sich ebenfalls an der Reduktion von *N*-Hydroxyguanidinen beteiligt. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase, die die Reduktion allein katalysieren, wenn auch nur mit geringen Umsetzungsraten. Ihre Reduktase Aktivität kann aber durch Zusatz einer nicht identifizierten mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente, für die bislang ein Cytochrom P450 Isoenzym der Familie 2D postuliert wurde, deutlich gesteigert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals dasjenige Protein, welches bereits in Mitochondrien als das für die *N*-Reduktion verantwortliche Enzym isoliert wurde, in Lebermikrosomen massenspektrometrisch, anhand immunochemischer Methoden und mit Hilfe eines enzymatischen Assays nachgewiesen. Die Beteiligung an der mikrosomalen Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen wird anhand einer im Verlauf der Reinigung korrelierbaren Anreicherung des Molybdäncofaktors und Hemmstudien mit Natriummetavanadat bestätigt.

Nicht das vielfach gereinigte Cytochrom P450 Isoenzym 2D, sondern die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente ist demnach für die katalytische Aktivität der mikrosomalen *N*-reduktiven Komponente verantwortlich.

In the present study the microsomal enzymes responsible for the reduction of *N*-hydroxylated amidine and guanidine functions were investigated.

A reductive metabolism of *N*-aryl-*N'*-hydroxyguanidines is highly relevant regarding their potential use as nitric oxide donors of pharmacological interest. Also, it represents a prodrug principle for strongly basic functional groups that allows improved oral bioavailability for a large number of drugs with guanidine functions.

An efficient reduction of a series of *para*-substituted *N*-aryl-*N'*-hydroxyguanidines is catalysed by microsomal preparations of different species. The enzymes responsible for the reductive metabolism of amidoximes have been determined of being also capable of *N*-hydroxyguanidine reduction. These are cytochrome b_5 and NADH cytochrome b_5 reductase, which alone are able to catalyse the reaction, though with low reduction rates. Their reductase activity is greatly enhanced by the addition of a third, so far unidentified microsomal compound, probably a cytochrome P450 enzyme of the 2D family.

For the first time the molybdoenzyme responsible for mitochondrial *N*-reductive metabolism has also been identified in the purified microsomal third compound by mass spectrometry, western blot analysis and an enzymatic assay. The involvement of this protein in the microsomal reduction of *N*-hydroxylated functional groups has been demonstrated by the coherent enrichment of molybdenum cofactor during purification and inhibition studies with vanadate ions.

Therefore the molybdoprotein has been shown to be the responsible enzyme for the *N*-reductive catalytic activity of liver microsomes.

