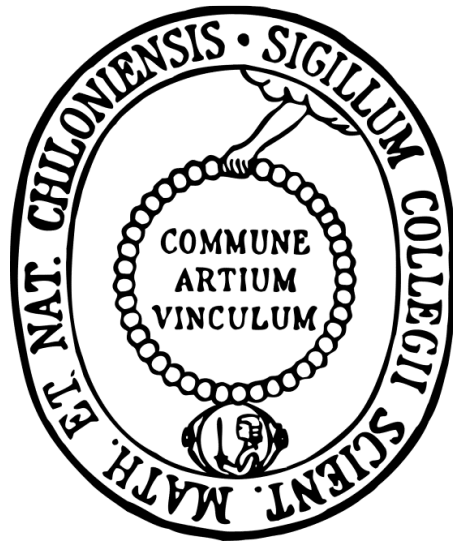


Reduktion von aliphatischen Amidoximen und *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch neue molybdänhaltige Enzysysteme



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Nina Krompholz

Kiel 2013

Referent:

Prof. Dr. Bernd Clement

Korreferent:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

31. Januar 2013

Zum Druck genehmigt:

31. Januar 2013

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl

(Dekan)

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	mehrfachdestilliertes Wasser
AT	Adenin-Thymin-Basenpaar
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cystein
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cnx	cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase
cPMP	cyclic pyranopterin monophosphate
dADP	Desoxy-Adenosindiphosphat
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
dHAPDP	desoxy- <i>N</i> -Hydroxyadenosindiphosphat
dHATP	desoxy- <i>N</i> -Hydroxyadenosintriphosphat
Dim.	Dimerisierungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced Chemilumineszenz
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid

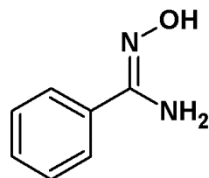
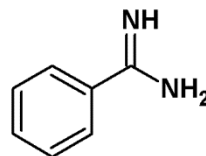
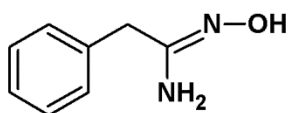
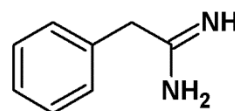
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
FMN	Flavinmononucleotid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanin-Cytosin-Basenpaar
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	human
HAP	<i>N</i> -Hydroxyadenin
HAPDP	<i>N</i> -Hydroxyadenosindiphosphat
HAPMP	<i>N</i> -Hydroxyadenosinmonophosphat
HEK-293	humane Nierenzelllinie (Human Embryonic Kidney Cell Line)
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His ₆	6× Histidin Tag (Histidin-Markierung)
hmARC	humanes mARC Protein (<i>H. sapiens</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICP-MS	inductively coupled plasma-mass spectrometry
IgG	Immunglobulin G
IMP	Inosinmonophosphat
ITPA	Inosintriphosphat-Pyrophosphatase
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten Konstante
<i>m/z</i>	Masse zu Ladungsverhältnis
mARC	mitochondrial Amidoxime Reducing Component
MCP	Moco-carrier Protein
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinucleotid
Mo	Molybdän

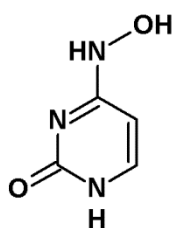
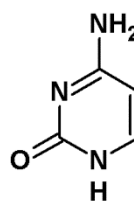
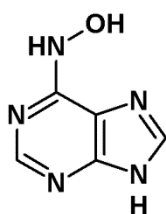
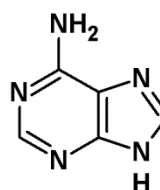
MoBP	Moco-binding Protein
Moco	Molybdäncofaktor
MOCS	molybdenum cofactor synthesis
MOSC	Moco sulfurase C-terminal domain
MPT	Molybdopterin
MPT-ATP	adenyliertes-MPT
mRNA	messenger-RNA
N	Stickstoff
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
ND	nicht detektierbar
N-Hydroxy-AMP	N-Hydroxyadenosinmonophosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Acetat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
O	Sauerstoff
OMV	äußere mitochondriale Membran (outer membrane vesicle)
p	pflanzlich
P450	Cytochrom P450
pK _a	Säurekonstante
pmARC	pflanzliches mARC Protein (<i>A. thaliana</i>)
PNS	post nuclear supernatant
PRPP	Phosphoribosyl-pyrophosphat
RNA	Ribonucleinsäure
RNR	Ribonucleotidreduktase
RSD	relative Standardabweichung
S	Schwefel
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-Buffered Saline Tween 20

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

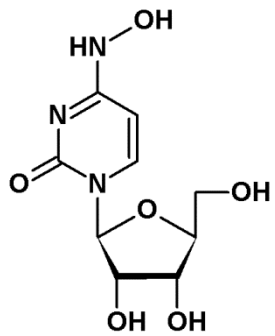
TEAC	Triethylammoniumhydrogencarbonat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VDAC	voltage dependent anion channel
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

STRUKTURFORMELVERZEICHNIS**AMIDOXIME/ AMIDINE**

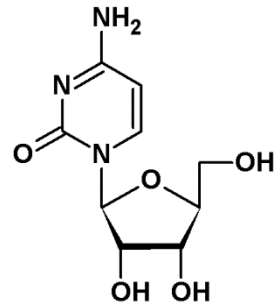
**Benzamidoxim****Benzamidin****Benzylamidoxim****Benzylamidin****N-HYDROXYLIERTE NUCLEOBASEN/NUCLEOBASEN**

**N-Hydroxycytosin****Cytosin****N-Hydroxyadenin****Adenin**

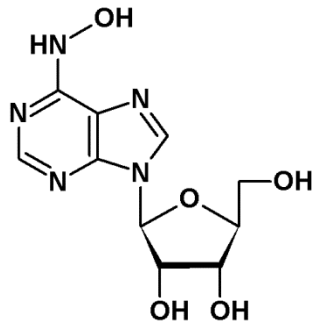
N-HYDROXYLIERTE NUCLEOSIDE/NUCLEOSIDE



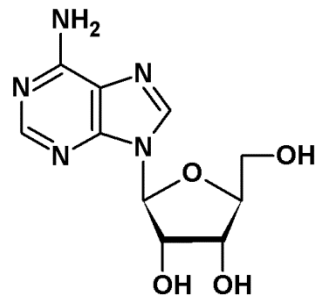
N-Hydroxycytidin



Cytidin

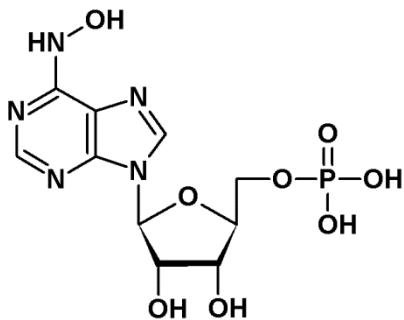


N-Hydroxyadenosin

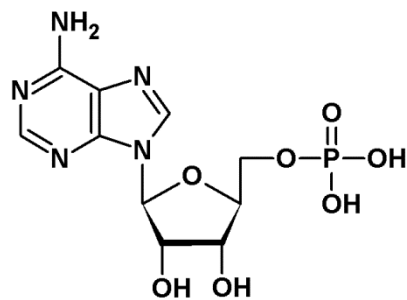


Adenosin

N-HYDROXYLIERTE NUCLEOTIDE/NUCLEOTIDE



N-Hydroxy-AMP



AMP

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. MOLYBDÄNCOFACTOR BIOSYNTHESE UND MOLYBDOENZYME.....	1
1.1.1. Molybdäncofaktor-Biosynthese.....	2
1.1.2. Terminale Sulfurierung des Molybdäncofaktors.....	7
1.1.3. Molybdoenzyme.....	11
1.2. THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
2. REDUKTION VON ALIPHATISCHEN AMIDOXIMEN DURCH DAS OPTIMIERTE EUKARYOTISCHE MARC ENZYSYSTEM	19
2.1. EINLEITUNG.....	19
2.1.1. Prodrugprinzip „Amidoxime statt Amidine“	19
2.1.2. mARC-haltiges Dreikomponenten-Enzysystem	20
2.1.3. Thema und Zielsetzung.....	24
2.2. METHODEN	25
2.2.1. Materialien und Geräte.....	25
2.2.2. Enzymquellen	25
2.2.2.1. Gewinnung porciner Leberenzymquellen	25
2.2.2.1.1. Isolierung von Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol.....	25
2.2.2.1.2. Isolierung der äußeren Membran Vesikel (OMV)	25
2.2.2.1.3. Isolierung von mARC.....	25

2.2.2.2. Rekombinante Enzymquellen.....	26
2.2.2.2.1. mARC	26
2.2.2.2.2. Cytochrom b ₅ /Cytochrom b ₅ Reduktase	26
2.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen	27
2.2.3.1. Bestimmung des Proteingehalts	27
2.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.2.3.3. Coomassie-Färbung.....	29
2.2.3.4. Westernblot.....	29
2.2.3.5. Bestimmung des Molybdän-Gehalts.....	30
2.2.3.6. Bestimmung des Häm-Gehalts	31
2.2.3.7. Bestimmung des FAD-Gehalts	31
2.2.3.8. Charakterisierung der <i>in vitro</i> Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim	32
2.2.4. <i>In vitro</i> Biotransformationsstudien von Benzylamidoxim.....	34
2.2.4.1. HPLC-Analytik	34
2.2.4.2. Kalibrierung und Wiederfindung	35
2.2.4.3. Stabilität von Benzylamidoxim und Benzylamidin.....	35
2.2.4.4. <i>In vitro</i> Biotransformationsansatz.....	35
2.2.4.5. Inkubationsansatz mit porcinen hepatischen Enzymquellen	36
2.2.4.6. Inkubationsansatz mit rekombinanten humanen Enzymquellen	37
2.3. ERGEBNISSE.....	38
2.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen	38
2.3.1.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.3.1.2. Molybdän-Bestimmung	40

2.3.1.3. Häm-Gehaltsbestimmung	41
2.3.1.4. FAD-Gehaltsbestimmung.....	41
2.3.1.5. <i>In vitro</i> Studien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim.....	41
2.3.2. <i>In vitro</i> Reduktion von Benzylamidoxim	44
2.3.2.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm	44
2.3.2.2. Kalibrierung und Wiederfindung	45
2.3.2.3. Stabilität.....	46
2.3.2.4. Reduktion durch subzelluläre hepatische Fraktionen	46
2.3.2.5. Reduktion durch die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV).....	48
2.3.2.6. Reduktion durch natives mARC	53
2.3.2.7. Rekonstituiertes System mit rekombinanten humanen mARC- Homologen.....	54
2.4. DISKUSSION	56
2.5. ZUSAMMENFASSUNG.....	60
3. CHARAKTERISIERUNG VON PROKARYOTISCHEN UND EUKARYOTISCHEN N-REDUKTIVEN MOSC- PROTEINEN.....	61
3.1. EINLEITUNG.....	61
3.1.1. Prokaryotische Molybdoenzyme YcbX und YiiM	61
3.1.2. Elektronentransportproteine CysJ und Fre.....	64
3.1.3. Thema und Zielsetzung.....	66
3.2. METHODEN	68

3.2.1. Materialien und Geräte.....	68
3.2.2. Rekombinante Enzymquellen.....	68
3.2.2.1. MOSC-Proteine	68
3.2.2.2. Elektronentransportproteine.....	69
3.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen	69
3.2.3.1. Bestimmung des Proteingehalts	69
3.2.3.2. Molybdän-Bestimmung mittels ICP-MS	70
3.2.3.3. Flavin-Bestimmung	70
3.2.4. Charakterisierung der <i>in vitro</i> Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim.....	71
3.2.5. Untersuchungen zum Einfluss der Elektronentransportproteine.....	72
3.2.6. Untersuchungen zu prokaryotischen und eukaryotischen MOSC- Varianten.....	73
3.3. ERGEBNISSE.....	74
3.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen	74
3.3.1.1. Bestimmung des Molybdän-Gehalts.....	74
3.3.1.2. Bestimmung des Flavin-Gehalts.....	75
3.3.2. Charakterisierung der <i>in vitro</i> Reduktion des Benzamidoxims durch YcbX.....	78
3.3.2.1. Einfluss des pH-Werts	78
3.3.2.2. Einfluss der Puffersubstanz und -konzentration	79
3.3.2.3. Charakterisierung der Reduktion	80
3.3.2.4. Bestimmung der kinetischen Parameter	81
3.3.3. Charakterisierung der <i>in vitro</i> Reduktion des Benzamidoxims durch YiiM.....	82

3.3.3.1. Charakterisierung der Reduktion	82
3.3.3.2. Bestimmung der kinetischen Parameter	83
3.3.4. Austauschbarkeit der Elektronentransportproteine	84
3.3.5. Untersuchungen zu prokaryotischen und eukaryotischen MOSC- Varianten.....	86
3.4. DISKUSSION	88
3.5. ZUSAMMENFASSUNG.....	93
4. DETOXIFIZIERUNG N-HYDROXYLIERTER NUCLEO- BASEN UND NUCLEOSIDE.....	95
4.1. EINLEITUNG.....	95
4.1.1. Basenanaloga.....	95
4.1.2. Entstehung <i>N</i> -hydroxylierter Basenanaloga	96
4.1.3. Mutagene Wirkung <i>N</i> -hydroxylierter Basenanaloga.....	98
4.1.4. Thema und Zielsetzung.....	100
4.2. METHODEN	102
4.2.1. Materialien und Geräte.....	102
4.2.2. Enzymquellen	102
4.2.2.1. Gewinnung porciner Enzymquellen.....	102
4.2.2.1.1. Gewinnung von Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol aus Leber	102
4.2.2.1.2. Gewinnung von Mitochondrien aus extrahepatischen Organen.....	102
4.2.2.2. Rekombinante Enzymquellen.....	103

4.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen	104
4.2.3.1. Bestimmung des Proteingehalts	104
4.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	104
4.2.3.3. Bestimmung der Cofaktorgehälter der rekombinanten eukaryotischen Enzymquellen	104
4.2.3.4. Charakterisierung der <i>in vitro</i> Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim	105
4.2.4. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxycytosin und Cytosin.....	106
4.2.4.1. HPLC-Methode	106
4.2.4.2. Kalibrierung und Wiederfindung	107
4.2.4.3. Stabilität von <i>N</i> -Hydroxycytosin und Cytosin.....	107
4.2.5. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxyadenin und Adenin.....	108
4.2.5.1. HPLC-Methode	108
4.2.5.2. Kalibrierung und Wiederfindung	109
4.2.5.3. Stabilität von <i>N</i> -Hydroxyadenin und Adenin.....	109
4.2.6. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxycytidin und Cytidin	110
4.2.6.1. HPLC-Methode	110
4.2.6.2. Kalibrierung und Wiederfindung	111
4.2.6.3. Stabilität von <i>N</i> -Hydroxycytidin und Cytidin	111
4.2.7. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxyadenosin und Adenosin	112
4.2.7.1. HPLC-Methode	112
4.2.7.2. Kalibrierung und Wiederfindung	113
4.2.7.3. Stabilität von <i>N</i> -Hydroxyadenosin und Adenosin.....	113

4.2.8. <i>In vitro</i> Biotransformationsstudien von <i>N</i> -hydroxylierten Basenanaloga	114
4.2.8.1. <i>In vitro</i> Biotransformationsansatz.....	114
4.2.8.1.1. Inkubation mit hepatischen Subfraktionen.....	114
4.2.8.1.2. Inkubation mit extrahepatischen porcinen Enzymquellen.....	115
4.2.8.1.3. Inkubation mit rekombinanten humanen oder pflanzlichen Enzymquellen.....	116
4.2.8.1.4. Inkubation mit rekombinanten prokaryotischen Enzymquellen.....	118
4.3. ERGEBNISSE.....	119
4.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen	119
4.3.1.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	119
4.3.1.2. Cofaktor-Gehälter der rekombinanten eukaryotischen Enzymquellen	119
4.3.1.3. <i>In vitro</i> Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim.....	119
4.3.2. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxycytosin und Cytosin.....	121
4.3.2.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm.....	121
4.3.2.2. Kalibrierung und Wiederfindung	122
4.3.2.3. Stabilität.....	123
4.3.3. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxyadenin und Adenin.....	124
4.3.3.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm.....	124
4.3.3.2. Kalibrierung und Wiederfindung	125
4.3.3.3. Stabilität.....	126
4.3.4. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxycytidin und Cytidin	127
4.3.4.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm.....	127

4.3.4.2. Kalibrierung und Wiederfindung	128
4.3.4.3. Stabilität.....	129
4.3.5. HPLC-Analytik zur Trennung von <i>N</i> -Hydroxyadenosin und Adenosin	130
4.3.5.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm.....	130
4.3.5.2. Kalibrierung und Wiederfindung	131
4.3.5.3. Stabilität.....	132
4.3.6. <i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit <i>N</i> -hydroxylierten Basen- analoga	133
4.3.6.1. Reduktion durch porcine Enzymquellen	133
4.3.6.1.1. Subzelluläre hepatische Fraktionen	133
4.3.6.1.2. Bestimmung der kinetischen Parameter der mitochondrialen hepatischen Fraktion	135
4.3.6.1.3. Hepatische und extrahepatische Mitochondrien	137
4.3.6.2. Reduktion durch rekombinante humane und pflanzliche mARC- Homologe im rekonstituierten System.....	139
4.3.6.2.1. Einfluss der Enzymcharge	139
4.3.6.2.2. Ermittlung der optimalen Stöchiometrie.....	141
4.3.6.2.3. Einfluss der Inkubationszeit.....	143
4.3.6.2.4. Bestimmung der kinetischen Parameter.....	145
4.3.6.2.5. Charakterisierung der Reduktion.....	148
4.3.6.3. Reduktion durch rekombinante prokaryotische Enzymquellen im rekonstituierten System	151
4.4. DISKUSSION	154
4.5. ZUSAMMENFASSUNG.....	162

5. DETOXIFIZIERUNG N-HYDROXYLIERTER

NUCLEOTIDE..... 163

5.1. EINLEITUNG..... 163

 5.1.1. Stoffwechsel der Adeninnucleotide..... 163

 5.1.2. Thema und Zielsetzung..... 166

5.2. METHODEN 168

 5.2.1. Materialien und Geräte..... 168

 5.2.2. Enzymquellen 169

 5.2.2.1. Gewinnung porciner Enzymquellen..... 169

 5.2.2.2. Rekombinante Enzymquellen..... 169

 5.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen 169

 5.2.4. *In vitro* Biotransformationsstudien von *N*-Hydroxy-AMP..... 170

 5.2.4.1. Synthese von *N*-Hydroxy-AMP..... 170

 5.2.4.2. HPLC-Analytik 172

 5.2.4.3. Kalibrierung und Wiederfindung 173

 5.2.4.4. Stabilität von *N*-Hydroxy-AMP und AMP 173

 5.2.4.5. *In vitro* Biotransformationsansatz..... 173

 5.2.4.5.1. Inkubation mit hepatischen Subfraktionen..... 174

 5.2.4.5.2. Inkubation mit extrahepatischen porcinen Enzymquellen..... 174

 5.2.4.5.3. Inkubation mit rekombinanten humanen Enzymquellen..... 174

 5.2.4.5.4. Inkubation mit rekombinanten prokaryotischen
 Enzymquellen..... 175

5.3. ERGEBNISSE..... 176

 5.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen 176

5.3.2. <i>In vitro</i> Biotransformationsstudien von <i>N</i> -Hydroxy-AMP.....	176
5.3.2.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm.....	176
5.3.2.2. Kalibrierung und Wiederfindung.....	177
5.3.2.3. Stabilität.....	178
5.3.2.4. Reduktion mit porcinen Enzymquellen.....	179
5.3.2.4.1. Subzelluläre hepatische Fraktionen.....	179
5.3.2.4.2. Bestimmung der kinetischen Parameter der mitochondrialen hepatischen Fraktion.....	180
5.3.2.4.3. Hepatische und extrahepatische Mitochondrien.....	181
5.3.2.5. Rekonstituiertes System mit rekombinanten humanen mARC- Homologen.....	182
5.3.2.5.1. Einfluss der Inkubationszeit.....	182
5.3.2.5.2. Bestimmung der kinetischen Parameter.....	183
5.3.2.5.3. Charakterisierung der Reduktion.....	184
5.3.2.6. Rekonstituiertes System mit rekombinanten prokaryotischen Enzymquellen.....	185
5.4. DISKUSSION.....	187
5.5. ZUSAMMENFASSUNG.....	192
6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	194
7. MATERIALIEN UND GERÄTE.....	200
7.1. SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN.....	200
7.2. GERÄTE.....	202

8. LITERATURVERZEICHNIS.....204

1. EINLEITUNG

1.1. MOLYBDÄNCOFACTOR BIOSYNTHESE UND MOLYBDO-ENZYME

Molybdän ist ein Übergangsmetall, welches in der fünften Periode und der sechsten Gruppe des Periodensystems zu finden ist. Es ist in einer Vielzahl von Metalloenzymen in Bakterien, Pilzen, Algen, Pflanzen und Säugetieren vertreten. Dabei bildet das Molybdän zusammen mit einem Pyranopterin, mit welchem es komplexiert vorliegt, eine prosthetische Gruppe, die als Molybdäncofaktor (Moco) bezeichnet wird (Hille, 1996). Eine Ausnahme dazu stellt nur die Nitrogenase in Bakterien dar, bei der das Molybdän in einem Eisen-Schwefel-Cluster gebunden vorliegt (Kisker *et al.*, 1997).

Molybdoenzyme sind an zahlreichen Redoxreaktionen des Stickstoff-, Schwefel- und Kohlenstoff-Metabolismus beteiligt (Hille, 2002). Als Spurenelement ist Molybdän für fast alle Organismen essentiell (Ausnahme: *Saccharomyces cerevisiae* (Mendel und Bittner, 2006)). Die empfohlene tägliche Zufuhr sollte für einen erwachsenen Menschen 50–100 µg Molybdän betragen. Ein Molybdän-Mangel kommt allerdings nicht vor, da Molybdän reichhaltig vorhanden ist und von Pflanzen aus dem Boden in Form von Molybdat aufgenommen werden kann (Rajagopalan, 1988).

Bisher wurden mehr als 50 Molybdoenzyme identifiziert, von denen allerdings die meisten in Prokaryoten vorliegen und nur sieben davon in Eukaryoten gefunden wurden. Die wichtigsten sind die Aldehydoxidase, die Xanthinoxidoreduktase, die Sulfitoxidase, die Nitratreduktase und das mARC(mitochondrial Amidoxime Reducing Component)-Enzym. Die eukaryotisch vorkommenden Molybdoenzyme können in zwei Subfamilien unterteilt werden. Bei der Sulfitoxidase-Familie ist das Molybdän über einen Cystein-Rest kovalent ans Protein gebunden, während der

Molybdäncofaktor bei der Xanthinoxidase-Familie über einen dritten terminalen Schwefelliganden verfügt (Hille, 1996; Kisker *et al.*, 1997).

1.1.1. Molybdäncofaktor-Biosynthese

Molybdän wird von einem tricyclischen Pterin komplexiert und bildet zusammen mit diesem den Molybdäncofaktor, welcher die biologisch aktive Form darstellt (Hille, 1996).

Die ersten Untersuchungen dazu wurden mit Mutanten des Pilzes *Aspergillus nidulans* durchgeführt, die einen gleichzeitigen Verlust der Enzyme Nitratreduktase und Xanthinoxidoreduktase aufwiesen. Das Vorhandensein eines einheitlichen Molybdäncofaktors war die einzige Gemeinsamkeit der sonst sehr unterschiedlichen Enzyme (Pateman *et al.*, 1964).

Der biologische Nachweis für die Existenz eines einheitlichen Cofaktors konnte wenig später mit Hilfe eines Protein-Extrakts der *nit-1*-Mutante *Neurospora crassa* erbracht werden (Nason *et al.*, 1971). Diese weist einen Defekt in der Molybdäncofaktor-Biosynthese auf, so dass eine Moco-freie, inaktive Apo-Nitratreduktase vorhanden ist, welche durch den Molybdäncofaktor verschiedener Quellen rekonstituiert werden kann. Der *nit-1*-Assay stellt damit einen sehr sensitiven biologischen *in vitro* Nachweis für die Cofaktor-Bestimmung dar.

Die Strukturaufklärung fand dann allerdings aufgrund der chemischen Instabilität des Molybdäncofaktors über dessen stabile Oxidationsprodukte FormA und FormB statt (Johnson *et al.*, 1980; Rajagopalan und Johnson, 1992). Mit Hilfe der FormA-Analyse kann HPLC-basiert die Molybdäncofaktormenge von Enzymen bestimmt werden. Allerdings wird neben dem Molybdäncofaktor auch das inaktive MPT mitbestimmt. Außerdem existiert zurzeit noch kein zuverlässiger Standard zur Quantifizierung der Molybdäncofaktormenge.

Die Bildung des Molybdäncofaktors läuft bei allen bisher untersuchten Organismen auf einem konservierten Syntheseweg ab. Dabei sind sechs Proteine in vier Schritten

beteiligt (Mendel und Kruse, 2012). In Pflanzen werden die Gene und Genprodukte nach der *cnx*-Nomenklatur (cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase) und im Menschen nach der MOCS-Nomenklatur (molybdenum cofactor synthesis) bezeichnet (Reiss *et al.*, 1998).

Im ersten Schritt der Molybdäncofaktor-Synthese findet die Umwandlung von GTP zu cPMP (cyclic pyranopterin monophosphate; früher als Precursor Z bezeichnet) statt. Dabei handelt es sich um eine schwefelfreie Pterin-Komponente (Mendel und Bittner, 2006). Da es im Gegensatz zu den anderen Zwischenprodukten eine Halbwertszeit von mehreren Stunden besitzt, war es möglich die Struktur mit Hilfe von NMR-Spektroskopie aufzuklären. Bei dieser Cyclisierung werden alle Kohlenstoffatome der Ribose und des Guanin in das cPMP eingebaut, wobei am C1 ein geminales Diol entsteht (Wuebbens und Rajagopalan, 1995).

Da alle weiteren Schritte der Molybdäncofaktor-Biosynthese allerdings im Cytosol stattfinden, ist ein Transport des cPMP von den Mitochondrien ins Cytosol notwendig. Kürzlich wurde dafür in der inneren Membran pflanzlicher Mitochondrien ein Transportprotein gefunden, welches zur Familie der ABC-(ATP-binding cassette) Transporter gehört (Teschner *et al.*, 2010).

Im zweiten Schritt findet der Einbau der Dithiolen-Funktion ins cPMP statt, wodurch das molybdänfreie MPT (Molybdopterin) entsteht (Mendel und Bittner, 2006). Diese Reaktion wird durch das Enzym MPT-Synthase katalysiert. Um eine Molybdäncofaktor- und MPT-freie Variante der Molybdoenzym zur biochemischen Charakterisierung rekombinant hergestellter Molybdoenzyme zu exprimieren wird der *E. coli*-Stamm RK5204 verwendet, da dieser Schritt dort ausgeschaltet ist.

Im dritten und vierten Schritt findet der Einbau des Molybdäns an die Dithiolen-Funktion des MPT statt. Dies geschieht nicht spontan, sondern muss durch eine Molybdän-Insertase katalysiert werden (Mendel und Kruse, 2012).

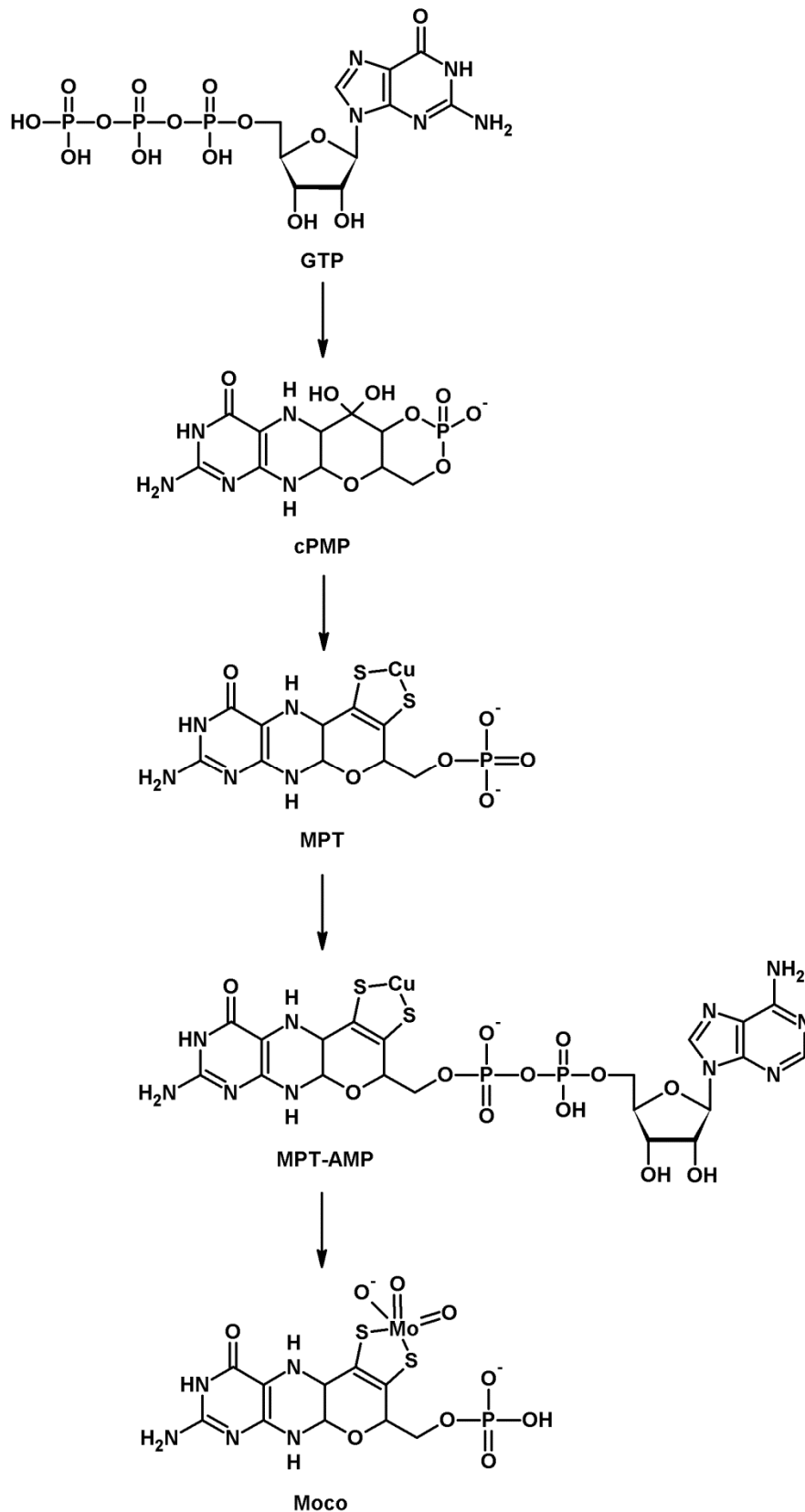


Abb. 1.1.1 Biosynthese des eukaryotischen Molybdäncofaktors (nach Mendel und Kruse, 2012)

(GTP = Guanosintriphosphat, cPMP = cyclic pyranopterin monophosphate, MPT = Molybdopterin, MPT-AMP = adenyliertes-MPT, Moco = Molybdäncofaktor)

Während in Bakterien zwei separate Proteine am Molybdäeinbau beteiligt sind, sind diese bei höheren Organismen zu einem Zwei-Domänen-Protein (Gephyrin) fusioniert. Die G-Domäne führt Mg^{2+} - und ATP-abhängig zur Adenylierung des MPT, wodurch das MPT-AMP als ein neues Zwischenprodukt entsteht (Kuper *et al.*, 2004). Dieses wird dann auf die E-Domäne übertragen, welche dann den Mg^{2+} -abhängigen Einbau des Metalls in die Dithiolen-Gruppe katalysiert (Mendel und Kruse, 2012). Dabei wird das Kupfer, welches direkt nach der Dithiolen-Bildung als Zwischenligand zum Schutz vor Oxidationen ins MPT eingebaut wurde, freigesetzt. Dadurch kann der Einbau von Molybdän als eine Metall-Austausch-Reaktion an der Dithiolen-Gruppe des MPT betrachtet werden (Kuper *et al.*, 2004).

Während mit dem Einbau des Molybdäns in das MPT die in Eukaryoten aktive Monophosphat-Form des Molybdäncofaktors vorliegt, wird der Molybdäncofaktor bei den meisten Bakterien durch das Anhängen eines Mononucleotids an die terminale Phosphatgruppe des MPT in einem fünften Biosyntheseschritt zu Molybdopterin-Dinucleotiden modifiziert (Stevenson *et al.*, 2000).

Durch diese Modifikation entsteht zum einen die Molybdopterin-Cytosin-Dinucleotid-Form, die in der Molybdän-Hydroxylase-Familie (Xanthinoxidase-Familie) vieler Bakterien anzutreffen ist, und zum anderen die Molybdopterin-Guanin-Dinucleotid-Form (MGD). Diese bildet als bis-MGD, bei dem zwei MGD ein Molybdän-Atom in antiparalleler Ausrichtung binden, die nur in Prokaryoten vorkommende Dimethylsulfoxid (DMSO)-Familie (Stevenson *et al.*, 2000).

Dieser fünfte Schritt der Biosynthese des prokaryotischen Molybdäncofaktors ist in dem *E. coli*-Stamm TP1000 ausgeschaltet. Da sich in diesem Stamm die eukaryotische Monophosphat-Form des Molybdäncofaktors anreichert, eignet er sich dazu eukaryotische Molybdoenzyme rekombinant herzustellen (Palmer *et al.*, 1996).

Da der Molybdäncofaktor extrem oxidationsempfindlich ist, wird vermutet, dass dieser nicht frei in der Zelle vorliegt (Rajagopalan und Johnson, 1992). Man geht

davon aus, dass die Bindung und Lagerung des Cofaktors sowie der Transfer zu den entsprechenden Target-Enzymen dabei durch sogenannte Moco-binding Proteine (MoBP) stattfindet (Mendel und Kruse, 2012).

Das erste MoBP, das in Eukaryoten gefunden wurde, war das Moco-carrier Protein (MCP) in *Chlamydomonas reinhardtii* (Aguilar *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass MCP reversibel den Molybdäncofaktor bindet und damit vor Degradierung schützt.

Durch Homologie-Untersuchungen wurden in *Arabidopsis thaliana* acht Proteine identifiziert, die zur Familie der MCP-Proteine gehören (Kruse *et al.*, 2010). Da der Molybdäncofaktor allerdings nur mit einer geringen Affinität gebunden wird und eine Protein-Protein Interaktion zwischen dem Moco-Donor (Cnx1) und dem Moco-User (Nitratreduktase) gezeigt werden konnte, stellen diese Proteine keine guten Lagerproteine dar, sondern sind wahrscheinlich an der Verteilung des Molybdäncofaktors beteiligt.

Wie der Einbau des Molybdäncofaktors ins Apoprotein bei Eukaryoten stattfindet, ist noch nicht vollständig geklärt. Da dieser tief im Holoenzym verborgen liegt, muss der Einbau vor oder während der Faltung und Dimerisierung der Apoproteine stattfinden. In Bakterien konnten dafür enzymespezifische Chaperone identifiziert werden, was allerdings in Eukaryoten noch nicht bestätigt werden konnte. Da in höheren Organismen zwei verschiedene Klassen an Molybdoenzymen existieren, sind auch verschiedene Einbauwege des Molybdäncofaktors denkbar (Mendel und Kruse, 2012).

Ein Defekt in der Molybdäncofaktor-Biosynthese führt zu einem Verlust aller Molybdoenzyme. In Pflanzen kommt es dadurch aufgrund des Fehlens der Aldehydoxidase zu einer verminderten Synthese der Phytohormone Abscisinsäure und Indoleessigsäure. Dies resultiert bei der Pflanze in einem verminderten Wachstum und kleinen chlorophyllarmen Blättern (Schwarz und Mendel, 2006).

Bei Menschen ist ein Molybdäncofaktor-Mangel erblich bedingt (1:100 000) und führt in der Regel zum Tod (Mendel und Kruse, 2012). Die klinischen Symptome werden dabei hauptsächlich dem Fehlen der Sulfitoxidase zugeschrieben. Die Sulfitoxidase schützt besonders das Gehirn vor erhöhten Konzentrationen an toxischem Sulfit, welches beim Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren und Sulfolipiden entsteht. Inwieweit inaktives mARC von Bedeutung ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Die meisten Patienten weisen einen Defekt im ersten Schritt der Molybdäncofaktor-Synthese auf, also der Umwandlung von GTP in cPMP (Reiss, 2000). Durch die regelmäßige intravenöse Gabe von cPMP, das aus *E. coli* gereinigt wird, kann der Molybdäncofaktor-Mangel dieser Patienten erfolgreich behandelt werden (Veldman *et al.*, 2010).

1.1.2. Terminale Sulfurierung des Molybdäncofaktors

Die Molybdoenzyme können je nach Struktur des Molybdäncofaktors in drei Subfamilien eingeteilt werden.

Die Dimethylsulfoxid-Reduktase-Familie (DMSO-Familie) ist dabei ausschließlich in Prokaryoten zu finden und weist ein bis-MPT-Guanin-Dinucleotid (Mo-bis-MGD) als Cofaktor auf (Schwarz *et al.*, 2009).

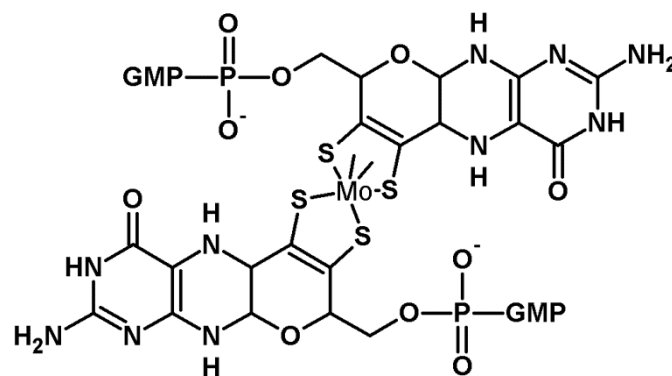


Abb. 1.1.2 Struktur des prokaryotischen Molybdäncofaktors der DMSO-Familie (nach Schwarz *et al.*, 2009)

Die Sulfitoxidase- und Xanthinoxidase-Familien sind dagegen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten anzutreffen (Schwarz *et al.*, 2009).

Bei der Sulfitoxidase-Familie, zu der die Sulfitoxidase und die Nitratreduktase gehören, handelt es sich um „Dioxo-Molybdoenzyme“, bei denen der Molybdän-cofaktor neben einem proteineigenen Cysteinschwefel durch zwei Sauerstoffatome komplexiert wird. Hier wird der Molybdäncofaktor direkt in das Apoenzym eingebaut, wodurch dieses dann aktiv vorliegt (Mendel und Bittner, 2006).

Bei der Xanthinoxidase-Familie, zu der die Xanthinoxidase und die Aldehydoxidase gehören, handelt es sich um „Monooxo-Molybdoenzyme“, die ein spezifisches Schwefelatom besitzen. Dieser Schwefel kann durch Cyanidbehandlung in Form von Thiocyanat aus dem Enzym freigesetzt werden, wodurch es seine Aktivität verliert (Massey und Edmondson, 1970). Diese durch Cyanid inaktivierte Form der Xanthinoxidase-Familie kann *in vitro* durch Zugabe von Sulfid unter reduzierenden Bedingungen wieder aktiviert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem cyanolisierbaren Schwefel um einen Liganden des Molybdäns im Molybdäncofaktor handelt (Malthouse und Bray, 1980; Wahl und Rajagopalan, 1982). Daher muss zur Aktivierung des Molybdäncofaktors bei dieser Familie vor dem Einbau in das Apoenzym eine terminale Sulfurierung des Molybdäncofaktors stattfinden.

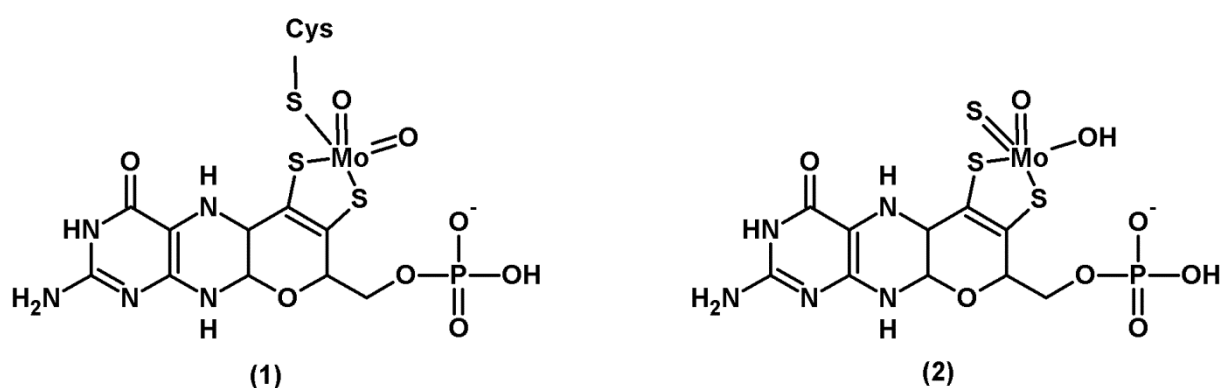


Abb. 1.1.3 Struktur des Molybdäncofaktors der Sulfitoxidase-Familie (1) und der Xanthinoxidase-Familie (2) (nach Schwarz *et al.*, 2009)

Dieser Aktivierungsschritt wird durch eine sogenannte Moco-Sulfurase katalysiert. Als das für die Sulfurierung des Molybdäncofaktors verantwortliche Enzym konnte in *Arabidopsis thaliana* ABA3 identifiziert werden. Dies weist eine hohe Homologie zur humanen Moco-Sulfurase (HMCS) auf. Allerdings sind bisher nur detaillierte Informationen für das pflanzliche Enzym bekannt geworden.

Bei der Moco-Sulfurase ABA3 handelt es sich um ein Monomer, welches in zwei Domänen unterteilt werden kann (Bittner *et al.*, 2001). Die N-terminale Domäne weist dabei signifikante Ähnlichkeiten zu den bakteriellen Cystein-Desulfurasen, wie NifS auf. Diese Domäne besitzt einen für die Cystein-Desulfurasen typischen Pyridoxal-phosphat-Cofaktor und einen konservierten Cysteinrest, der den bei der Spaltung von L-Cystein in L-Alanin freigewordenen Schwefel in Form eines Persulfids bindet (Heidenreich *et al.*, 2005).

Die C-terminale Domäne kann den Molybdäncofaktor sowohl in der schwefelfreien als auch in der sulfurierten Form binden und gehört zur neuen MOSC-Domänen-Superfamilie (Molybdenum cofaktor sulfurase C-terminal). Diese neue Superfamilie zeichnet sich durch das Vorhandensein des Molybdäncofaktors und eines hoch konservierten Cysteinschwefels aus (Anantharaman und Aravind, 2002). Während die physiologische Funktion des namensgebenden Mitglieds in der Aktivierung der Molybdoenzyme der Xanthinoxidase-Familie besteht, ist die physiologische Rolle aller weiteren MOSC-Proteine bisher unklar. Allerdings konnte in *in vitro* Biotransformationsstudien eine Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen durch die eukaryotischen MOSC-Proteine (mARC und C-terminale Domäne der HMCS) gezeigt werden und durch knock-out-Versuche wurde eine Beteiligung der prokaryotischen MOSC-Proteine (YcbX und YiiM) an der Detoxifizierung N-hydroxylierter Basenanaloga vermutet (Havemeyer *et al.*, 2006; Kozmin *et al.*, 2008).

Die C-terminale Domäne der Molybdäncofaktorsulfurase stellt einen Akzeptor für den von der N-terminalen Domäne übertragenen Schwefel dar. Dazu wird der Schwefel, der zunächst erneut als Persulfid auf den C-Terminus übertragen wird, in die gebundene Desulfo-Form des Molybdäncofaktors eingebaut (Wollers *et al.*, 2008).

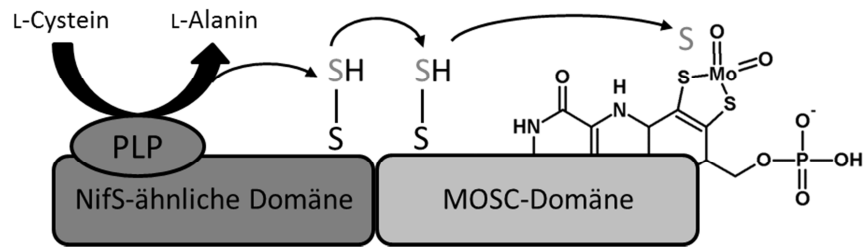


Abb. 1.1.4 Domänenanordnung der Molybdäncofaktorsulfurase (angelehnt an Anantharaman und Aravind, 2002)

(PLP = Pyridoxalphosphat)

Auf welche Weise dann die Aktivierung der Targetenzyme Xanthinoxidoreduktase und Aldehydoxidase stattfindet, ist allerdings noch nicht geklärt. Es werden zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Zum einen könnte die C-terminale Domäne nur als ein Gerüst für die Anordnung des Molybdän-Schwefels fungieren von dem der Schwefel wieder freigesetzt und auf die Desulfo-Form der Xanthinoxidoreduktase oder Aldehydoxidase übertragen wird. Der am ABA3 gebundene Molybdäncofaktor würde dann wieder in der Desulfo-Form vorliegen und einen neuen Schwefel übertragen bekommen. Im zweiten Fall könnte eine Austauschreaktion zwischen dem Desulfo-Molybdäncofaktor der Xanthinoxidoreduktase bzw. der Aldehydoxidase und der sulfurierten Form des Molybdäncofaktors der C-terminalen Domäne stattfinden (Mendel und Bittner, 2006).

Die physiologische Bedeutung der Aktivierung der Mitglieder der Xanthinoxidase-Familie durch die terminale Sulfurierung des Molybdäncofaktors könnte in einer schnellen Regulierung der aktiven Menge an Xanthinoxidoreduktase und Aldehydoxidase liegen. Da beide Enzyme an der Bildung physiologisch aktiver Substanzen wie Hormonen und reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind, kann die Konzentration an diesen Substanzen durch das Verhältnis von aktiver und inaktiver Xanthinoxidoreduktase und Aldehydoxidase gesteuert werden (Mendel und Kruse, 2012).

1.1.3. Molybdoenzyme

Sulfitoxidase

Die Sulfitoxidase ist das namensgebende Mitglied der Sulfitoxidase-Familie und katalysiert den Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren und damit die Detoxifizierung von Sulfit zu Sulfat (Kisker *et al.*, 1997b). Ein Sulfitoxidase-Mangel führt zu neurologischen Störungen, Krampfanfällen und schließlich zum Tod. Ursache dafür kann entweder ein isolierter Enzymdefekt oder ein Molybdäncofaktor-Mangel sein, wobei es besonders im Gehirn zur Anreicherung von toxischem Sulfit kommt (Reiss und Hahnewald, 2011).

Die Sulfitoxidase ist ein Homodimer, welches in den meisten Eukaryoten zu finden ist. Allerdings weisen die tierische und die pflanzliche Form unterschiedliche Lokalisationen und Domänstrukturen auf. Während das tierische Enzym im Membranzwischenraum der Mitochondrien lokalisiert ist und aus einer N-terminalen Häm-bindenden/Cytochrom b_5 -Domäne und einer C-terminalen Moco-bindenden Domäne sowie der Dimerisierungsdomäne besteht, ist das pflanzliche Enzym in den Peroxisomen lokalisiert und besitzt als einzige prosthetische Gruppe den Molybdäncofaktor (Hille *et al.*, 2011; Eilers *et al.*, 2001).

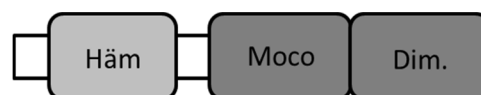


Abb. 1.1.5 Domänenanordnung der tierischen Sulfitoxidase (Mendel und Bittner, 2006)

Häm = Häm-bindende Domäne; Moco = Molybdäncofaktor-bindende Domäne; Dim. = Dimerisierungsdomäne

Nitratreduktase

Die Nitratreduktase gehört zur Sulfitoxidase-Familie und katalysiert in autotrophen Organismen wie Pflanzen, Algen und Pilzen den ersten und limitierenden Schritt der Nitrat-Assimilation, die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Damit trägt die Nitratreduktase dazu bei, reduzierten, metabolisierbaren Stickstoff in Form von Ammonium für die Synthese organischer Substanzen bereitzustellen (Mendel, 2011). Außerdem

katalysiert die Nitratreduktase die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid (NO) (Yamasaki und Sakihama, 2000).

Das im Cytosol lokalisierte Enzym ist ein Homodimer, dessen Untereinheiten aus drei Domänen mit jeweils unterschiedlichen, kovalent gebundenen Cofaktoren bestehen, einer N-terminalen Moco-bindenden Domäne, die auch die Dimerisierungsdomäne besitzt, einer Häm-bindenden/Cytochrom b_5 -Domäne und einer C-terminalen FAD-bindenden Domäne. Die einzelnen Domänen sind durch Linker-sogenannte Hinge-Regionen voneinander getrennt. Die zur Reduktion benötigten Elektronen, als Elektronendonator dient hierbei NADH oder auch NADPH, werden vom FAD aufgenommen und über das Häm auf den Molybdopterin-Komplex weitergegeben. Dort werden sie dann auf Nitrat übertragen (Campbell, 1999).

Die Aktivität der Nitratreduktase wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Dabei wird ein Serinrest im Hinge-Bereich zwischen Häm- und Molybdän-Untereinheit phosphoryliert. Dies tritt zum Beispiel bei Verdunkelung oder Mangel an Nährstoff auf. Dieser phosphorylierte Serinrest ist in der Lage Mg^{2+} -abhängig ein regulatorisches 14-3-3-Protein zu binden. Der Komplex aus Nitratreduktase, Mg^{2+} und 14-3-3-Protein zeigt keine Aktivität (Kaiser und Huber, 2001).

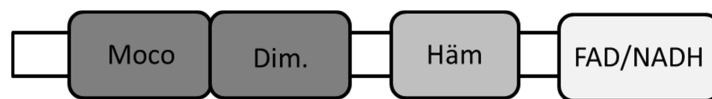


Abb. 1.1.6 Domänenanordnung der Nitratreduktase (Mendel und Bittner, 2006)

Moco = Molybdäncofaktor-bindende Domäne; Dim. = Dimerisierungsdomäne; Häm = Häm-bindende Domäne; FAD/NADH = FAD-bindende Domäne

Xanthinoxidoreduktase

Die Mitglieder der Xanthinoxidase-Familie besitzen ein breites Substratspektrum und sind an der Hydroxylierung einer Vielzahl von Aldehyden und aromatischen Heterocyclen beteiligt (Mendel und Bittner, 2006).

Die Xanthinoxidoreduktase ist das namensgebende Mitglied der Xanthinoxidase-Familie und stellt ein Schlüsselenzym im Purinmetabolismus dar (Hille und Nishino, 1995). Es oxidiert Hypoxanthin zu Xanthin und dieses wiederum zu Harnsäure. Ein Mangel dieses Enzyms führt zu einer erhöhten Ausscheidung von Hypoxanthin und Xanthin (Xanthinurie) und erniedrigten Harnsäurespiegeln (Hypourikämie) (Nyhan, 2005).

Die Xanthinoxidoreduktase ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 145 kDa pro Monomer und besteht aus drei Domänen. Die N-terminale Domäne bindet zwei [2Fe-2S]-Cluster, die C-terminale den Molybdäncofaktor und weist eine Dimerisierungsdomäne auf. Dazwischen befindet sich noch eine FAD-bindende Domäne. Die Xanthinoxidoreduktase kann in zwei verschiedenen Formen vorliegen, die allerdings Produkte desselben Gens darstellen. Während die Dehydrogenase-Form die Elektronen auf NAD⁺ und Sauerstoff übertragen kann, nutzt die Oxidase-Form nur Sauerstoff als Elektronenüberträger. Die Oxidase-Form entsteht dabei durch reversible oxidative Umwandlung oder durch irreversible proteolytische Spaltung der Dehydrogenase-Form (Hille und Nishino, 1995). Die subzelluläre Lokalisation ist noch nicht vollständig geklärt. Während die einen eine cytosolische Lokalisation zeigen konnten, postulieren andere ein Vorkommen in den Peroxisomen (Jarasch *et al.*, 1981; Sandalio *et al.*, 1988).

Neben der Beteiligung im Purinmetabolismus ist die Xanthinoxidoreduktase am Stickstoff-Metabolismus verschiedener Xenobiotika beteiligt (Beedham, 1997). Unter anderem ist die Xanthinoxidase an der Oxidation des Zytostatikums 6-Mercaptopurin über das 6-Thioxanthin zur 6-Thioharnsäure beteiligt (Rashidi *et al.*,

2007). Außerdem ist die Xanthinoxidoreduktase an der Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter Verbindungen beteiligt. Dabei konnte sowohl die Reduktion des *N*-hydroxylierten Guanidins Guanoxabenz zu Guanabenz als auch die Reduktion der *N*-hydroxylierten Nucleobase *N*-Hydroxyadenin zum Adenin unter aeroben Bedingungen mit den Elektronendonatoren Xanthin und NADH gezeigt werden (Dambrova *et al.*, 1998; Clement und Kunze, 1992).



Abb. 1.1.7 Domänenanordnung der Xanthinoxidoreduktase (Mendel und Bittner, 2006)

Fe-S = [Fe-S]-Cluster; *FAD* = FAD-bindende Domäne; *Moco* = Molybdäncofaktor-bindende Domäne; *Dim.* = Dimerisierungsdomäne

Aldehydoxidase

Die Aldehydoxidase gehört zur Xanthinoxidase-Familie und katalysiert sowohl die Hydroxylierung von Heterocyclen als auch die Oxidation von Aldehyden zu den entsprechenden Carbonsäuren (Garattini *et al.*, 2008).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie des cytosolischen Enzyms zur Xanthinoxidoreduktase wird davon ausgegangen, dass die Aldehydoxidase durch Genverdopplung aus der Xanthinoxidoreduktase entstanden ist (Rodriguez-Trelles *et al.*, 2003). Daher weist die Aldehydoxidase auch die gleichen prosthetischen Gruppen wie die Xanthinoxidoreduktase auf (zwei [2Fe-2S]-Cluster, FAD und Moco) und liegt als Homodimer vor (Mendel und Bittner, 2006).

Während im Menschen nur ein Gen existiert, besitzen andere Säugetiere bis zu vier Aldehydoxidase-Gene. In Pflanzen ist die Aldehydoxidase an der Biosynthese des Phytohormons Abscisinsäure beteiligt, welches eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Stressadaptation der Pflanzen spielt (Mendel und Bittner, 2006). Über die

physiologische Funktion im Menschen und anderen Säugetieren ist bisher nur wenig bekannt. Es wird vermutet, dass die Aldehydoxidase am Metabolismus von Neurotransmittern und der Bildung von Retinsäure, eines aktiven Metaboliten von Vitamin A, beteiligt ist (Garattini *et al.*, 2008). Daneben ist die Aldehydoxidase an zahlreichen fremdstoffmetabolisierenden Reaktionen beteiligt (Kitamura *et al.*, 2006). Allerdings ist die *in vivo* Relevanz fraglich, da die meisten durch die Aldehydoxidase katalysierten Reaktionen wie z.B. die Reduktion von Oximen und Amidoximen sowie von N-Oxiden und Nitroverbindungen nur unter anaeroben Bedingungen stattfinden (Tatsumi und Ishigai, 1987; Kitamura *et al.*, 2006).

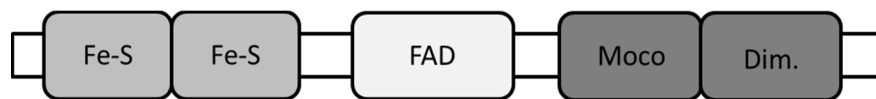


Abb. 1.1.8 Domänenanordnung der Aldehydoxidase (Mendel und Bittner, 2006)

Fe-S = [Fe-S]-Cluster; *FAD* = FAD-bindende Domäne; *Moco* = Molybdäncofaktor-bindende Domäne; *Dim.* = Dimerisierungsdomäne

mARC

Als das vierte im Menschen vorkommende Molybdoenzym wurde vor kurzem die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006). Als erstes wurde das Enzym in der äußeren mitochondrialen Membran der Schweineleber gefunden. Bisher konnten in allen untersuchten Eukaryoten zwei mARC-Enzyme nachgewiesen werden, die als mARC1 und mARC2 bezeichnet werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zum C-Terminus der Moco-Sulfurasen werden die mARC-Proteine in die neue Domänen-Superfamilie der MOSC-Proteine (Moco sulfurase C-terminal domain) eingeordnet (Anantharaman und Aravind, 2002).

mARC liegt vermutlich als einziges eukaryotisches Molybdoenzym als Monomer vor und bindet den Molybdäncofaktor als einzige prosthetische Gruppe. Allerdings sind die mARC-Enzyme nicht alleine aktiv, sondern nur zusammen mit ihren Elektronen-

transportproteinen Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase. Damit entspricht das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem dem Aufbau der nur in autotrophen Organismen vorkommenden Nitratreduktase (Havemeyer *et al.*, 2011)

Die physiologische Funktion der mARC-Proteine ist noch unklar. Es wird sowohl eine Beteiligung am Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel als auch an der Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basenanaloga postuliert (Kotthaus *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2010). Allerdings konnte gezeigt werden, dass das mARC-abhängige Dreikomponenten-Enzymsystem an der Aktivierung zahlreicher Prodrugs beteiligt ist. Dabei werden nicht nur verschiedene *N*-hydroxylierte Gruppen wie Amidoxime, *N*-hydroxylierte Guanidine und Sulfhydroxamsäuren sondern in neueren Studien auch Oxime, Hydroxamsäuren und *N*-Oxide in *in vitro* Biotransformationsstudien reduziert (Grünewald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010; Froriep, Dissertation in Vorbereitung).



Abb. 1.1.9 Domänenstruktur des mARC-Proteins und prosthetische Gruppen seiner Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase (angelehnt an Mendel und Kruse, 2012)

mARC = Moco-bindende Domäne; Cytochrom b_5 = Häm-bindende Domäne; Cytochrom b_5 Reduktase = FAD-bindende Domäne

1.2. THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das von Havemeyer und Mitarbeitern (2006) kürzlich entdeckte vierte Molybdoenzym im Menschen mARC (mitochondrial Amidoxime Reducing Component) ist zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b₅ und NADH Cytochrom b₅ Reduktase an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen beteiligt. Dabei wird nicht nur das Modellsubstrat Benzamidoxim, sondern auch *N*-hydroxylierte Guanidine und Sulhydroxamsäuren reduziert (Grünewald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010). Allerdings ist die physiologische Funktion des Dreikomponenten-Enzymsystems noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit sollen zum einen weitere funktionelle Gruppen als potentielle Angriffspunkte für das mARC-abhängige Dreikomponenten-Enzymsystem untersucht werden. Dazu soll zum ersten Mal an einem Modellsubstrat ein aliphatisches Amidoxim untersucht werden.

Daneben wurde kürzlich von Kozmin *et al.* (2008) die Reduktion von *N*-hydroxylierten Basenanaloga in *E. coli* durch das mARC-Homolog YcbX und das YiiM-Protein beschrieben. Diese beiden neuen prokaryotischen Proteine wurden per Datenbankanalyse, ebenso wie die mARC-Enzyme der Domänen-Superfamilie der MOSC-Proteine zugeordnet (Anantharaman und Aravind, 2002).

In dieser Arbeit stehen die prokaryotischen Proteine YcbX und YiiM sowie deren jeweiligen Redoxpartner zum ersten Mal rekombinant zur Verfügung. Diese prokaryotischen Enzymquellen sollen hinsichtlich ihrer prosthetischen Gruppen sowie in *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim charakterisiert werden. Dabei können auch verschiedene Varianten der prokaryotischen Proteine YcbX und YiiM sowie der eukaryotischen mARC-Proteine getestet werden, um einen Hinweis auf die Familienzugehörigkeit des Molybdäncofaktors der neuen Molybdoenzyme zu erhalten. Außerdem sollen die neuen prokaryotischen Redoxproteine als alternative Elektronenüberträger für das mARC-haltige Enzymsystem

verwendet werden, um zu testen, ob auch andere prosthetische Gruppen als Elektronenüberträger für das eukaryotische mARC-Protein in Frage kommen.

Um einen Hinweis auf eine mögliche physiologische Funktion des mARC-haltigen Dreikomponenten-Enzymsystems zu erhalten, soll in dieser Arbeit sowohl die Detoxifizierung der *N*-hydroxylierten Nucleobasen *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin als auch der *N*-hydroxylierten Nucleoside *N*-Hydroxycytidin und *N*-Hydroxyadenosin untersucht werden.

Um festzustellen, auf welcher Stufe des Purinmetabolismus eine mögliche Detoxifizierung durch das mARC-haltige Enzymsystem stattfindet, sollen die Reduktionsstudien um Nucleotide erweitert werden.

2. REDUKTION VON ALIPHATISCHEN AMIDOXIMEN DURCH DAS OPTIMIERTE EUKARYOTISCHE mARC ENZYMSYSTEM

2.1. EINLEITUNG

2.1.1. Prodrugprinzip „Amidoxime statt Amidine“

Als Prodrug wird ein inaktiver pharmakologischer Stoff bezeichnet, der erst durch Verstoffwechslung (Metabolisierung) im Organismus in einen aktiven Wirkstoff überführt wird. Prodrugs dienen der Verbesserung der Pharmakokinetik oder -dynamik von Arzneistoffen (Testa und Mayer, 1998; Etmayer *et al.*, 2004).

Besonders Amidinfunktionen sind in vielen Arzneistoffen und Arzneistoffkandidaten vertreten, da sie in ihrer protonierten Form mit den negativen Carboxylgruppen der Zielstrukturen wechselwirken. Allerdings liegen Amidine mit einem pK_a -Wert von 13-14 unter physiologischen Verhältnissen fast vollständig geladen vor, was eine schlechte orale Bioverfügbarkeit zur Folge hat und damit eine intravenöse Gabe des entsprechenden Arzneistoffs erforderlich macht. Die Einführung einer Hydroxylgruppe und damit die Überführung des Amidins in ein Amidoxim setzt die Basizität der Verbindung jedoch signifikant herab, so dass eine orale Gabe des Arzneistoffs möglich ist, da das Amidoxim durch Diffusion aufgenommen wird.

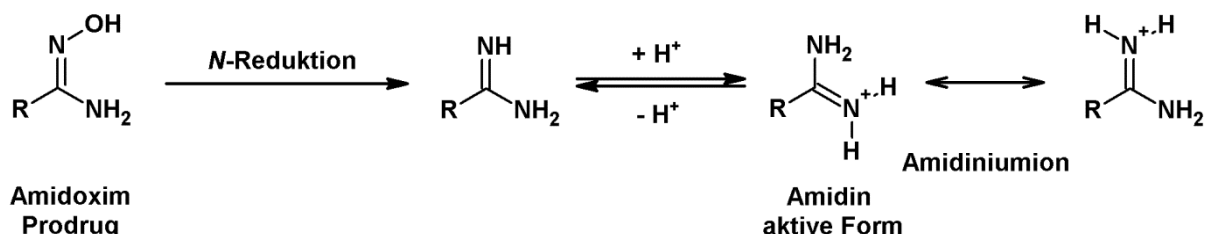


Abb. 2.1.1 Prodrugprinzip „Amidoxime statt Amidine“

Dieses Prinzip wurde zuerst von Clement und Raether (1985) für den trypanoziden und leishmaniziden Wirkstoff Pentamidin entwickelt und ist inzwischen auf zahlreiche andere Benzamidinarzneistoffe und -arzneistoffkandidaten aber auch auf ein Alkylamidin übertragen worden (Hauptmann, 2002; Peterlin-Masic *et al.*, 2006; Degardin *et al.*, 2009).

Die Untersuchung des aktivierenden *N*-reduktiven Mechanismus von *N*-hydroxylierten Prodrugs ist dabei von großer Bedeutung zur Beurteilung der Pharmakokinetik sowie der genetischen Variabilität und eventuell daraus resultierender Arzneimittelinteraktionen.

2.1.2. mARC-haltiges Dreikomponenten-Enzymsystem

Während die Oxidation von stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen sehr gut untersucht ist, konnte die Reduktion dieser Gruppen meist nur *in vitro* und unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden.

Die ersten Studien zur sauerstoff-unempfindlichen *N*-Reduktion beschrieben eine Reduktion von Hydroxylamin in subzellulären Fraktionen (Bernheim und Hochstein, 1968; Kadlubar *et al.*, 1973). Diese in Mitochondrien membrangebundene Reduktase wurde als NADH-abhängiges und nicht durch Kohlenmonoxid hemmbares Enzym beschrieben (Bernheim, 1969), wohingegen Kadlubar und Ziegler (1974) eine Hydroxylamin-Reduktase in Mikrosomen als ein Multi-Komponenten-Enzymsystem beschrieben. Dieses Enzymsystem besteht aus dem Häm-haltigen Cytochrom b_5 , dessen FAD-haltiger Reduktase und einem bis dahin unbekanntem dritten Enzym.

Die Beteiligung von Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase an der Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter Verbindungen konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden (Saulter *et al.*, 2005; Andersson *et al.* 2005; Clement *et al.*, 1997; Clement und Lopian, 2003), allerdings konnte das beteiligte dritte Enzym nicht gefunden werden. Während andere Autoren (Kurian *et al.*, 2004, 2006) von einer Reduktion durch Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase alleine ohne die

Beteiligung einer dritten Komponente ausgingen, postulierten andere (Clement *et al.*, 1997) die Beteiligung eines mikrosomalen Cytochrom P450 Enzyms, welches in Schweinelebermikrosomen gefunden wurde. Allerdings konnte durch Rekonstitution mit rekombinanten Enzymen oder durch Inhibitorstudien kein beteiligtes humanes Cytochrom P450 Enzym gefunden werden (Clement und Lopian, 2003, Anderson *et al.*, 2005).

Interessanterweise konnte eine höhere *N*-reduktive Aktivität auch in den Mitochondrien und nicht in den Mikrosomen detektiert werden, was für den Metabolismus für Xenobiotika eher unüblich ist (Clement und Lopian, 2003, Clement *et al.*, 2005).

Durch Aufreinigung aus der äußeren mitochondrialen Membran und anschließender ESI-MS-Analyse wurde die dritte mitochondriale Komponente als ein neues molybdänhaltiges Enzym entdeckt, welches zusammen mit Cytochrom b_5 und dessen Reduktase in der Lage ist, das Modellsubstrat Benzamidoxim zu reduzieren (Havemeyer *et al.*, 2006). Die Datenbank bezeichnete das Protein als ein putatives Enzym mit einer sogenannten MOSC-Domäne. MOSC bedeutet „Moco sulfurase C-terminal domain“. Aufgrund der Fähigkeit zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen und der Lokalisation in Mitochondrien wurde das neue Protein „mitochondrial Amidoxime Reducing Component“ (mARC) genannt, zumal es über keine sulfurierende Fähigkeit verfügt.

In allen bisher untersuchten Organismen wurden zwei mARC Proteine gefunden, die als mARC1 und mARC2 bezeichnet werden. Bisher konnte die Beteiligung beider mARC-Proteine an der Reduktion zahlreicher *N*-hydroxylierter Verbindungen gezeigt werden, z.B. von *N*-hydroxylierten Amidinen und Guanidinen (Grünwald *et al.*, 2008) und Sulfhydroxamsäuren (Havemeyer *et al.*, 2010). Dabei konnten die höchsten Umsetzungsraten nur im Dreikomponenten-Enzymsystem, bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase erzielt werden.

NADH Cytochrom b_5 Reduktase ist ein Flavoenzym, welches ein FAD als Cofaktor besitzt, und die Elektronen vom Zwei-Elektronen-Donator NADH zum Häm des Ein-Elektronen-Akzeptors Cytochrom b_5 überträgt (Kimura *et al.*, 2003). Es handelt sich um ein amphiphiles Protein mit einer *N*-terminalen hydrophoben Domäne, die als Membrananker fungiert und einer hydrophilen *C*-terminalen Domäne. Diese ist cytosolisch orientiert, katalytisch aktiv und besteht aus 2 Untereinheiten, einer FAD und einer NADH-bindenden Domäne (Borgese *et al.*, 1993). Es existieren verschiedene Isoformen, die allerdings alle von demselben Gen abstammen und nur durch alternative Transkription oder alternatives Splicing entstehen (Borgese *et al.*, 1993). Die Isoform 1 stellt die membrangebundene Form in Mikrosomen und Mitochondrien, die Isoform 2 die lösliche Form, bei der der *N*-terminale Membrananker fehlt, dar. Diese ist zusammen mit Cytochrom b_5 in den Erythrozyten für die Methämoglobin-Reduktion verantwortlich.

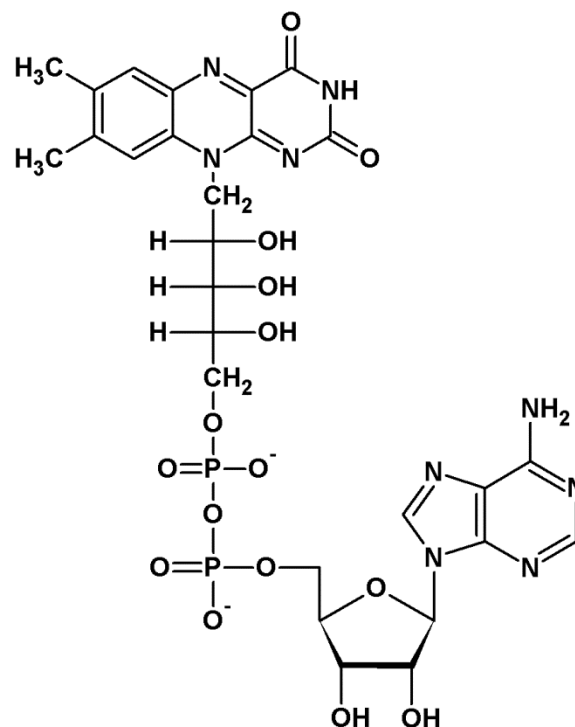


Abb. 2.1.2 Cofaktor FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) der NADH Cytochrom b_5 Reduktase

Das Cytochrom b_5 nimmt ein einzelnes Elektron auf und überträgt es auf einen Akzeptor. Es handelt sich dabei ebenfalls um ein amphiphiles Protein, allerdings mit einer *N*-terminalen hydrophilen Domäne. Diese ist cytosolisch orientiert, trägt das Häm-Molekül nicht kovalent über 2 Histidine gebunden und ist damit die katalytisch aktive Domäne (Ozols, 1989). Die membrangebundenen Isoformen werden von separaten Genen codiert. Der Typ A ist im endoplasmatischen Retikulum verankert. Durch alternatives Splicing entsteht die lösliche Form der Erythrozyten. Der Typ B ist auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert (Borgese *et al.*, 1993). Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass nur die mitochondriale Form im mARC-abhängigen Enzymsystem an der Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen beteiligt ist (Neve *et al.*, 2012; Plitzko, Dissertation in Vorbereitung).

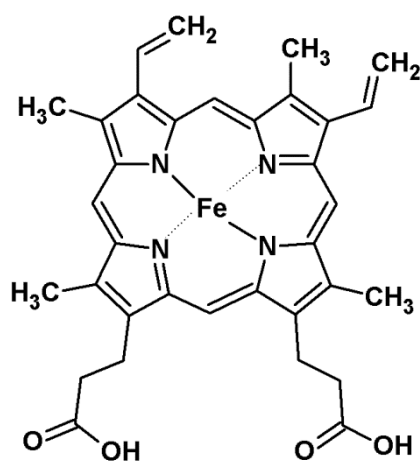


Abb. 2.1.3 Häm-Cofaktor des Cytochrom b_5

2.1.3. Thema und Zielsetzung

Die Beteiligung des Dreikomponenten-Enzymsystems, bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase, an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ist inzwischen gut etabliert. Havemeyer *et al.* konnten 2006 als erste das molybdänhaltige Enzym mARC aus der äußeren mitochondrialen Membran reinigen und als dritte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems identifizieren.

Im Folgenden wurden weitere Untersuchungen zur Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter Substrate mit dem gereinigten und erstmalig auch mit dem rekombinant hergestellten Dreikomponenten-Enzymsystem durchgeführt (Grünwald *et al.*, 2008)

Die in dieser Arbeit verwendeten hepatischen Subfraktionen und rekombinant hergestellten Enzymquellen sollten durch geeignete biochemische Methoden und durch *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim charakterisiert werden um die Umsetzungsraten der neuen Substrate auf die Benzamidoxim-Umsetzung beziehen zu können.

Des Weiteren wurde die *N*-reduktive Aktivität an einem Modellsubstrat für ein aliphatisches Amidoxim mit den hepatischen Subfraktionen und den rekombinant hergestellten Enzymquellen in *in vitro* Biotransformationsstudien untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sollten dann mit dem nichtaliphatischen Benzamidoxim verglichen werden.

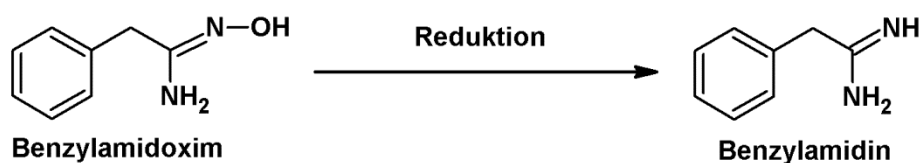


Abb. 2.1.4 Modellsubstrat für ein aliphatisches Amidoxim und postulierter Mechanismus

2.2. METHODEN

2.2.1. Materialien und Geräte

Sofern nicht anders angegeben, befindet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 7 dieser Arbeit.

2.2.2. Enzymquellen

2.2.2.1. Gewinnung porciner Leberenzymquellen

2.2.2.1.1. Isolierung von Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol

Zur Subfraktionierung von porciner Leber wurde diese von einem lokalen Schlachthof (Schlachtereid Neidhard, Holtsee) bezogen und mittels verschiedener Differential- und Dichtegradientenzentrifugationen, die bereits im Arbeitskreis gut etablierte Methoden darstellen, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol gewonnen (Havemeyer *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2005).

2.2.2.1.2. Isolierung der äußeren Membran Vesikel (OMV)

Zur Gewinnung der äußeren Membran Vesikel (OMV) aus porcinen Lebermitochondrien wurde eine Swell-Disruption-Methode mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation modifiziert nach Kroon *et al.* (1999) angewendet (Havemeyer *et al.*, 2006).

2.2.2.1.3. Isolierung von mARC

Die Gewinnung von nativem mARC aus der äußeren mitochondrialen Membran erfolgte nach Solubilisation der in Kapitel 2.2.2.1.2 erhaltenen OMV und anschließender Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose nach der von Havemeyer *et al.* (2006) beschriebenen Methode.

2.2.2.2. Rekombinante Enzymquellen

2.2.2.2.1. mARC

Die rekombinanten humanen und pflanzlichen mARC-Homologe mARC1 und mARC2 wurde im Arbeitskreis Mendel (Technische Universität Braunschweig) hergestellt. Die Klonierung, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte wie bei Wahl (2010) beschrieben. Es wurde der Expressionsvektor pQE80 der Firma Qiagen verwendet und die Proteine mit einem *N*-terminalen His₆-Tag versehen. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm TP1000. Das humane mARC1 (NP_073583) wies eine *N*-terminale Verkürzung um das mitochondriale Targetsignal von 51 Aminosäuren, das humane mARC2 (NP_060368) von 50 Aminosäuren auf.

Für die pflanzlichen mARC Proteine wurden die entsprechenden Gene aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli* exprimiert. Das pflanzliche mARC2 (NP_174376) wies eine *N*-terminale Verkürzung um das mitochondriale Targetsignal von 14 Aminosäuren auf. Dem pflanzlichen mARC1 (NP_199285) fehlt dieses Signal.

2.2.2.2.2. Cytochrom b₅/Cytochrom b₅Reduktase

Das Cytochrom b₅ und die Cytochrom b₅ Reduktase wurden ebenfalls rekombinant im Arbeitskreis Mendel (Technische Universität Braunschweig) hergestellt. Die Klonierung, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte wie bei Wahl (2010) beschrieben. Es wurde der Expressionsvektor pQE80 der Firma Qiagen verwendet und die Proteine mit einem *N*-terminalen His₆-Tag versehen. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm DL41. Es wurden das humane mitochondriale Cytochrom b₅ (NP_085056) und die humane Cytochrom b₅ Reduktase (NP_000389) verwendet.

Um die Löslichkeit der membranständigen Elektronentransportproteine zu erhöhen, wurden diese um ihren hydrophoben Membrananker verkürzt. Dies entsprach bei dem Cytochrom b₅ einer C-terminalen Trunkierung von 27 Aminosäuren und bei der Cytochrom b₅ Reduktase einer *N*-terminalen Trunkierung von 23 Aminosäuren,

wodurch die Sequenz dann der löslichen Isoform 2 (NP_001123291) entspricht. Die pflanzlichen Elektronentransportproteine stammten wie die mARC-Homologen aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Auch hier wurde die Sequenz um den hydrophoben Membrananker verkürzt, um die Löslichkeit der membranständigen Proteine zu erhöhen. Dies entsprach bei dem *A.t.* Cytochrom b_5 (NP_173958) einer C-terminalen Trunkierung von 20 Aminosäuren und bei der *A.t.* Cytochrom b_5 Reduktase (NP_197279) einer N-terminalen Trunkierung von 31 Aminosäuren.

2.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen

2.2.3.1. Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts der Enzymquellen wurde mit der BCA-Methode nach Smith *et al.* (1985) durchgeführt. Dazu wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Um eventuelle Störungen von Begleitsubstanzen in den Puffermedien auszuschließen, wurden diese mitbestimmt und die gemessenen Werte um diese Werte korrigiert. Die Proben wurden bei 562 nm photometrisch vermessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibriergerade mit bekannten Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) verwendet (Smith *et al.*, 1985).

2.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Durchführung der Natrium dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde das diskontinuierliche Verfahren nach Laemmli (1970) verwendet.

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

Trenngelpuffer 4×, pH 8,8

90,9 g Tris-Base

2 g SDS

ad 500 ml *Aqua bidest.*

Sammelgelpuffer 4×, pH 6,8

30,25 g Tris-Base

2 g SDS

ad 500 ml *Aqua bidest.*

Trenngel (12,5%)

4 ml H₂O

3 ml Trenngelpuffer 4×, pH 8,8

5 ml Acrylamid (Rotiphorese®)

10 µl TEMED

80 µl APS-Lösung (10% (w/v))

Sammelgel (4,5%)

2,4 ml H₂O

1 ml Sammelgelpuffer 4×, pH 6,8

0,6 ml Acrylamid (Rotiphorese®)

6 µl TEMED

25 µl APS-Lösung (10% (w/v))

Kathodenpuffer

30,28 g Tris-Base

144,09 g Glycin

10,0 g SDS

ad 1000 ml *Aqua bidest.*

4× SDS-Ladepuffer

0,242 g Tris-Base

800 mg SDS

4,7 ml Glycerin 86%

2 ml β-Mercaptoethanol

2 mg Bromphenolblau

ad 10 ml *Aqua bidest.*

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit *Aqua bidest.* auf einen einheitlichen Proteingehalt verdünnt, drei Teile Proteinlösung mit einem Teil SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde der Molekulargewichtsmarker Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen, Darmstadt) für Coomassie-gefärbte Gele und der Molekulargewichtsmarker PageRuler® Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) für Gele mit anschließendem Westernblot verwendet. Die Visualisierung der Proteine

erfolgte entweder durch anschließende Coomassie-Färbung oder mit Hilfe immunochemischer Verfahren nach Durchführung eines Westernblots.

2.2.3.3. Coomassie-Färbung

Zur Bestimmung der Identität und der Reinheit der rekombinanten Proteine wurde das SDS-Gel nach der Auftrennung der Proteinbanden zur Visualisierung mit Coomassie gefärbt. Dazu wurde eine Färbelösung aus 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v), 10% Eisessig und 25% Isopropanol in *Aqua bidest.* verwendet. Nach 30 Minuten bis einer Stunde wurde die Hintergrundfärbung des Gels durch Waschen mit einer Entfärbelösung (10% Eisessig, 25% Isopropanol in *Aqua bidest.*) entfernt.

2.2.3.4. Westernblot

Die Übertragung der zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Hybond-P, Amersham GEHealthcare, Chalfont St Giles, UK) erfolgte mittels Westernblot-Verfahren.

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

Transferpuffer

20% (v/v) Methanol
25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin

TBST-Puffer

2 mM Tris-Base pH 7,6
14,3 mM NaCl
0,1% TWEEN®20

Der Blot wurde im sogenannten Wet-Verfahren für 2 Stunden bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Zur Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper verwendet: anti-MOSC1 (Abgent, San Diego, USA (1:1 000)), anti-MOSC2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (1:1 000) oder Sigma-Aldrich, Steinheim (1:10 000)),

anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase)(Sigma-Aldrich (1:1 000)), anti-Calnexin (Acris antibodies, Herford (1:10 000)) und anti-VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel)(Acris antibodies (1:1 000)). Die Visualisierung erfolgte mit den Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern Antirabbit IgG oder Antigoat IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK (1:10 000)).

Zur Detektion wurde das ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet und die Chemilumineszenz unter Verwendung eines Fotofilms (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) dokumentiert.

2.2.3.5. Bestimmung des Molybdän-Gehalts

Die Bestimmung des Molybdän-Gehalts der mARC-Proteine erfolgte mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Dazu wurden die Proteine zuerst mittels einer PD MiniTrap G-25 Säule (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (25 mM KH_2PO_4 , 25 mM K_2HPO_4 , 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, 20% (w/v) Glycerol, pH 7,4) umgepuffert, um eventuell freies Molybdän aus dem Medium zu entfernen. Nach der Bestimmung des Proteingehalts wurden die Proben auf einen Proteingehalt von etwa 0,5 mg/ml eingestellt. Jeweils 200 μl Proteinprobe wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 100°C denaturiert um das Molybdän aus dem Protein freizusetzen, mit 5 ng Indium als internem Standard versetzt und mit 2%iger (v/v) Salpetersäure auf 2 ml aufgefüllt.

Die erhaltene Suspension wurde durch einen 30 kDa Zentrifugalfilter filtriert (Amicon Ultra 0.5 Ultracel-PL Membrane, Millipore, Darmstadt) und das klare Filtrat manuell mittels eines PFA Micro-Nebulizers mit einer Probenzuführung von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ in das 7500cs ICP-MS Gerät (Agilent Technologies, Böblingen) eingebracht.

Alle natürlichen Molybdän-Isotope wurden bestimmt, aber nur das Isotop 98 m/z war frei von Interferenzen durch Isotope anderer Elemente und wurde für die Quantifizierung herangezogen. Für die Kalibrierung wurde eine Single-Element

Stock Lösung (Alfa Aesar, Karlsruhe) verwendet. Zur Beurteilung der analytischen Richtigkeit und Präzision wurden Nullwerte (Cytochrom b_5 Reduktase mit Molybdat im Zellkulturmedium und humanes mARC2 aus dem *E. coli*-Stamm RK5204), Probenwiederholungen und international zertifiziertes Referenz Material (NIST 1643e, BIR-1) zusammen mit den unbekanntenen Proben vermessen. Die Reproduzierbarkeit, bestimmt durch Replik-Messungen, war besser als 1% RSD (relative Standardabweichung; 1σ). Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,5 ng/ml Molybdän. Alle Arbeiten zur Probenvorbereitung wurden unter Reinraumbedingungen der Klasse 100 durchgeführt.

Zur Berechnung der Saturierung wurde für das Molybdän eine Masse von 96 g/mol und für die mARC-Proteine ein Molekulargewicht von 34 kDa herangezogen.

Diese Bestimmungen wurden am Institut für Geowissenschaften der CAU Kiel durchgeführt.

2.2.3.6. Bestimmung des Häm-Gehalts

Der Häm-Gehalt des Cytochrom b_5 wurde nach der Methode von Estabrook und Werringloer (1978) bestimmt. Dafür wurde ein Differenzspektrum aus oxidierten und NADH-reduzierten Form des Proteins aufgenommen und die Absorptionsdifferenz zwischen dem Absorptionsmaximum bei 426 nm und dem Absorptionsminimum bei 409 nm ermittelt. Die Berechnung des Hämgehalts erfolgte mithilfe des Absorptionskoeffizienten $185 \text{ l}/(\text{mM} \times \text{cm})$ der reduzierten Form des Cytochrom b_5 . Zur Berechnung der Saturierung wurde ein Molekulargewicht von 16 kDa für das Cytochrom b_5 herangezogen.

2.2.3.7. Bestimmung des FAD-Gehalts

Der FAD-(Flavin-Adenin-Dinucleotid)Gehalt der NADH Cytochrom b_5 Reduktase erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm (Whitby, 1953). Dazu wurde das Protein zuerst verdünnt (1:10) und für 10 Minuten bei 100°C erhitzt, um das FAD

aus dem Protein zu extrahieren. Nach dem Erkalten wurden die Proben für 10 Minuten bei 22 000g zentrifugiert und der Überstand vermessen. Zur Berechnung der FAD-Konzentration wurde eine Kalibriergerade mit bekannten Konzentrationen (0,01-0,1 $\mu\text{mol/ml}$) an FAD verwendet.

Zur Berechnung der Saturierung wurde ein Molekulargewicht von 29 kDa für die pflanzliche Cytochrom b_5 Reduktase und von 33 kDa für die humane Cytochrom b_5 Reduktase herangezogen.

2.2.3.8. Charakterisierung der *in vitro* Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim

Zur Charakterisierung der Enzymquellen wurden *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim durchgeführt, welches schon lange in der Arbeitsgruppe etabliert ist und daher zur Beurteilung der Enzymquellen herangezogen werden kann.

Die Inkubationsansätze mit den hepatischen Enzymquellen waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg subzelluläre Fraktion (Homogenat, Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol) zur Bestimmung der Anreicherung der N-reduktiven Aktivität bzw. 6 μg OMV bzw. 0,5 μg natives mARC, 3 mM (subzelluläre Fraktionen) bzw. 0,5 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die Inkubationsansätze mit den rekombinanten Enzymquellen waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b_5 , 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die Ansätze enthielten 3 mM Benzamidoxim für die Standardinkubation bzw. 0,1-8 mM Benzamidoxim zur Ermittlung der kinetischen Parameter. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot. Zur Berechnung der katalytischen Effizienz wurde die eingesetzte Enzymmenge auf den Molybdängehalt bezogen.

Die Inkubationen wurden in einem 37°C Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen betrug 150 µl in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen. Nach 3-minütiger Vorinkubation des Substrats mit der jeweiligen Enzymquelle wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt und anschließend das präzipitierte Protein bei 22 000g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach der von Clement *et al.* (2005) beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

2.2.4. *In vitro* Biotransformationsstudien von Benzylamidoxim

2.2.4.1. HPLC-Analytik

Zur Trennung von Benzylamidoxim und Benzylamidin wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 616 Pump	
Detektor	Waters 486 Tunable Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	EZChromElite Aufnahme und Auswertesoftware, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA)	
Stationäre Phase	Gemini 5 µm NX-C18, 4,6 × 150 mm (Phenomenex, Torrance, USA), Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, USA)	
Mobile Phase	93% 50 mM Ammoniumacetat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 7,0 7% Acetonitril (v/v)	
Flussrate	1 ml/min	
Laufzeit	10 min	
Detektion	UV, 216 nm	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeiten	Benzylamidin	7,3 ± 0,1 min
	Benzylamidoxim	15,5 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (0,45 µm, Whatman, Dassel), der organische Anteil lag in reiner Form (HPLC-grade) vor. Die mobile Phase wurde 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

2.2.4.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit in 7 verschiedenen Konzentrationen (1-500 μM) in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Metabolit in 10 verschiedenen Konzentrationen (1-500 μM) dem Inkubationsansatz mit 3 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH und 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben aufgearbeitet und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

2.2.4.3. Stabilität von Benzylamidoxim und Benzylamidin

Zur Bestimmung der Stabilität wurde das Substrat Benzylamidoxim 1,5 mM und der Metabolit Benzylamidin 100 μM in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und im Autosampler bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 11, 24 und 48 Stunden wurden die Ansätze mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

2.2.4.4. *In vitro* Biotransformationsansatz

Die Inkubationen wurden in einem 37°C Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen betrug 150 μl in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen. Nach 3-minütiger Vorinkubation des Substrats mit der jeweiligen Enzymquelle in 20 mM MES- oder 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Nach 15 bzw. 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt und anschließend das präzipitierte Protein bei 22 000g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

2.2.4.5. Inkubationsansatz mit porcinen hepatischen Enzymquellen

Die Inkubationsansätze mit den subzellulären hepatischen Fraktionen waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol bzw. Homogenat, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat Benzylamidoxim wurde in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Zur Charakterisierung der Reduktion mit hepatischen Lebermitochondrien wurden nacheinander die einzelnen Komponenten des Inkubationsansatzes durch äquivalente Mengen an Puffer ersetzt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt, dazu wurde die Substratkonzentration von 0,3 bis 8 mM variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot.

Die Inkubationsansätze mit der äußeren mitochondrialen Membran (OMV) waren wie folgt zusammengesetzt: 6 μ g OMV, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat Benzylamidoxim wurde in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Zur Charakterisierung der Reduktion mit OMV wurden nacheinander die einzelnen Parameter des Inkubationsansatzes wie Inkubationszeit, Cosubstratkonzentration, Proteinkonzentration und pH-Wert variiert. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt, dazu wurde die Substratkonzentration von 0,1 bis 3 mM variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot.

Die Inkubationsansätze mit dem nativen mARC waren wie folgt zusammengesetzt: 0,5 μ g natives mARC, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat Benzylamidoxim wurde in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

2.2.4.6. Inkubationsansatz mit rekombinanten humanen Enzymquellen

Die Inkubationsansätze mit den rekombinanten humanen Enzymen waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC1 oder mARC2, 76,2 pmol Cytochrom b₅, 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Proteine wurden nach ihrem Cofaktorgehalt eingesetzt. Das Substrat Benzylamidoxim wurde in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Zur Charakterisierung der Reduktion wurden nacheinander die einzelnen Komponenten des Inkubationsansatzes durch äquivalente Mengen an Puffer ersetzt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt, dazu wurde die Substratkonzentration von 0,3 bis 8 mM variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot. Zur Berechnung der katalytischen Effizienz wurde die eingesetzte Enzymmenge auf den Molybdängehalt bezogen.

2.3. ERGEBNISSE

2.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen

2.3.1.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sollte die Identität und Reinheit der verschiedenen Proteinquellen bestimmt werden.

Hepatische Subfraktionen

Um die Reinheit der subzellulären Fraktionen beurteilen zu können, wurden Westernblots mit Antikörpern gegen die entsprechenden Subfraktionen durchgeführt.

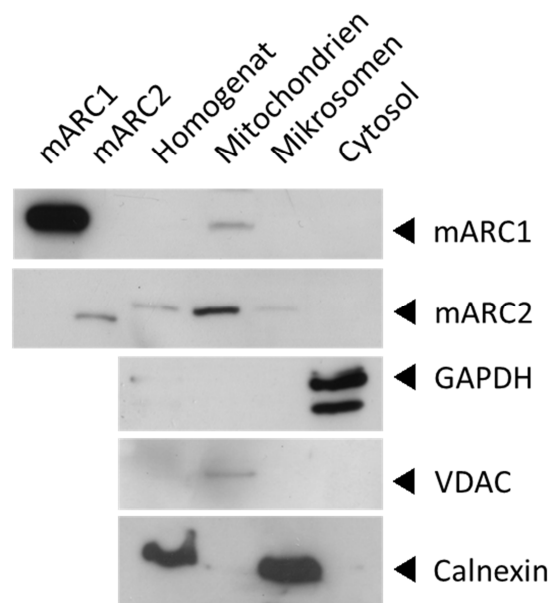


Abb. 2.3.1 Westernblot-Analyse der subzellulären hepatischen Fraktionen

Es wurden 0,05 µg humanes rekombinantes Protein (mARC1/mARC2) und 20 µg oder 12 µg hepatische Subfraktion pro Bahn aufgetragen. Als Antikörper für die Immunoblot Analyse wurden folgende Primärantikörper verwendet: anti-mARC1 (1:1 000), anti-mARC2 (1:1 000), anti-GAPDH (1:1 000), anti-VDAC (1:1 000) oder anti-Calnexin (1:10 000).

Dabei wurde ein Antikörper gegen das mitochondriale VDAC Protein (Voltage dependent anion channel) verwendet. Dieses bildet einen Kanal auf der äußeren mitochondrialen Membran (und auf der Plasmamembran), der den Austausch mitochondrialer Metabolite kontrolliert und damit eine Rolle bei der Apoptose spielt

(Zalk *et al.*, 2005). Als mikrosomaler Marker wurde ein Antikörper gegen Calnexin, welches als Chaperon auf dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, eingesetzt (Vassilakos *et al.*, 1996). Das cytosolische Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) wurde als cytosolischer Marker verwendet (Sirover, 2012).

Die entsprechenden Markerproteine wurden ausschließlich in der entsprechenden Subfraktion erkannt, so dass man von einer guten Reinheit der einzelnen Subfraktionen sprechen kann. Die Anreicherung von mARC in der mitochondrialen Fraktion ist deutlich zu erkennen. Allerdings konnten geringe Mengen mARC2 auch in der mikrosomalen Fraktion detektiert werden (Abb. 2.3.1). Da dieses Signal allerdings nicht stärker ist als im Homogenat, hat keine Anreicherung stattgefunden, so dass eine Colokalisation in den Mikrosomen wenig wahrscheinlich ist.

Rekombinante Enzymquellen

Um die Reinheit und Identität der rekombinanten Enzymquellen beurteilen zu können, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt (Abb. 2.3.2). Bei jedem Protein liegt bei dem entsprechend kalkulierten Molekulargewicht (hmARC1 32,9 kDa; hmARC2 33,4 kDa; Cytochrom b_5 14,5 kDa; Cytochrom b_5 Reduktase 32,5 kDa; pmARC1 35,6 kDa; pmARC2 34,6 kDa; *A.t.* Cytochrom b_5 13,9 kDa; *A.t.* Cytochrom b_5 Reduktase 29,0 kDa) eine dominierende Bande vor. Allerdings sind auf einigen Bahnen noch weitere Proteinbanden zu erkennen, wobei es sich um Zersetzungsprodukte des entsprechenden Proteins oder um Hostcell-Proteine aus der *E. coli*-Kultur handeln könnte.

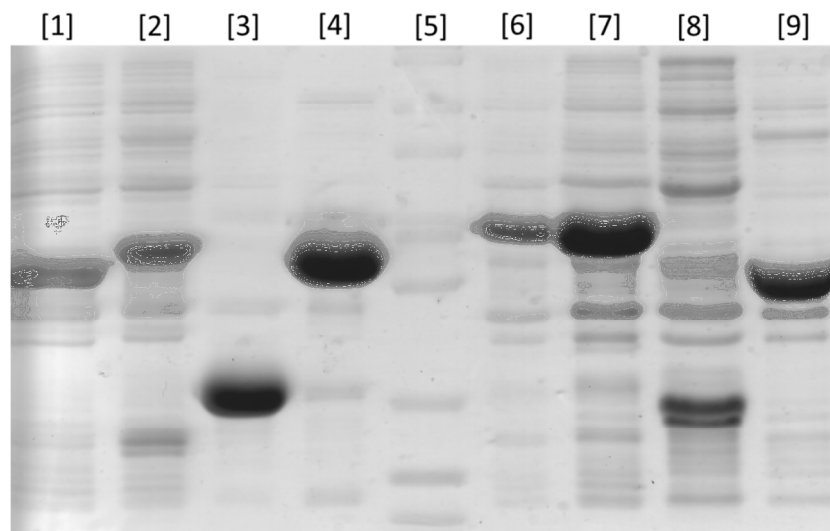


Abb. 2.3.2 SDS-PAGE der rekombinanten Proteine mit Coomassiefärbung

Es wurden jeweils 15 µg rekombinantes Protein pro Bahn aufgetragen. [1] hmARC1; [2] hmARC2; [3] Cytochrom *b*₅; [4] Cytochrom *b*₅ Reduktase; [5] Molekulargewichtsmarker (97,4 kDa; 66,3 kDa; 55,4 kDa; 36,5 kDa; 31,0 kDa; 21,5 kDa; 14,4 kDa; 6,0 kDa); [6] pmARC1; [7] pmARC2; [8] *A.t.* Cytochrom *b*₅; [9] *A.t.* Cytochrom *b*₅ Reduktase

2.3.1.2. Molybdän-Bestimmung

Der Molybdän-Gehalt der humanen und pflanzlichen mARC-Proteine wurde mittels ICP-MS-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2.3.1 dargestellt.

Tab. 2.3.1 Molybdän-Gehälter der mARC-Proteine

mARC-Isoform	Molybdän-Gehalt (nmol Mo/mg Protein)	Sätturierung (%)
hmARC1	8,3 ± 0,4	28
hmARC2	9,4 ± 0,1	32
pmARC1	10,0 ± 0,4	34
pmARC2	11,0 ± 0,3	37

2.3.1.3. Häm-Gehaltsbestimmung

Der Häm-Gehalt der Cytochrom b_5 -Proteine wurde mittels Differenzspektrum ermittelt. Dieser lag bei $4,0 \pm 0,9$ nmol Häm/mg Protein für das humane Cytochrom b_5 , was einer Saturierung von 7% entspricht. Das pflanzliche Cytochrom b_5 wies mit $20,5 \pm 2,1$ nmol Häm/mg Protein und einer Saturierung von 33% einen deutlich höheren Häm-Gehalt auf.

2.3.1.4. FAD-Gehaltsbestimmung

Der FAD-Gehalt der Cytochrom b_5 Reduktasen wurde, nachdem das FAD aus dem Protein herausgelöst wurde, photometrisch bestimmt. Sowohl die humane als auch die pflanzliche Cytochrom b_5 Reduktase wiesen mit FAD-Gehältern von $24,1 \pm 1,5$ nmol FAD/mg Protein (human) bzw. $35,6 \pm 1,6$ nmol FAD/mg Protein (pflanzlich) eine Saturierung von nahezu 100% auf.

2.3.1.5. *In vitro* Studien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim

Zur Charakterisierung der entsprechenden Proteinquellen wurden Standardinkubationen mit dem im Arbeitskreis etablierten Modellsubstrat Benzamidoxim durchgeführt, um die Ergebnisse der neuen Substrate auf die Umsetzung des Modellsubstrates normieren zu können und so eine relative Umsetzungsrate bezogen auf die Benzamidoxim-Umsetzung bestimmen zu können.

Die Ergebnisse der Reduktion von Benzamidoxim mit den unterschiedlichen Enzymquellen sind in den folgenden Tabellen dargestellt und korrelieren mit in früheren Studien bestimmten Ergebnissen.

Tab. 2.3.2 Reduktion von Benzamidoxim durch hepatische subzelluläre Fraktionen

subzelluläre hepatische Fraktion	Umsetzungsrate (nmol Benzamidin/(min×mg Protein))
Homogenat	7,8 ± 1,2
Mitochondrien	16,9 ± 0,2
Mikrosomen	4,9 ± 0,2
Cytosol	0,3 ± 0,0

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg subzelluläre Fraktion (Homogenat, Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Tab. 2.3.3 Anreicherung der N-reduktiven Aktivität von Benzamidoxim in den porcinen hepatischen Enzymquellen

Proteinquelle	Umsetzungsrate (nmol Benzamidin/(min×mg Protein))
Mitochondrien	17 ± 1
OMV	150 ± 4
natives mARC	373 ± 131

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Mitochondrien bzw. 6 µg OMV bzw. 0,5 µg natives mARC, 3 mM (Mitochondrien) bzw. 0,5 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Tab. 2.3.4 Umsetzung von Benzamidoxim durch das rekombinante humane und pflanzliche Enzymsystem

Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol Benzamidin/(min×mg Gesamtprotein))			
	hmARC1	hmARC2	pmARC1	pmARC2
komplett	159,4 ± 36,0	142,5 ± 24,4	238,3 ± 35,2	598,8 ± 33,3
- NADH	ND	ND	ND	ND
- Cytochrom b ₅	ND	ND	2,1 ± 0,2	ND
- Cytochrom b ₅ Reduktase	ND	ND	8,5 ± 0,1	3,9 ± 0,5
- mARC	ND	ND	3,5 ± 0,3	3,9 ± 0,1
- Protein	-	-	-	-
- Substrat	ND	ND	ND	ND

ND = nicht detektierbar

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b₅, 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,7 nmol Benzamidin/(min×mg Gesamtprotein) für das humane System bzw. 1,9 nmol Benzamidin/(min×mg Gesamtprotein) für das pflanzliche System.

Tab. 2.3.5 Kinetische Parameter der Reduktion von Benzamidoxim durch das rekombinante humane Enzymsystem

mARC Isoform	K _m (mM)	v _{max} (nmol/(min×mg))	katalytische Effizienz (1/(M×s))
hmARC1	0,18 ± 0,09	168,5 ± 14,9	5800
hmARC2	0,35 ± 0,11	117,0 ± 8,7	2000

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC1 oder mARC2, 76,2 pmol Cytochrom b₅, 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 0,1-8 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.2. *In vitro* Reduktion von Benzylamidoxim

2.3.2.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm

Die Trennung von Benzylamidoxim und Benzylamidin erfolgte mit einer neu entwickelten HPLC-Methode. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 2.3.3 dargestellt. Die Trennung von Substrat und Metabolit gelang mit einer guten Auflösung ($R > 9$) und innerhalb kurzer Retentionszeiten (< 17 Minuten). Auch die Trennung vom Cofaktor NADH/NAD⁺ war gegeben.

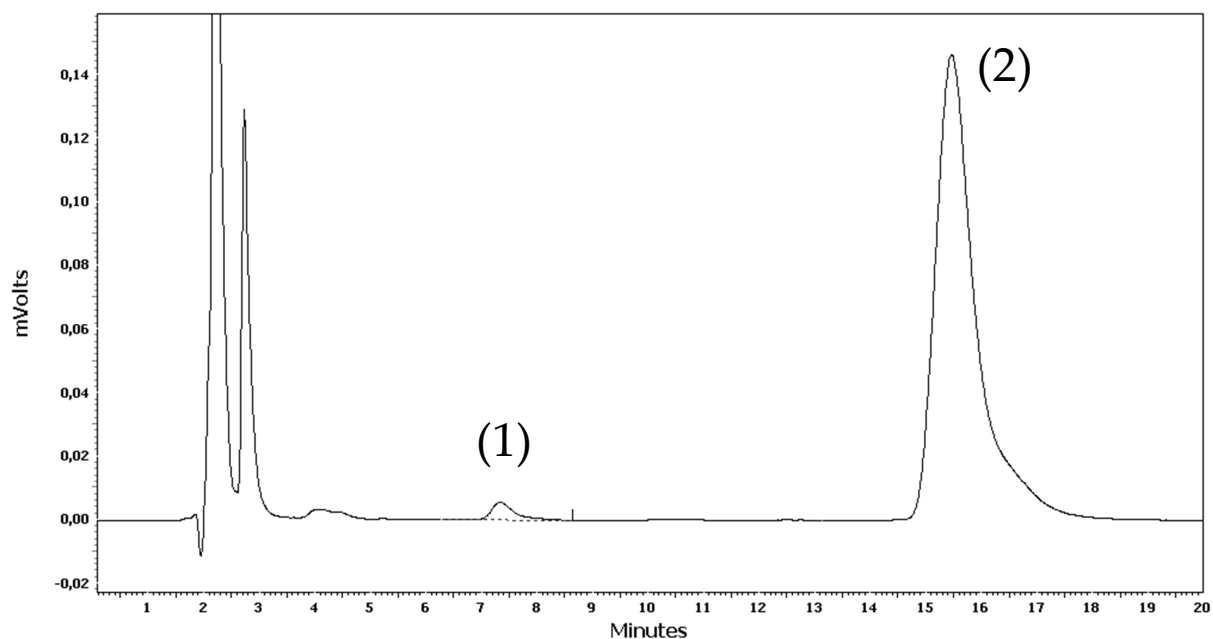


Abb. 2.3.3 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von Benzylamidoxim und Benzylamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien 3 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH und 100 μ M Benzylamidin in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). (1) Benzylamidin; (2) Benzylamidoxim

2.3.2.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade war im Konzentrationsbereich von 1-500 μM linear ($R^2 = 0,9995$). Die Richtigkeit für den ermittelten Konzentrationsbereich (5-500 μM) betrug $98 \pm 9\%$.

Die mithilfe der Kalibriergeraden ermittelte Wiederfindung betrug im Konzentrationsbereich von 1-500 μM $184 \pm 107\%$. Daher wurde zur Quantifizierung der enzymatisch gebildeten Metabolitenkonzentration die Wiederfindungsgerade ($R^2 = 0,9986$) herangezogen.

Dadurch ergab sich im Bestimmungsbereich von 10-500 μM eine durchschnittliche Richtigkeit von $105 \pm 20\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (10 μM) die Richtigkeit einen Wert von 73% aufwies.

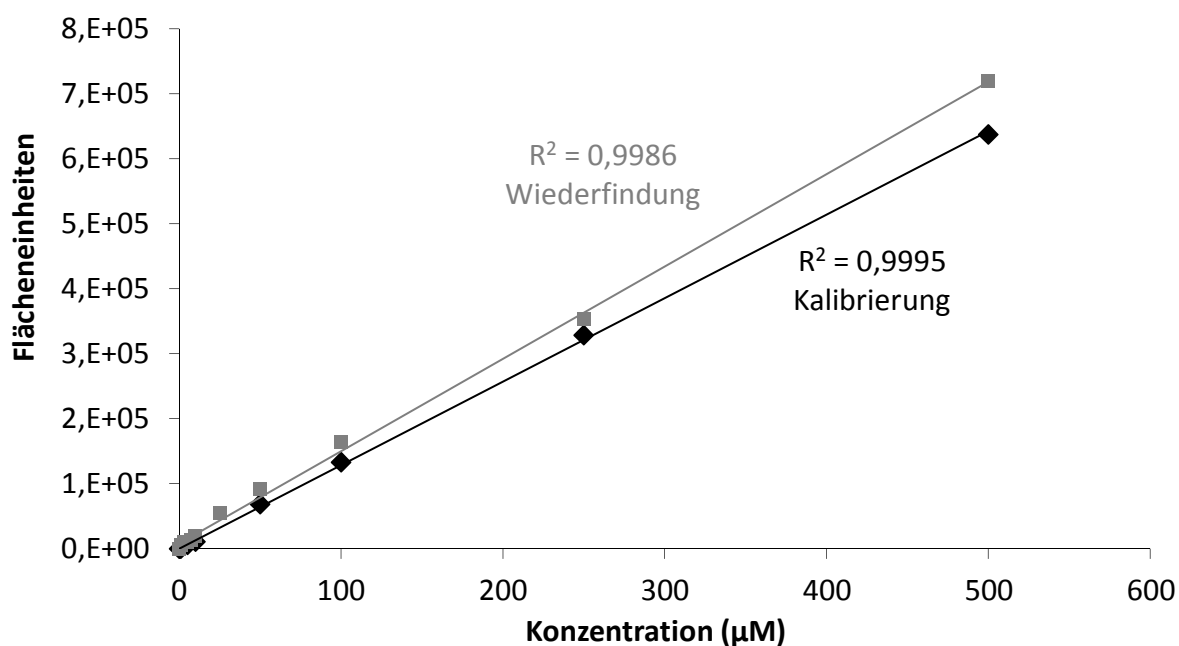


Abb. 2.3.4 Kalibrierung und Wiederfindung von Benzylamidoxim

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Durchführung sind in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.2.3. Stabilität

Die Bestimmung der Stabilität zeigte, dass sowohl das Substrat Benzylamidoxim als auch der Metabolit Benzylamidin über 5 Tage bei Raumtemperatur im Autosampler stabil sind (Daten nicht gezeigt).

2.3.2.4. Reduktion durch subzelluläre hepatische Fraktionen

Die Umsetzung von Benzylamidoxim wurde mit verschiedenen subzellulären Fraktionen getestet. Dabei konnte eine Reduktion zum Benzylamidin gezeigt werden, welches mit der beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert wurde.

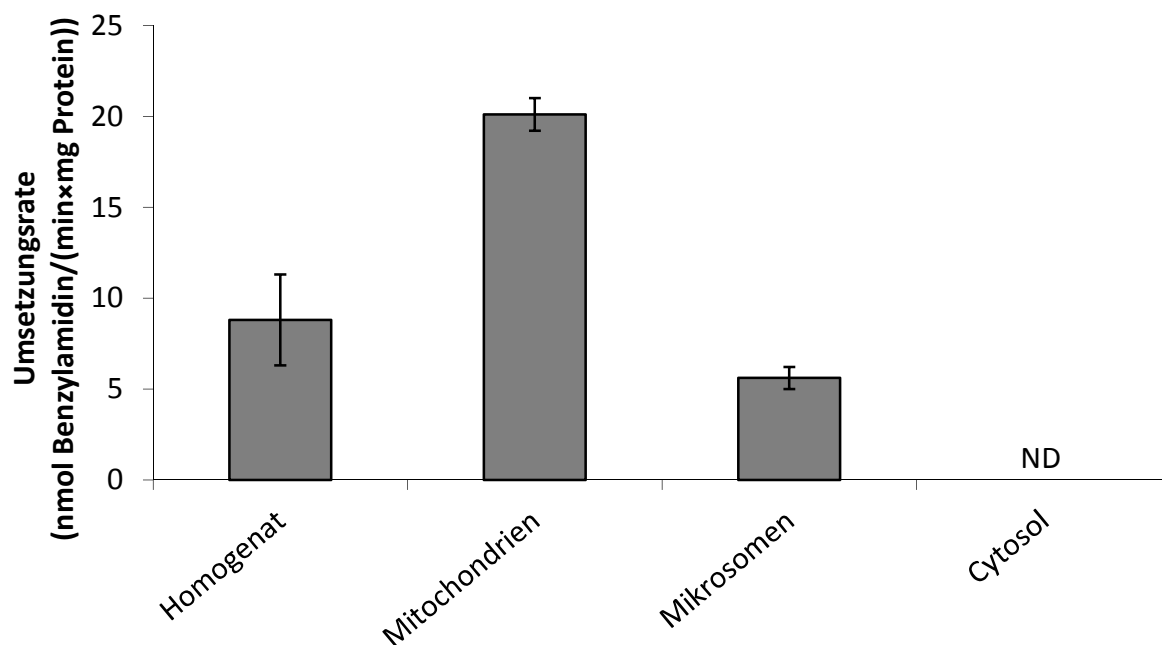


Abb. 2.3.5 Reduktion von Benzylamidoxim durch hepatische subzelluläre Fraktionen

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg subzelluläre Fraktion, 3 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 3 nmol Benzylamidin/(min×mg Protein). (ND = nicht detektierbar)

Die höchste Umsetzungsrate konnte in den Mitochondrien detektiert werden (relative Umsetzungsrate (bezogen auf die Benzamidoxim-Umsetzung) = 1,2), wohingegen in den Mikrosomen und im Cytosol nur geringe Umsetzungen beobachtet

tet werden konnten (Abb. 2.3.5). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung vom Cofaktor NADH abhängig ist (Daten nicht gezeigt).

Bestimmung der kinetischen Parameter der mitochondrialen hepatischen Fraktion

Da gezeigt werden konnte, dass die N-reduktive Aktivität in den Mitochondrien angereichert ist, wurden die kinetischen Parameter K_m und v_{max} der Umsetzung von Benzylamidoxim mit porcinen Lebermitochondrien bestimmt. Die Reaktion folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 2.3.6) mit einem K_m -Wert von $0,36 \pm 0,20$ mM und einem v_{max} -Wert von $22,9 \pm 3,1$ nmol Benzylamidin/(min×mg Protein).

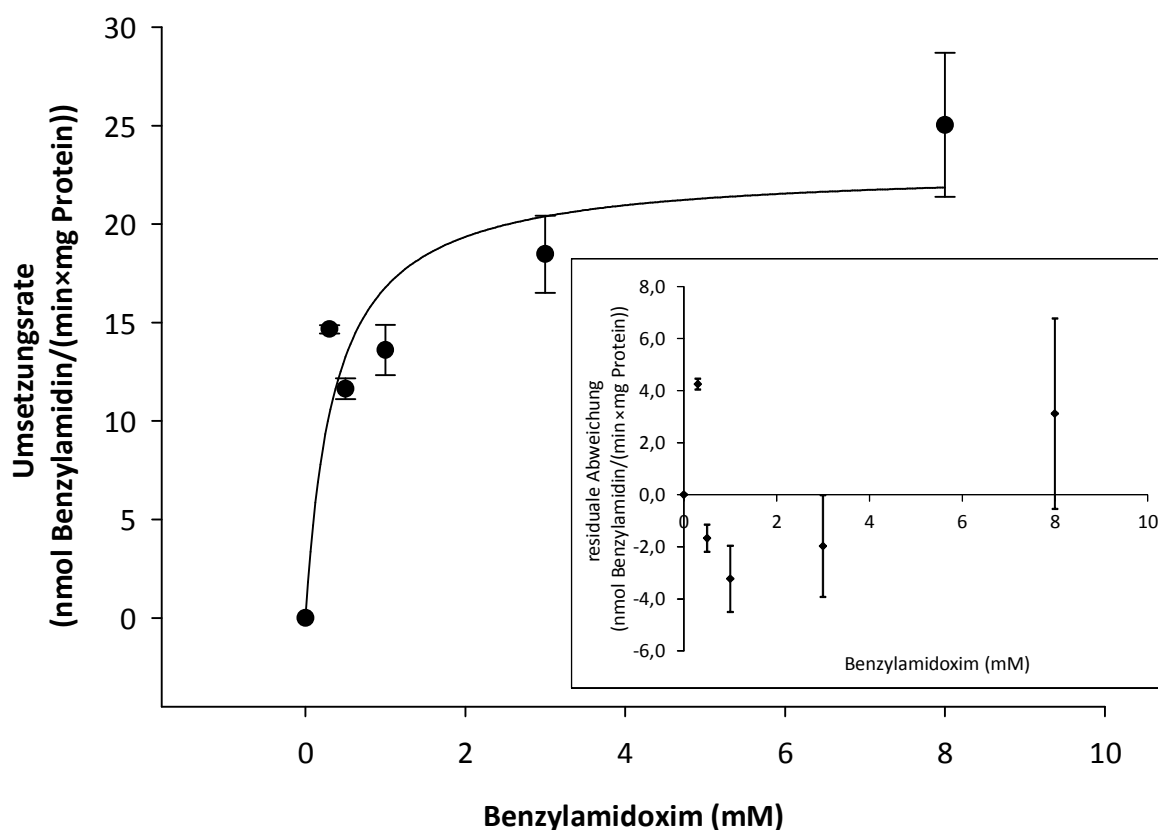


Abb. 2.3.6 Michaelis-Menten-Kinetik von Benzylamidoxim mit porcinen Lebermitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Mitochondrien, 0,3-8 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.2.5. Reduktion durch die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV)

Um die Umsetzung von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV) zu charakterisieren, wurden die einzelnen Parameter der Inkubationsbedingungen variiert.

Einfluss der Inkubationszeit

Die Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion verlief über einen Zeitraum von etwa 20 Minuten linear ($R^2 = 0,9979$). Danach nahm die Umsetzungsgeschwindigkeit zum Teil rapide ab (Abb. 2.3.7). Daher wurde für künftige Inkubationen eine Inkubationszeit von 20 Minuten gewählt. Dies entspricht auch dem von Havemeyer (2006) für das Modellsubstrat Benzamidoxim gefundenen Ergebnis.

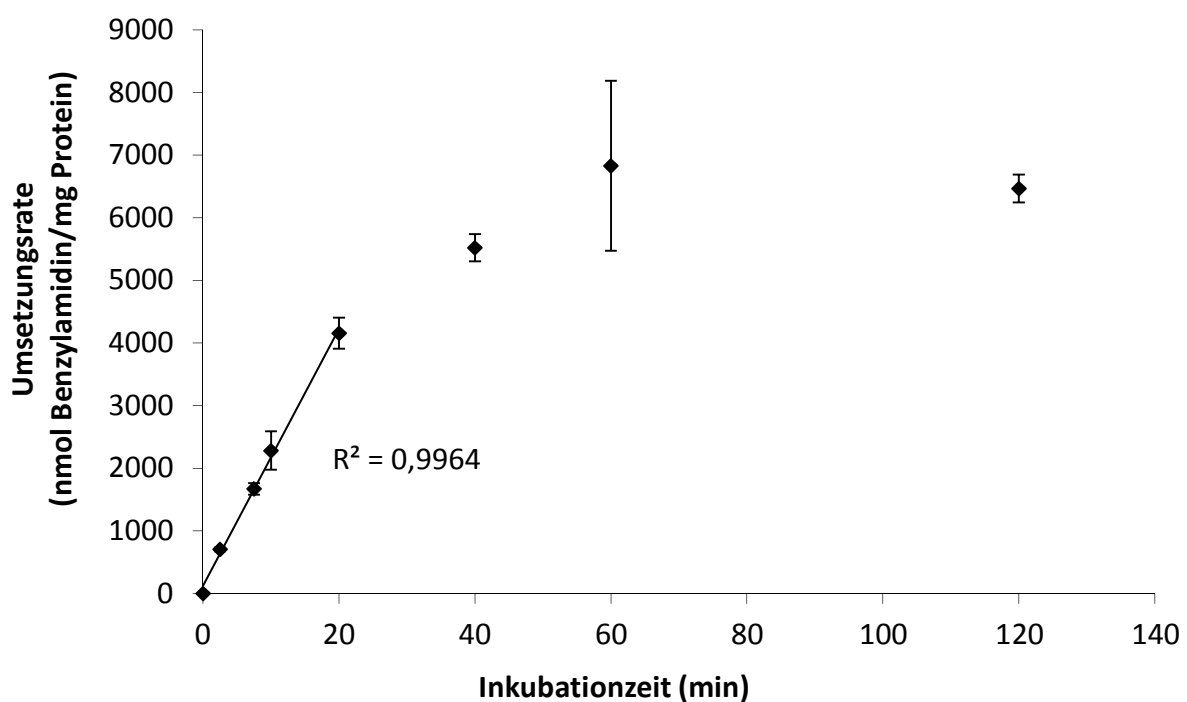


Abb. 2.3.7 Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 6 μ g OMV, 0,5 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 2,5-120 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Einfluss der Cosubstratkonzentration

Die höchsten Umsetzungen bei der Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion erhielt man bei einer Cosubstratkonzentration von 0,5 mM NADH. Bei höheren Cosubstratkonzentrationen nahm die Umsetzungsrate wieder ab (Abb. 2.3.8). Daher wurde für künftige Inkubationen eine Cosubstratkonzentration von 0,5 mM NADH gewählt. Dies entspricht auch dem von Havemeyer (2006) für das Modellsubstrat Benzamidoxim gefundenen Ergebnis.

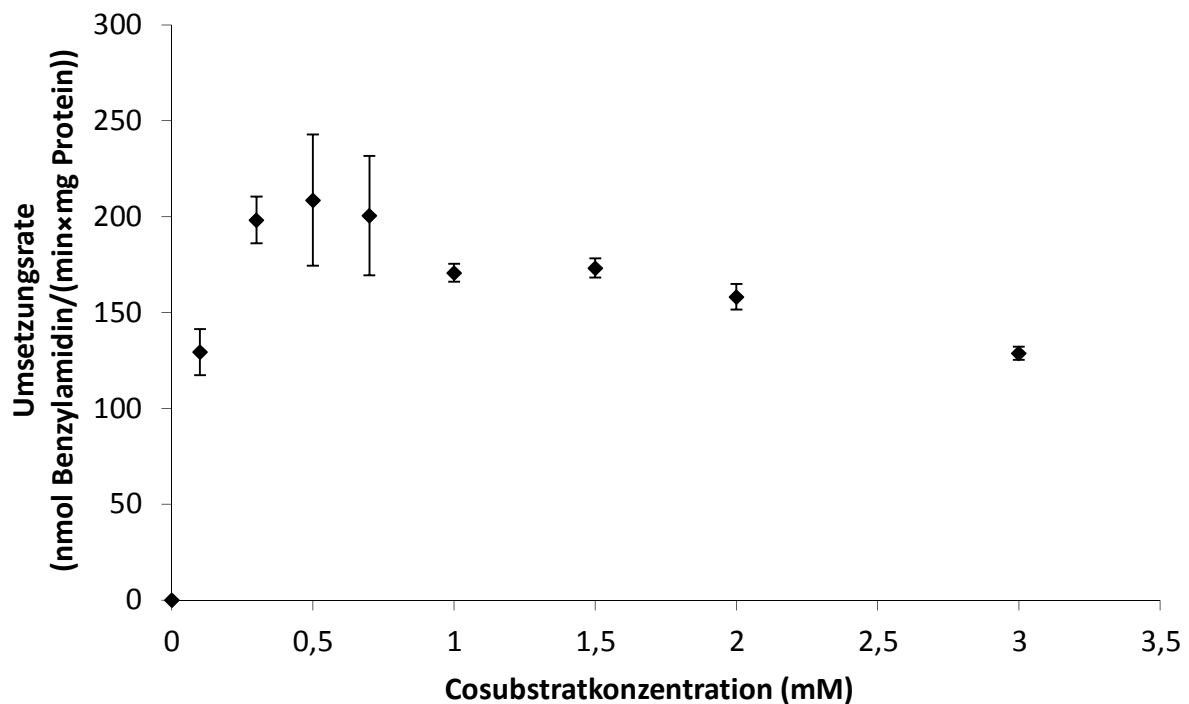


Abb. 2.3.8 Einfluss der Cosubstratkonzentration auf die Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 6 μ g OMV, 0,5 mM Benzylamidoxim, 0-3 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Einfluss der Proteinmenge

Die Umsetzung von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion verlief in einem Bereich von 0,13–12 µg OMV linear ($R^2 = 0,9995$). Danach nahm die Umsetzungsrate wieder ab (Abb. 2.3.9). Daher wurde bei künftigen Inkubationen eine Proteinmenge von 6 µg eingesetzt. Dies entspricht auch dem von Havemeyer (2006) für das Modellsubstrat Benzamidoxim gefundenen Ergebnis.

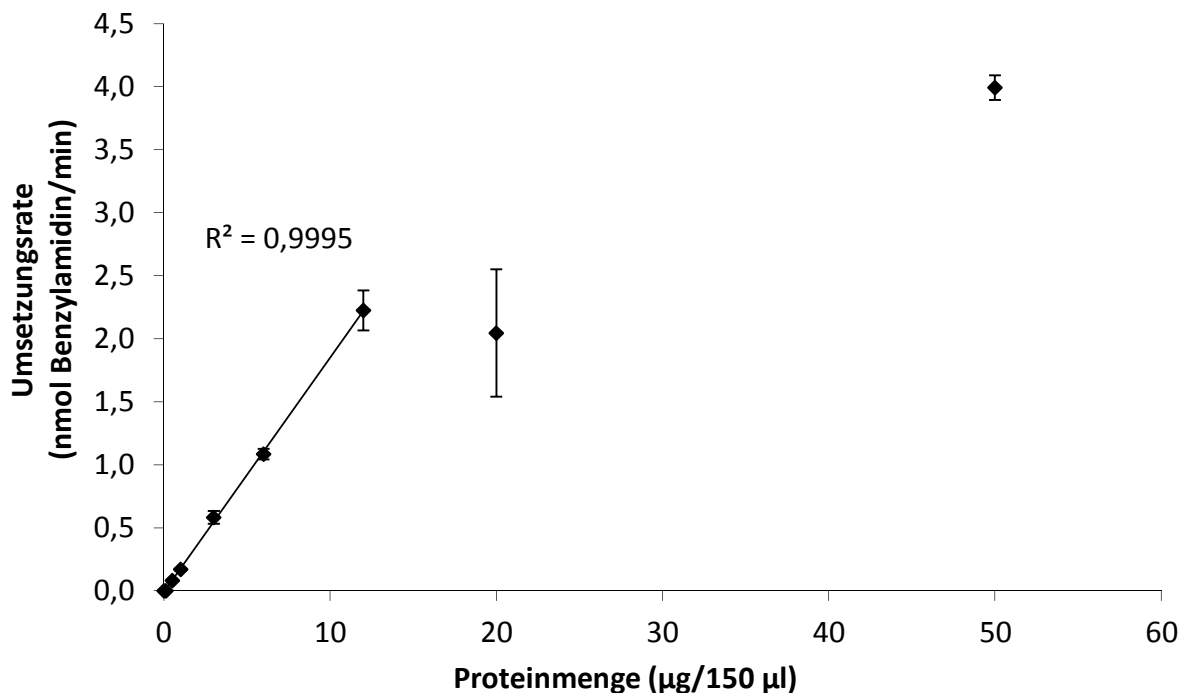


Abb. 2.3.9 Einfluss der Proteinmenge auf die Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,13–50 µg OMV, 0,5 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Einfluss des pH-Wert

Wie aus Abb. 2.3.10 hervorgeht, liegt das pH-Optimum der Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion im leicht sauren Bereich. Dies entspricht auch dem von Havemeyer (2006) für das Modells substrat Benzamidoxim gefundenen Ergebnis.

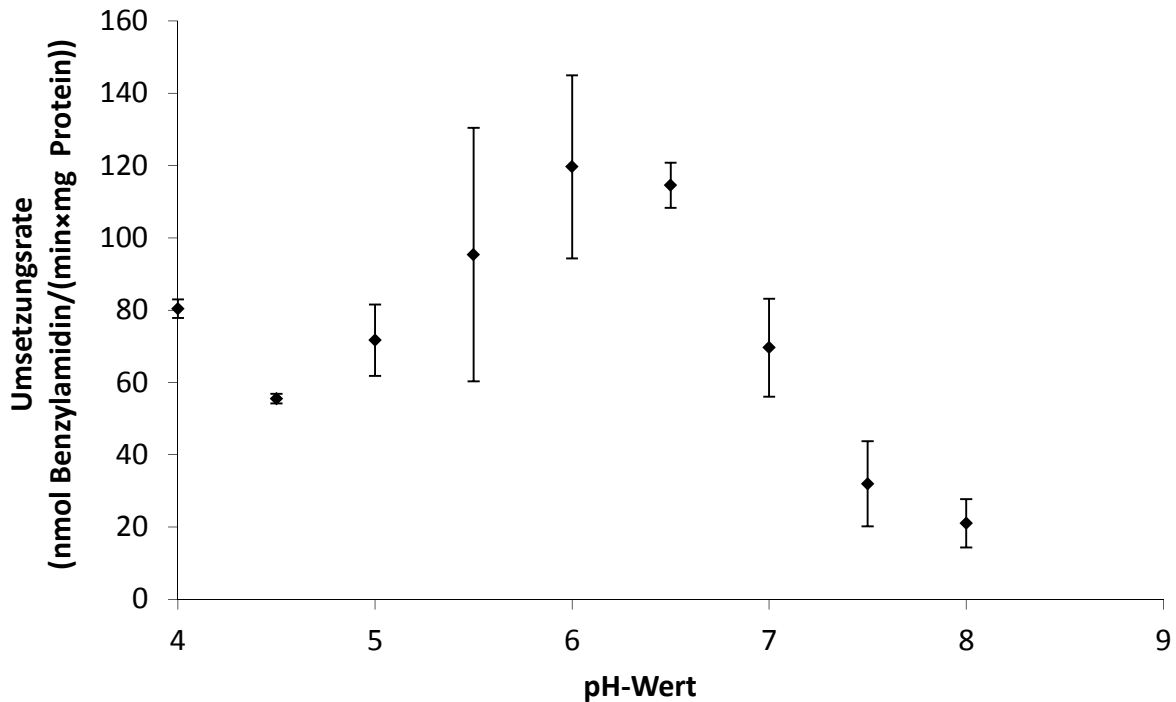


Abb. 2.3.10 Einfluss des pH-Werts auf die Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 6 µg OMV, 0,5 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Bestimmung der kinetischen Parameter

Nachdem alle Parameter der Inkubationsbedingungen optimiert wurden, wurden die kinetischen Parameter der Reduktion von Benzylamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion bestimmt. Die Reaktion folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 2.3.11) mit einem K_m -Wert von $0,06 \pm 0,01$ mM und einem v_{\max} -Wert von $213,8 \pm 4,9$ nmol Benzylamidin/(min×mg OMV).

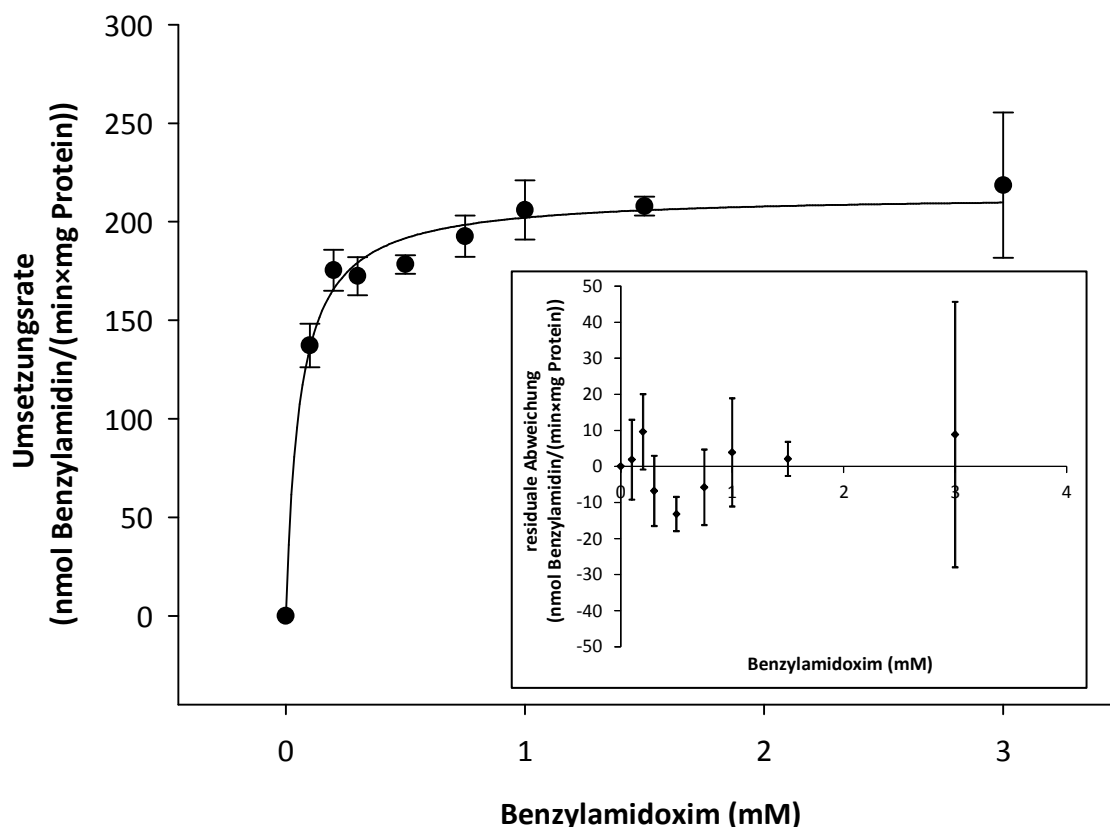


Abb. 2.3.11 Michaelis-Menten-Kinetik von Benzylamidoxim mit äußerer mitochondrialer Membranfraktion (OMV)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 6 μ g OMV, 0,1-3 mM Benzylamidoxim, 0,5 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.2.6. Reduktion durch natives mARC

Die Reduktion von Benzylamidoxim durch natives mARC zum Benzylamidin konnte gezeigt werden. Leider stand mir kein reines natives mARC zur Verfügung, was man daran erkennen kann, dass die Umsetzung bereits mit dem nativen mARC alleine ohne Zugabe von Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase stattfand (Daten nicht gezeigt).

Aber wie man in Tab. 2.3.6 erkennt, zeigt sich beim nativen mARC eine deutliche Steigerung der Aktivität. Außerdem kann man anhand der relativen Umsetzungsrate erkennen, dass Benzylamidoxim etwa um den Faktor 1,2 besser umgesetzt wird als das Modellssubstrat.

Tab. 2.3.6 Anreicherung der N-reduktiven Aktivität von Benzylamidoxim in den porcinen hepatischen Enzymquellen

Proteinquelle	Umsetzungsrate	relative
	(nmol Benzylamidin/(min×mg Protein))	Umsetzungsrate
Mitochondrien	20 ± 1	1,2
OMV	178 ± 5	1,2
natives mARC	588 ± 11	1,6

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Mitochondrien bzw. 6 µg OMV bzw. 0,5 µg natives mARC, 3 mM (Mitochondrien) bzw. 0,5 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die relative Umsetzungsrate bezieht sich auf die Umsetzung des Modellssubstrats Benzamidoxim.

2.3.2.7. Rekonstituiertes System mit rekombinanten humanen mARC-Homologen**Bestimmung der kinetischen Parameter**

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Reduktion von Benzylamidoxim durch das rekombinante humane mARC-haltige Enzymsystem wurde der Einfluss der Substratkonzentration getestet. Sowohl die Reaktion durch mARC1 als auch durch mARC2 folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die daraus bestimmten enzymkinetischen Parameter sind in Tab. 2.3.7 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Benzylamidoxim durch beide mARC-Homologe zu Benzylamidin reduziert wird. Allerdings besitzt mARC1 trotz ähnlicher v_{\max} -Werte eine etwa doppelt so große Affinität wie mARC2, was sich an der höheren katalytischen Effizienz erkennen lässt.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) des Benzylamidoxims ist mit mARC1 etwa 1,5 und mit mARC2 etwa 2,4 mal höher als mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim, während die katalytischen Effizienzen etwa gleich sind.

Tab. 2.3.7 Kinetische Parameter der Reduktion von Benzylamidoxim durch das rekombinante humane Enzymsystem

mARC Isoform	K_m (mM)	v_{\max} (nmol/(min×mg))	katalytische Effizienz (1/(M×s))
hmARC1	0,37 ± 0,05	245,8 ± 7,9	4100
hmARC2	1,00 ± 0,20	286,4 ± 20,3	1710

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC1 oder mARC2, 76,2 pmol Cytochrom b_5 , 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase, 0,1-8 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Charakterisierung der Reduktion

Zur Bestimmung der Umsetzungsraten und Charakterisierung der Reduktion von Benzylamidoxim wurden Inkubationen mit dem rekombinanten Enzymsystem, bestehend aus mARC, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase, sowie unter Austausch einzelner Komponenten durch äquivalente Mengen an Puffer durchgeführt. Dabei wurden die Substratkonzentrationen so gewählt, dass diese im gesättigten Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik lagen.

Wie man Tab. 2.3.8 entnehmen kann, konnte eine Reduktion zum Benzylamidin nur mit dem kompletten Reaktionsansatz detektiert werden. Das Fehlen einer Komponente führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Die Reaktion ist abhängig vom Cofaktor NADH. Die relative Umsetzungsrate (bezogen auf die Benzamidoxim-Umsetzung) beträgt 1,4 bei mARC1 und 1,3 bei mARC2.

Tab. 2.3.8 Umsetzung von Benzylamidoxim durch das humane Enzymsystem

Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol Benzylamidin/(min×mg Protein))	
	mARC1	mARC2
komplett	229,7 ± 17,2	181,0 ± 4,8
- NADH	ND	ND
- Cytochrom b ₅	ND	ND
- Cytochrom b ₅ Reduktase	ND	ND
- mARC	ND	ND
- Protein	-	-
- Substrat	ND	ND

ND = nicht detektierbar

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC1 oder mARC2, 76,2 pmol Cytochrom b₅, 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 3 mM Benzylamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 8,4 nmol Benzylamidin/(min×mg Protein). Umsetzungsrate, die nicht detektiert werden bzw. unterhalb dieser Bestimmungsgrenze liegen, konnten nicht quantifiziert werden (ND).

2.4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden *in vitro* Biotransformationsstudien von verschiedenen *N*-hydroxylierten Substraten (siehe auch Kapitel 4 und 5) mit den isolierten porcinen Enzymquellen und mit dem rekombinanten Dreikomponenten-Enzymsystem durchgeführt.

Dazu wurden die verschiedenen Enzymquellen im Vorfeld durch geeignete biochemische Methoden und durch *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem etablierten Modellsubstrat Benzamidoxim charakterisiert um die mit den neuen Substraten ermittelten Umsetzungsraten vergleichen zu können. Um eine relative Umsetzungsrate berechnen zu können, müssen die Umsetzungsraten des neuen Substrats und des Modellsubstrats mit der gleichen Enzymcharge bestimmt werden. Der Vorteil der relativen Umsetzungsraten besteht in einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Substrate, da Schwankungen durch unterschiedliche Enzymchargen herausgemittelt werden.

Die Subfraktionen aus porciner Leber wurden nach bereits im Arbeitskreis gut etablierten Methoden gewonnen (Havemeyer *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2005). Da es sich bei diesen Methoden um Differential- und Dichtegradientenzentrifugationen handelt, können die isolierten subzellulären Fraktionen nur Anreicherungen darstellen. Um die Reinheit der entsprechenden Subfraktionen zu überprüfen, wurden neben *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim Westernblots mit spezifischen mARC-Antikörpern und mit Antikörpern gegen organspezifische Markerproteine durchgeführt (Krischkowski, 2010).

Die Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in der mitochondrialen Fraktion konnte bestätigt werden (Anreicherungsfaktor 2) und korreliert mit dem Auftreten der mARC-Bande im Westernblot, so dass die *N*-reduktive Aktivität des Modellsubstrats Benzamidoxim als Markeraktivität für das mARC-abhängige Enzymsystem angesehen werden kann.

Ebenso wie die hepatischen Subfraktionen wurden auch die äußere mitochondriale Membran (OMV) und das native mARC im Vorfeld durch *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim charakterisiert. Dabei entsprach die Umsetzungsrate der äußeren mitochondrialen Membranfraktion mit 150 nmol Benzamidin/(min×mg Protein) in etwa auch der von Clement *et al.* (2005) bestimmten Aktivität.

Leider war das hier verwendete native mARC nicht frei von Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase. Dies lässt sich daran erkennen, dass das hier verwendete native mARC auch ohne den Zusatz von Cytochrom b₅ und dessen Reduktase in der Lage war Benzamidoxim zu reduzieren. Die in dieser Arbeit ermittelte Umsetzungsrate blieb auch weit hinter der von Havemeyer *et al.* (2006) bestimmten zurück (Faktor 17).

Die Umsetzungsraten mit den rekombinanten Proteinen lagen immer weit hinter denen der nativen Enzyme zurück (Havemeyer *et al.*, 2006; Grünewald *et al.*, 2008). Ein Grund dafür könnte in der mangelnden Saturierung oder einer Veränderung der Proteinstruktur einiger Komponenten des mARC-Systems liegen. Diese cofaktorfreien nicht aktiven Proteine und die Defragmentierungs- und Hostcellproteine, die außerdem noch in geringen Mengen in den rekombinanten Proteinen enthalten sind, gehen in die Berechnung der *N*-reduktiven Aktivität mit ein. Außerdem liegen die rekombinant hergestellten Proteine (außer pmARC1) im Gegensatz zu den nativen Proteinen alle in ihrer trunkierten Form vor, das heißt um ihren hydrophoben Membrananker gekürzt, und sind mit einem His₆-Tag versehen, um mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt werden zu können.

Nach dem Wechsel des Puffersystems von 100 mM Phosphat- auf 20 mM MES-Puffer konnte die Aktivität des rekombinanten Enzymsystems bereits um den Faktor 4 gesteigert werden (Plitzko, 2010). In den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Biotransformationsstudien sollten die drei Komponenten des Enzymsystems einheit-

lich nach ihrem Cofaktorgehalt eingesetzt werden um die *N*-reduktive Aktivität verschiedener Studien besser miteinander vergleichen zu können.

Dafür wurde der Molybdängehalt der mARC-Proteine mittels ICP-MS-Analyse bestimmt. Dadurch, dass nicht gebundenes Molybdän durch vorheriges Umpuffern der Proteine entfernt wurde, wurde nur das am mARC-Protein gebundene Molybdän bestimmt, wodurch dann Aussagen über das Maß an aktivem Molybdäncofaktor gemacht werden können, da nur mit Molybdän beladener Cofaktor aktiv ist. Im Gegensatz dazu wird bei der FormA-Analyse auch das molybdänfreie MPT mitbestimmt und der häufig verwendete *nit-1*-Assay stellt nur einen biologischen Nachweis für den Molybdäncofaktor dar, erlaubt allerdings keine exakte Quantifizierung der Aktivität.

Das Cytochrom b_5 wurde auch in früheren Studien nach dem Häm-Gehalt eingesetzt, so dass die Quantifizierung schon lange im Arbeitskreis etabliert war. Auffällig ist, dass das pflanzliche Cytochrom b_5 etwa 5 Mal besser saturiert ist als das humane. Dies hat einen Einfluss auf die eingesetzte Enzymmenge und stellt damit einen Grund dafür dar, dass mit dem pflanzlichen Dreikomponenten-Enzymsystem eine höhere *N*-reduktive Aktivität bestimmt wird.

Die Cytochrom b_5 Reduktase wurde zuvor nach Aktivität eingesetzt. Der nun bestimmte FAD-Gehalt zeigt eine nahezu 100%ige Saturierung der Proteine.

Aufgrund des stark basischen Charakters besitzen Amidine eine sehr schlechte Bioverfügbarkeit, weshalb sie in ihre Amidoxime überführt werden und dadurch wesentlich besser absorbiert werden können. Die Aktivierung dieser Prodrugs durch das mARC-haltige Enzymsystem konnte in vergangenen Studien für das Modellsubstrat Benzamidoxim sowie weitere aromatische *N*-hydroxylierte Amidine wie das Ximelagatran und die Amidoxime des Pentamidins gezeigt werden. Allerdings wurde in allen bisherigen Studien dieses Prodrugprinzip nur an aromatischen Amidinen untersucht, obwohl auch Alkylamidine als Arzneistoffkandidaten zum Beispiel gegen Malaria in der Pipeline sind (Ouattara *et al.*, 2007).

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob auch aliphatische Amidoxime durch das mARC-haltige Enzymsystem reduziert werden. Dafür wurde in dieser Arbeit das Modellsubstrat Benzylamidoxim eingesetzt.

In *in vitro* Biotransformationsstudien mit den hepatischen Subfraktionen konnte ebenso wie beim Benzamidoxim eine Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in den Mitochondrien detektiert werden, was auf eine Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems an der Reduktion hinweist. Die Reduktionen durch Mitochondrien und die äußere mitochondriale Membran folgten, wie für das Modellsubstrat Benzamidoxim beschrieben, Michaelis-Menten-Kinetiken (Havemeyer, 2006).

Sowohl die Umsetzungsraten der hepatischen Mitochondrien als auch die Umsetzungsraten, die nach der Optimierung der Reaktion durch die äußere mitochondriale Membran bestimmt wurden, waren etwa um den Faktor 1,2 höher als die des aromatischen Amidoxims.

Mit Hilfe des rekombinanten Enzymsystems konnte eindeutig die Beteiligung des mARC-abhängigen Dreikomponenten-Enzymsystems an der Reduktion des Benzylamidoxims bestätigt werden, wobei die höchsten Umsetzungsraten nur mit dem kompletten Enzymsystem detektiert werden konnten. Außerdem folgten auch mit dem rekombinanten Enzymsystem beide Reduktionen einer Michaelis-Menten-Kinetik und wiesen ähnliche kinetische Parameter auf. Ein Vergleich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten zeigt, dass Benzylamidoxim mit mARC2 besser umgesetzt wird als Benzamidoxim (Faktor 2,4).

Die ermittelte katalytische Effizienz ist allerdings für beide Substrate in etwa gleich. Danach besitzt mARC1 jeweils eine doppelt so große Affinität zum jeweiligen Substrat wie mARC2.

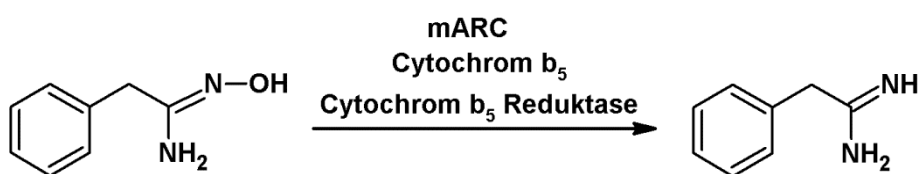


Abb. 2.4.1 *In vitro* Reduktion von Benzylamidoxim zu Benzylamidin durch das mARC-abhängige Enzymsystem

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien lassen vermuten, dass auch aliphatische Amidoxime durch das mARC-abhängige Dreikomponenten-Enzymsystem reduziert werden.

2.5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Reinheit der in dieser Arbeit verwendeten hepatischen Subfraktionen wurde durch Westernblot-Analyse untersucht. Außerdem wurde die *N*-reduktive Aktivität dieser Subfraktionen, sowie die der äußeren mitochondrialen Membran und des gereinigten nativen mARC-Proteins in *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim charakterisiert und mit früheren Untersuchungen verglichen.

Die rekombinant hergestellten Enzymquellen wurden mit biochemischen Methoden charakterisiert und die *N*-reduktive Aktivität durch *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim untersucht.

Die Beteiligung des mARC-haltigen Dreikomponenten-Enzymsystems an der Reduktion zum entsprechenden Amidin konnte zum ersten Mal auch an einem Modellsubstrat für ein aliphatisches Amidoxim in *in vitro* Biotransformationsstudien gezeigt werden. Die dabei erhaltenen Umsetzungsraten waren mit denen des Benzamidoxims vergleichbar, wobei die Reduktion des Benzylamidoxims im Vergleich zum Benzamidoxim durch mARC2 etwas besser ablief.

3. CHARAKTERISIERUNG VON PROKARYOTISCHEN UND EUKARYOTISCHEN N-REDUKTIVEN MOSC-PROTEINEN

3.1. EINLEITUNG

3.1.1. Prokaryotische Molybdoenzyme YcbX und YiiM

In *Escherchia coli* führt das Fehlen eines bestimmten Genabschnitts zu einer erhöhten Hypersensitivität gegenüber den toxischen und mutagenen Effekten von *N*-Hydroxyadenin und anderen *N*-hydroxylierten Basenanaloga (Pavlov *et al.*, 1996). Für diese Hypersensitivität wurde nicht die Abwesenheit eines Reparatur-Systems, welches in dieser Region lokalisiert ist, verantwortlich gemacht, sondern das ebenfalls in dieser Region befindliche *moeA* Gen (Kozmin *et al.*, 2000). Da MoeA an der Biosynthese des Molybdäncofaktors beteiligt ist (Nichols und Rajagopalan, 2002), lag die Vermutung nahe, dass ein Molybdoenzym an der Detoxifizierung von *N*-Hydroxyadenin und anderer Basenanaloga beteiligt ist.

Allerdings führte das Fehlen aller bekannten und hypothetischen *E. coli* Molybdoenzyme zu keiner erhöhten Hypersensitivität gegenüber *N*-Hydroxyadenin (Kozmin *et al.*, 2007). Außerdem war der Schutz vor den Basenanaloga nicht abhängig von MGD (Molybdopterin Guanin-Dinucleotid). Dies stellt die guanylierte Form des MPT (Molybdopterin) dar, welche in der vorherrschenden Familie der meisten Prokaryoten (Dimethylsulfoxid Reduktase (DMSO) Familie) vorliegt (Rajagopalan, 1996). Das führte zu der Annahme, dass weitere bisher unbekannte Molybdoenzyme in *E. coli* existieren, die zur sowohl in Eukaryoten und Prokaryoten vorkommenden Xanthinoxidase-, Sulfitoxidase- oder sogar zu einer neuen Molybdoenzym-Familie gehören und an der Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga beteiligt sind.

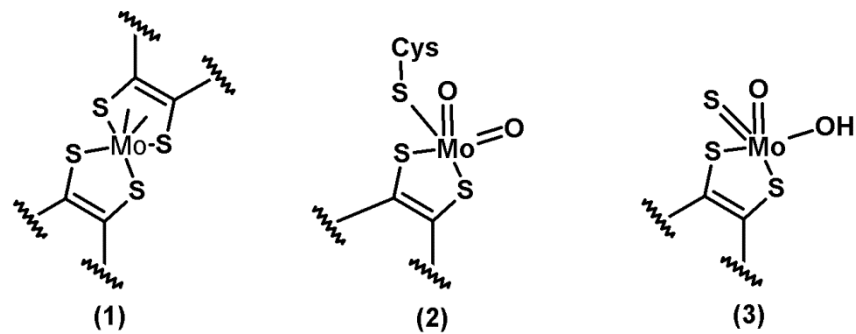


Abb. 3.1.1 Struktur des Molybdäncofaktors

(1) DMSO-Familie; (2) Sulfitoxidase-Familie; (3) Xanthinoxidase-Familie

Als entscheidende Komponente zum Schutz vor *N*-hydroxylierten Basenanaloga wurden von Kozmin *et al.* (2008) vor kurzem zwei neue Molybdoenzyme identifiziert. Dazu wurden durch zufällige Mutagenese verschiedene *E. coli*-Varianten erzeugt. Mittels Spot-Tests, bei denen eine Lösung des mutagenen und toxischen Basenanalogs *N*-Hydroxyadenin in die Mitte der Zellkulturplatte gegeben wird, wurde das Überleben und die Mutagenität der Zellen getestet. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass ein Defekt im *ycbX*-Gen sowohl zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber den toxischen als auch gegenüber den mutagenen Effekten des Basenanalogs führte. Mittels Datenbankanalyse wurde das YcbX-Protein als ein Mitglied der sogenannten neuen MOSC-Domänen-Superfamilie identifiziert (Anantharaman und Aravind, 2002) zu der auch die eukaryotischen mARC-Proteine gehören. YcbX besteht aus einer *N*-terminalen β -Barrel Domäne, einer zentralen MOSC-Domäne, welche als prosthetische Gruppe den Molybdäncofaktor bindet, und einer *C*-terminalen Ferredoxin Domäne. Ferredoxine gehören zu einer weit verbreiteten Klasse von Proteinen, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten und als Elektronenüberträger an einer Vielzahl von biologischen Redoxreaktionen beteiligt sind (Sticht und Rösch, 1998).



Abb. 3.1.2 Domänenstruktur des prokaryotischen YcbX-Proteins

β -Barrel = MOSC-terminale β -Barrel-Domäne; MOSC = MOSC-Domäne (bindet den Molybdäncofaktor); Ferredoxin = Ferredoxin-Domäne (bindet ein $[2Fe-2S]$ -Cluster)

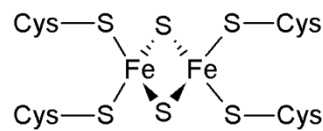


Abb. 3.1.3 Schematische Darstellung eines [2Fe-2S]-Clusters

Durch knock-down-Experimente konnten Kozmin *et al.* (2008) zeigen, dass alle drei Domänen für die Funktion des YcbX-Proteins essentiell sind.

Durch weitere Untersuchungen konnte YiiM als ein zweites MOSC-Protein in *E. coli* identifiziert werden. Das Fehlen dieses Proteins erhöht die Sensitivität gegenüber *N*-Hydroxyadenin zwar nur leicht, allerdings zeigen diese Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber anderen Basenanaloga, wie z.B. 2-Amino-*N*-Hydroxyadenin. YiiM stellt den einfachsten Fall eines MOSC-Proteins dar und besteht nur aus der MOSC-Domäne. Außer dem für die MOSC-Superfamilie typischen konservierten Cystein-Schwefel besitzt YiiM keine Ähnlichkeit zum C-Terminus der Moco-Sulfurase, der namensgebenden Komponente.

Die beiden neuen MOSC-Proteine YcbX und YiiM stellen damit zwei unabhängige Detoxifizierungswege für *N*-hydroxylierte Basenanaloga mit unterschiedlichen Substratspezifitäten dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Detoxifizierung von *N*-Hydroxyadenin durch Reduktion zum Adenin stattfindet (Kozmin *et al.*, 2008). Diese Umsetzung ist damit analog zur Reduktion anderer *N*-hydroxylierter Verbindungen z.B. der Reduktion von Benzamidoxim zum korrespondierenden Amidin durch das eukaryotische mARC-abhängige Enzymsystem.

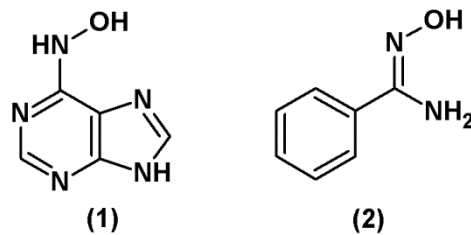


Abb. 3.1.4 Strukturelle Ähnlichkeit zwischen *N*-Hydroxyadenin (1), dem Substrat der prokaryotischen MOSC-Proteine, und dem Modells substrat Benzamidoxim (2) des eukaryotischen mARC-Enzymsystems

3.1.2. Elektronentransportproteine CysJ und Fre

Die prokaryotischen Molybdoenzyme YcbX und YiiM sind nicht allein in der Lage *N*-hydroxylierte Basenanaloga zu detoxifizieren. Sowie die eukaryotischen mARC-Enzyme als Elektronenüberträger die Elektronentransportproteine Cytochrom *b*₅ und Cytochrom *b*₅ Reduktase verwenden, benötigen auch sie Redoxpartner, die die entsprechenden Reduktionsäquivalente für die Reaktion am Molybdoenzym zur Verfügung stellen.

Als spezifischer Partner des YcbX-Molybdoenzym für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten wurde mittels knock-down-Versuchen in *E. coli* CysJ identifiziert (Kozmin *et al.*, 2010).



Abb. 3.1.5 Domänenstruktur des prokaryotischen CysJ-Proteins

Flavodoxin = Flavodoxin-Domäne; *FAD* = FAD-Domäne ; *NADH* = NADH-Domäne

Bei CysJ handelt es sich um eine NADPH-Flavinoreduktase, die aus drei Domänen (Flavodoxin-ähnliche Domäne, FAD-bindende Domäne und NAD(P)H-Domäne) besteht und damit sowohl ein FMN (Flavinmononucleotid) als auch ein FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) als prosthetische Gruppe aufweist.

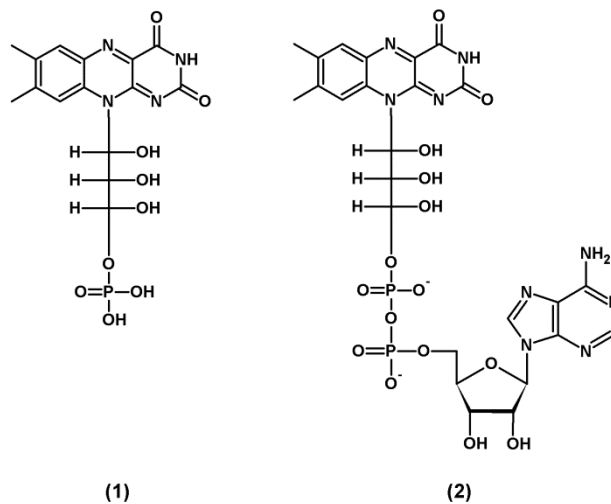


Abb. 3.1.6 Prosthetische Gruppen des prokaryotischen CysJ-Proteins

(1) FMN (*Flavinmononucleotid*); (2) FAD (*Flavin-Adenin-Dinucleotid*)

CysJ stellt einen Teil der Sulfit-Reduktase bestehend aus CysJ und CysI dar. Diese reduziert Sulfit zu Sulfid, welches als Schwefel-Donor für L-Cystein fungiert (Ostrowski *et al.*, 1989). Die Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga ist dabei unabhängig von CysI und der Sulfitreduktaseaktivität. Eine Beteiligung von CysJ an der Detoxifizierung durch das Molybdoenzym YiiM konnte nicht nachgewiesen werden.

Als möglicher Elektronendonator für das YiiM-Molybdoenzym wird die Beteiligung der Flavinreduktase Fre diskutiert (Kozmin *et al.*, 2010). Dabei handelt es sich um eine einzelne Polypeptidkette, die im Gegensatz zu CysJ keine gebundenen Flavine aufweist.

Fre ist durch die Reduktion von freien Flavinen an der Generierung des Tyrosyl-Radikals der Ribonucleotidreduktase (RNR) beteiligt (Spyrou *et al.*, 1991). Die RNR ist ein Schlüsselenzym in allen lebenden Zellen, da es Nucleotide zu den entsprechenden Desoxy-Verbindungen reduziert und damit eine wichtige Rolle in der DNA-Synthese spielt (Reichard, 1988). Fre-Mangelmutanten wachsen zwar ein wenig schlechter als die Wildtypen, sind aber trotzdem überlebensfähig, da die Generierung des Tyrosyl-Radikals auch durch eine Sulfit-Reduktase, die zusätzlich

eine Flavin-Reduktase-Aktivität besitzt, stattfinden kann (Covès *et al.*, 1993). Allerdings weist die Fre-Mutante eine leichte Sensitivität gegenüber *N*-Hydroxyadenin auf, die ähnlich zu der der YiiM-Mutante ist. Dies lässt vermuten, dass beide Enzyme am gleichen Detoxifizierungsweg beteiligt sind (Kozmin *et al.*, 2010).

3.1.3. Thema und Zielsetzung

In dieser Arbeit standen die prokaryotischen MOSC-Proteine YcbX und YiiM sowie deren Redoxpartner CysJ und Fre zum ersten Mal rekombinant zur Verfügung.

Zur Charakterisierung der prokaryotischen Molybdoenzyme YcbX und YiiM sollten der Molybdäengehalt bestimmt und in *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim die *N*-reduktiven Aktivitäten der Molybdoenzyme mit ihren entsprechenden Redoxpartnern untersucht werden.

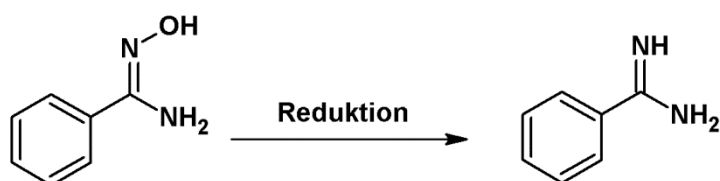


Abb. 3.1.7 Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim zum Benzamidin

Dabei wurde auch eine Variante der entsprechenden prokaryotischen YcbX- und YiiM-Proteine untersucht, bei der das für die MOSC-Proteine typische hochkonservierte Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde. Diese Varianten sollten dazu dienen, das Cystein als möglichen Liganden des Molybdäns zu identifizieren, wie es bei der Sulfitoxidase-Familie der Fall ist, um YcbX und YiiM eventuell einer der bekannten Molybdoenzym-Familien zuordnen zu können. Dazu wurden neben den MOSC-Varianten der prokaryotischen Proteine YcbX und YiiM auch die entsprechenden Varianten der eukaryotischen mARC-Proteine, bei denen ebenfalls das für die MOSC-Proteine typische hochkonservierte Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde, untersucht.

Neben diesen MOSC-Varianten wurden auch YcbX-Varianten getestet, bei denen an der [2Fe-2S]-Cluster-Bindung beteiligte Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden. Damit sollte der Einfluss des [2Fe-2S]-Clusters auf den Einbau des Molybdäncofaktors und die N-reduktive Aktivität untersucht werden.

Auch die Elektronentransportproteine CysJ und Fre wurden hinsichtlich ihrer prosthetischen Gruppen charakterisiert. Dabei wurde die Art (FMN oder FAD) und die Menge der gebundenen Flavine bestimmt.

Während bei den anderen eukaryotischen Molybdoenzymen (Aldehydoxidase, Xanthinoxidoreduktase, Sulfitoxidase) alle für den Elektronentransport nötigen prosthetischen Gruppen auf einer Polypeptidkette lokalisiert sind, stellt das eukaryotische mARC-Protein nur einen Teil eines Dreikomponenten-Enzymsystems dar (Havemeyer *et al.*, 2006). Daher ist es eventuell denkbar, dass die Elektronentransportkette nicht immer vom NADH über FAD und Häm zum Molybdäncofaktor abläuft. In Hinblick darauf sollte anhand der neuen prokaryotischen Redoxproteine CysJ und Fre untersucht werden, ob auch andere prosthetische Gruppen als Elektronenüberträger für das eukaryotische mARC-Protein in Frage kommen.

3.2. METHODEN

3.2.1. Materialien und Geräte

Sofern nicht anders angegeben, befindet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 7 dieser Arbeit.

3.2.2. Rekombinante Enzymquellen

3.2.2.1. MOSC-Proteine

Die rekombinanten prokaryotischen MOSC-Proteine YcbX und YiiM wurden vom Arbeitskreis Mendel (Technische Universität Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte analog der rekombinanten eukaryotischen mARC-Enzyme mit leichten Modifikationen (Reichmann, Dissertation in Vorbereitung). Es wurde der Expressionsvektor pQE80 der Firma Qiagen verwendet und die Proteine mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen. Die Expression des prokaryotischen YcbX (YP_001729925) und des prokaryotischen YiiM (ACB04923) erfolgte im *E. coli*-Stamm TP1000 und im *E. coli*-Stamm RK5204, wobei letzterer eine Expression der MPT/Moco-freien Variante der Proteine ermöglicht (Rivers *et al.*, 1993).

Außerdem wurde jeweils eine Variante der entsprechenden prokaryotischen Proteine zur Verfügung gestellt, bei der das für die MOSC-Proteine typische hochkonservierte Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde. Dabei handelt es sich beim YcbX um die MOSC-Variante C207S und beim YiiM um die MOSC-Variante C120S. Beide Varianten sollten dazu dienen, das Cystein als möglichen Liganden des Molybdäns zu identifizieren, um YcbX und YiiM eventuell einer der bekannten Molybdoenzym-Familien zuordnen zu können.

Außerdem wurden jeweils die dazu entsprechenden Varianten der humanen mARC Proteine zur Verfügung gestellt, bei der ebenso die hochkonservierte im Moco-

bindenden Motiv befindliche Aminosäure Cystein gegen Serin ausgetauscht wurde um die Familienzugehörigkeit der mARC-Proteine zu untersuchen. Dabei handelt es sich um die hmARC1-Variante C273S und die hmARC2-Variante C272S.

Neben diesen MOSC-Varianten wurden auch YcbX-Varianten getestet, bei denen an der [2Fe-2S]-Cluster-Bindung beteiligte Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden. Dabei handelt es sich um die Eisen-Schwefel-Varianten C328S und C331S jeweils aus den *E. coli*-Stämmen TP1000 (besitzen kein [2Fe-2S]-Cluster aber Moco) und RK5204 (besitzen keine Cofaktoren).

3.2.2.2. Elektronentransportproteine

Die prokaryotischen Elektronentransportproteine CysJ und Fre wurden ebenfalls rekombinant vom Arbeitskreis Mendel (Technische Universität Braunschweig) hergestellt. Die Klonierung, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte analog der rekombinanten eukaryotischen Elektronentransportproteine mit leichten Modifikationen (Reichmann, Dissertation in Vorbereitung). Es wurde der Expressionsvektor pQE80 der Firma Qiagen verwendet und die Proteine mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm DL41. Es wurde das prokaryotische CysJ (YP_001731658) und das prokaryotische Fre (ACB04864) verwendet.

3.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen

3.2.3.1. Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung der Proteingehälter der rekombinanten prokaryotischen MOSC- und Elektronentransportproteine wurde mit der BCA-Methode nach Smith *et al.* (1985), wie bereits in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, durchgeführt.

3.2.3.2. Molybdän-Bestimmung mittels ICP-MS

Der Molybdän-Gehalt der prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Proteine YcbX, YiiM und mARC sowie deren Varianten wurde mittels ICP-MS bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.5). Allerdings wurde diesmal auf das Umpuffern der Proteine verzichtet und diese nur mit Lagerpuffer (25 mM KH_2PO_4 , 25 mM K_2HPO_4 , 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, 20% (w/v) Glycerol, pH 7,4) auf einen Proteingehalt von etwa 0,5 mg/ml verdünnt. Zur Berechnung der Saturierung der Proteine wurde das Molekulargewicht (mARC 34 kDa, YcbX 41 kDa, YiiM 26 kDa) herangezogen und von einer Cofaktor-Konzentration von einem Mol Molybdän pro Mol Protein ausgegangen.

3.2.3.3. Flavin-Bestimmung

Die Bestimmung des Flavin-Gehalts der prokaryotischen und eukaryotischen Reduktasen erfolgte durch die Messung der Fluoreszenz. Dazu wurde das Protein zuerst 1:10 verdünnt und für 10 Minuten bei 100°C erhitzt, um die Flavine aus dem Protein zu extrahieren. Nach dem Erkalten wurden die Proben für 10 Minuten bei 22 000g zentrifugiert und der ungefähre Gesamtflavin-Gehalt des resultierenden Überstandes mittels der photometrischen Bestimmung ermittelt (siehe Kapitel 2.2.3.7).

Danach wurde der Überstand auf einen Flavin-Gehalt von ungefähr 1,5 μM Flavin verdünnt und 200 μl der Probe auf eine 96-Well Platte (OptiPlate-96, Perkin Elmer, Rodgau) überführt. Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurde das Perkin Elmer precisely LS55 Fluorescence Spectrometer (Perkin Elmer, Rodgau) mit einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm verwendet, wobei die Splitbreiten jeweils 2,5 mm betragen.

Zur Berechnung der Flavin-Konzentration wurde eine Kalibriergerade mit bekannten Konzentrationen an FMN (0,15-2 μM) und außerdem zur Kontrolle eine 1,5 μM FAD-Lösung verwendet.

Die Fluoreszenz der Proben-, Kalibrier- und Kontrolllösungen wurde gemessen. Danach wurden zu den Proben und der FAD-Kontrolle 2 μ l einer PDE (Phosphodiesterase)-Lösung (3 mU/ μ l) gegeben und nach 2 Minuten erneut die Fluoreszenz gemessen. Aus der Zunahme der Fluoreszenz nach PDE-Behandlung kann das Verhältnis von FMN zu FAD berechnet werden (Aliverti *et al.*, 1999).

Zur Berechnung der Saturierung der Proteine wurde das Molekulargewicht (Cytochrom b_5 Reduktase 33 kDa, *A.t.* Cytochrom b_5 Reduktase 29 kDa, Fre 29 kDa) herangezogen und von einer Cofaktor-Konzentration von einem Mol Flavin pro Mol Protein ausgegangen. Bei CysJ wurde das Molekulargewicht des Octamers von 488 kDa herangezogen und von einer Cofaktor-Konzentration von 1,6 Mol Flavin pro Mol Untereinheit ausgegangen (Ostrowski *et al.*, 1989; Eschenbrenner *et al.*, 1995).

3.2.4. Charakterisierung der *in vitro* Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim

Zur Charakterisierung der prokaryotischen rekombinanten Molybdoenzyme YcbX und YiiM wurden *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim durchgeführt.

Die Inkubationsansätze mit dem YcbX-abhängigen Enzymsystem waren wie folgt zusammengesetzt: 20 μ g YcbX, 5 μ g CysJ und 1 mM NADPH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat Benzamidoxim wurde in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Zur Bestimmung der optimalen Inkubationsbedingungen wurden die Puffersubstanz und -konzentration sowie der pH-Wert variiert. Zur Charakterisierung der Reduktion wurden nacheinander die einzelnen Komponenten des Inkubationsansatzes durch äquivalente Mengen an Puffer ersetzt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt, dazu wurde die Substratkonzentration von 0,1 bis 8 mM variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot.

Die Inkubationsansätze mit dem YiiM-abhängigen Enzymsystem waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YiiM, 5 µg Fre, 0,5 mM FAD und 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat Benzamidoxim wurde in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Zur Charakterisierung der Reduktion wurden nacheinander die einzelnen Komponenten des Inkubationsansatzes durch äquivalente Mengen an Puffer ersetzt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt, dazu wurde die Substratkonzentration von 0,1 bis 8 mM variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot.

Die Inkubationen wurden in einem 37°C Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen betrug 150 µl in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen. Nach 3-minütiger Vorinkubation des Substrats mit der jeweiligen Enzymquelle wurde die Reaktion durch Zugabe des jeweiligen Cosubstrats gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt und anschließend das präzipitierte Protein bei 22 000g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach der von Clement *et al.* (2005) beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

3.2.5. Untersuchungen zum Einfluss der Elektronentransportproteine

Die Inkubationsansätze zur Ermittlung der Substituierbarkeit der Elektronentransportproteine waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YcbX oder 20 µg YiiM oder 10 µg mARC1, 5 µg CysJ mit 1 mM NADPH oder 5 µg Fre mit 0,5 mM FAD und 1 mM NADH oder 76,2 pmol Cytochrom b_5 und 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase mit 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Das Substrat Benzamidoxim wurde in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die Durchführung erfolgte wie unter Kapitel 3.2.4 beschrieben.

3.2.6. Untersuchungen zu prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Varianten

Zum Vergleich von prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Varianten und dem jeweiligen Wildtyp wurden *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modells substrat Benzamidoxim durchgeführt.

Die Inkubationsansätze mit YcbX waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YcbX (Wildtyp oder C207S-Variante) und 5 µg CysJ mit 1 mM NADPH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0).

Die Inkubationsansätze mit YiiM waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YiiM (Wildtyp oder C120S-Variante) und 5 µg Fre mit 0,5 mM FAD und 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0).

Die Inkubationsansätze mit mARC waren wie folgt zusammengesetzt: 10 µg mARC (Wildtyp oder C273S (mARC1) bzw. C272S (mARC2)) und 76,2 pmol Cytochrom b_5 und 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase mit 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0).

Das Substrat Benzamidoxim wurde in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die Durchführung erfolgte wie unter Kapitel 3.2.4 beschrieben.

3.3. ERGEBNISSE

3.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen

3.3.1.1. Bestimmung des Molybdän-Gehalts

Der Molybdän-Gehalt der rekombinanten prokaryotischen YcbX- und YiiM-Proteine und deren Varianten wurde mittels ICP-MS-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3.1 dargestellt.

Tab. 3.3.1 Molybdän-Gehälter der prokaryotischen (YcbX/YiiM) und der eukaryotischen (mARC1/mARC2) MOSC-Proteine und deren Varianten

YcbX	Variante und (<i>E. coli</i>-Stamm)	Molybdän-Gehalt (nmol Mo/mg Protein)	Saturierung (%)
Wildtyp	Wildtyp (TP1000)	7,1 ± 0,3	29
ohne Moco	Wildtyp (RK5204)	0,1 ± 0,0	-
[Fe-S]-Variante 1 (mit Moco)	C328S (TP1000)	19,1 ± 0,0	78
[Fe-S]-Variante 2 (mit Moco)	C331S (TP1000)	14,8 ± 0,2	61
[Fe-S]-Variante 1 (ohne Moco)	C328S (RK5204)	ND	-
[Fe-S]-Variante 2 (ohne Moco)	C331S (RK5204)	ND	-
MOSC-Variante	C207S (TP1000)	5,2 ± 0,1	21
YiiM			
Wildtyp	Wildtyp (TP1000)	7,3 ± 0,3	19
ohne Moco	Wildtyp (RK5204)	0,1 ± 0,0	-
MOSC-Variante	C120S (TP1000)	6,8 ± 0,1	18
mARC1/mARC2			
Wildtyp mARC1	Wildtyp (TP1000)	8,3 ± 0,4	28
Wildtyp mARC2	Wildtyp (TP1000)	9,4 ± 0,1	32
MOSC-Variante mARC1	C273S (TP1000)	17,1 ± 0,5	58
MOSC-Variante mARC2	C272S (TP1000)	7,5 ± 0,0	26

Wie erwartet konnte bei den Proteinen aus dem *E. coli* RK5204-Stamm kein oder nur sehr geringfügige Mengen Molybdän detektiert werden, da dieser Stamm eine MPT- und Moco-freie Variante der Proteine erzeugt (Rivers *et al.*, 1993).

Auffällig ist, dass die [Fe-S]-Varianten des YcbX, bei denen an der [Fe-S]-Cluster-Bindung beteiligte Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden, einen höheren Molybdängehalt aufwiesen als das Wildtyp-Protein. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die [Fe-S]-Cluster nicht zwingend für die korrekte Faltung und den Einbau des Molybdäncofaktors erforderlich sind.

Der Molybdän-Gehalt bei den prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Varianten, bei der das für diese neue Domänen-Superfamilie typische hochkonservierte Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde, entsprach in etwa dem des entsprechenden Wildtyps.

3.3.1.2. Bestimmung des Flavins-Gehalts

In diesem Fall sollte der Flavins-Gehalt nicht, wie in Kapitel 2.3.1.4 beschrieben photometrisch, sondern fluorimetrisch bestimmt werden um die Flavine FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) und FMN (Flavinmononucleotid) nebeneinander bestimmen zu können. FAD wird durch die Phosphodiesterase (PDE) in FMN und AMP gespalten. Die Reaktion kann anhand der Fluoreszenzzunahme verfolgt werden, da FMN eine 10x höhere Fluoreszenz als FAD besitzt. Das heißt, wenn nur FAD vorhanden wäre, würde die Fluoreszenz nach Zugabe von PDE um das Zehnfache steigen und der Faktor FMN zu FAD würde 10 betragen. Liegt nur FMN vor, beträgt der Faktor 1. Kommerziell erhältliches FAD besitzt einen Faktor von ungefähr 5 (Aliverti *et al.*, 1999). Dies konnte hier mit einem Faktor von $7,3 \pm 1,4$ annähernd bestätigt werden.

Die Kalibriergerade von FMN war im Konzentrationsbereich von 0,15-2 μM linear ($R^2 = 0,9979$). Die Richtigkeit für den ermittelten Konzentrationsbereich (0,15-2 μM) betrug $101 \pm 5\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (0,15 μM) die Richtigkeit einen Wert von 95% aufwies.

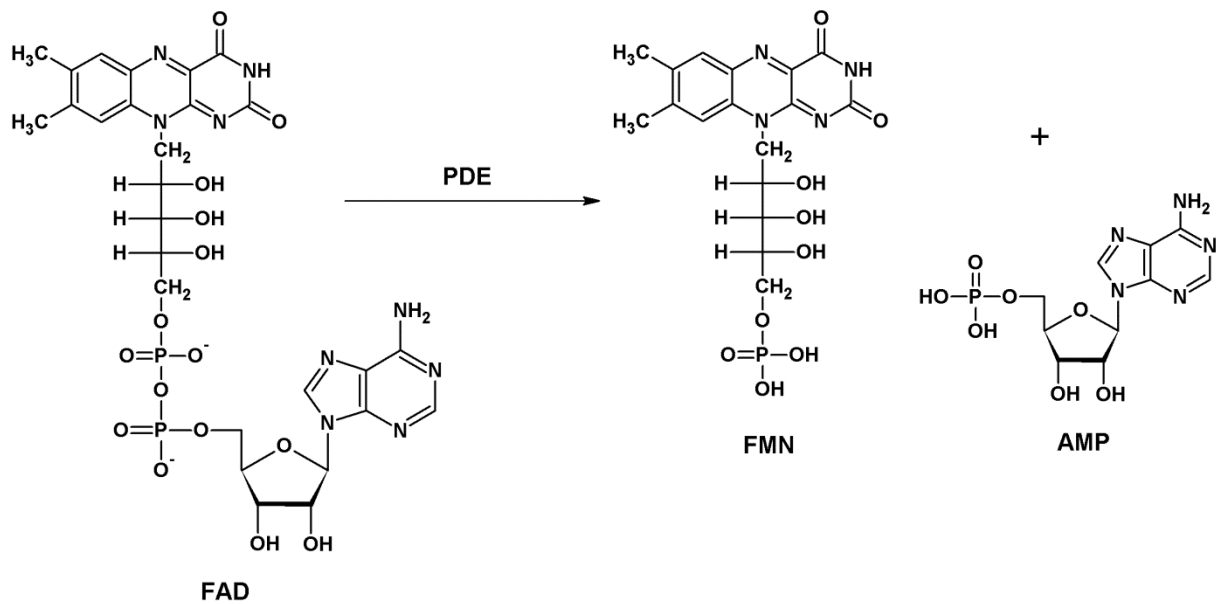


Abb. 3.3.1 Umsetzung von FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) durch PDE (Phosphodiesterase) in FMN (Flavinmononucleotid) und AMP

An dem prokaryotischen Enzym CysJ konnte gebundenes Flavin nachgewiesen werden. CysJ wies eine Saturierung von ungefähr 30% mit einem Faktor von 1,3 auf, was auf mehr FMN als FAD am Protein schließen lässt.

Am prokaryotischen Enzym Fre konnten nur geringe Mengen gebundenes Flavin nachgewiesen werden. Der Faktor von 2,2 bedeutet, dass etwa gleiche Mengen an FMN und FAD gebunden sind.

Die eukaryotischen Cytochrom b_5 Reduktasen wiesen die höchste Flavinkonzentration auf. Sowohl an der humanen als auch an der pflanzlichen Cytochrom b_5 Reduktase konnte Flavin als Cofaktor in erheblichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die berechnete Saturierung betrug, wie schon in Kapitel 2.3.1.4 gezeigt, nahezu 100%. Der Faktor von 1,3 bei der humanen Cytochrom b_5 Reduktase zeigt allerdings, dass hauptsächlich FMN am Protein gebunden vorliegt. Die pflanzliche Cytochrom b_5 Reduktase wies einen Faktor von 3,5 auf, was bedeutet, dass mehr FAD als FMN am Protein gebunden vorliegt.

Tab. 3.3.2 Flavin-Gehälter der prokaryotischen und eukaryotischen Reduktasen

Reduktase	Flavin-Gehalt (nmol Flavin/mg Protein)	Saturierung (%)	Faktor
CysJ	6,0 ± 0,1	23	1,4
Fre	2,2 ± 0,1	6	2,7
<i>H.s.</i> Cytochrom b ₅ Reduktase	29,5 ± 0,3	97	1,3
<i>A.t.</i> Cytochrom b ₅ Reduktase	30,6 ± 0,1	88	3,5

Der Faktor stellt den Quotienten aus der Fluoreszenz nach PDE Zugabe dividiert durch die Fluoreszenz vor PDE Zugabe dar.

3.3.2. Charakterisierung der *in vitro* Reduktion des Benzamidoxims durch YcbX

3.3.2.1. Einfluss des pH-Werts

Um die optimalen Inkubationsbedingungen für die Reduktion von Benzamidoxim durch das prokaryotische YcbX zu schaffen, wurde zuerst das pH-Optimum für dieses System ermittelt. Dazu wurde mit einem Mehrkomponentenpuffer bestehend aus Essigsäure, MES und TRIS gearbeitet, der über einen weiten pH-Bereich über eine gleichbleibende Ionenstärke verfügt (Ellis und Morrison, 1982). Wie aus Abb. 3.3.2 hervorgeht, liegt das pH-Optimum der Reduktion von Benzamidoxim durch das prokaryotische YcbX ähnlich wie bei dem eukaryotischen mARC-Enzymsystem im leicht sauren Milieu zwischen pH 6,0-6,5.

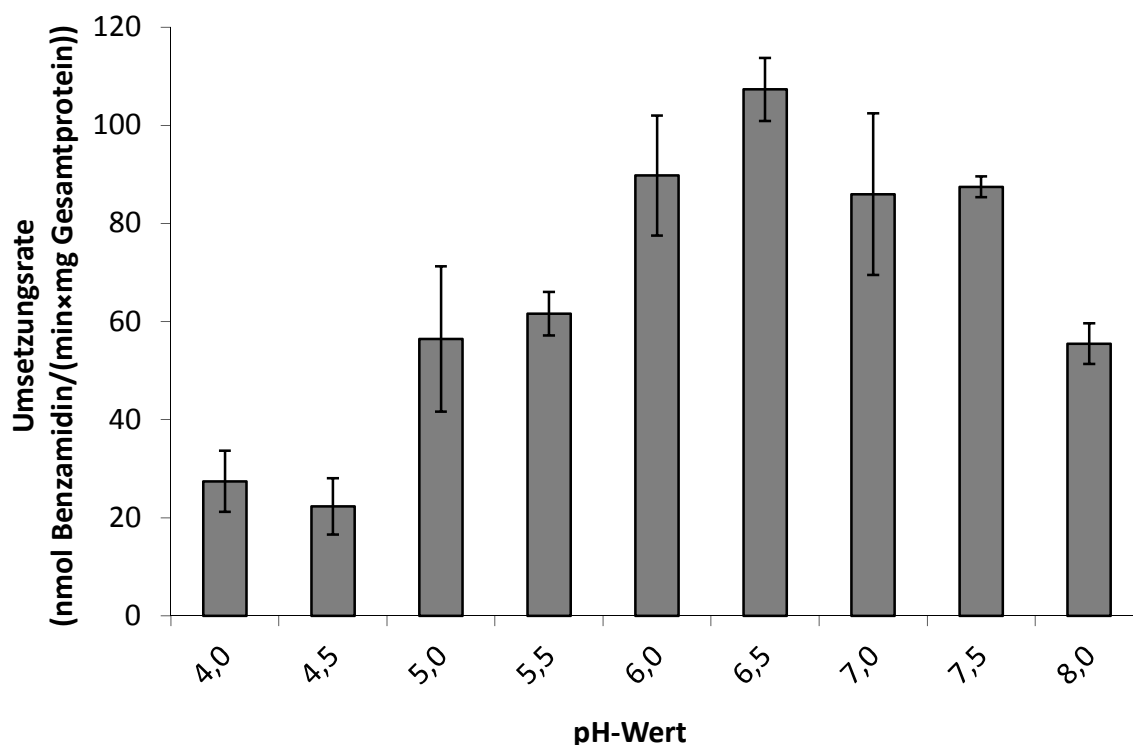


Abb. 3.3.2 Einfluss des pH-Werts auf die Reduktion von Benzamidoxim durch das rekombinante YcbX

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 μg YcbX, 5 μg CysJ, 1 mM NADPH, 3 mM Benzamidoxim in Mehrkomponentenpuffer (pH 4,0-8,0) (Endvolumen 150 μl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.2.2. Einfluss der Puffersubstanz und -konzentration

Da die Puffersubstanz und -konzentration einen starken Einfluss auf die Enzymaktivität haben kann, wurde die Umsetzungsrate von Benzamidoxim durch YcbX in Phosphat- und MES-Puffer bei pH 6,5 bestimmt. Es wurden jeweils fünf verschiedene Konzentrationen von 10-500 mM getestet.

Im Gegensatz zum rekombinanten mARC-abhängigen Enzymsystem, welches in 20 mM MES-Puffer die höchsten Umsetzungsraten zeigt, läuft die Umsetzung von Benzamidoxim durch das rekombinante YcbX bevorzugt in Phosphatpuffer ab. Die höchsten Umsetzungsraten konnten dabei bei einer Konzentration von 100 mM Phosphatpuffer detektiert werden (Abb. 3.3.3).

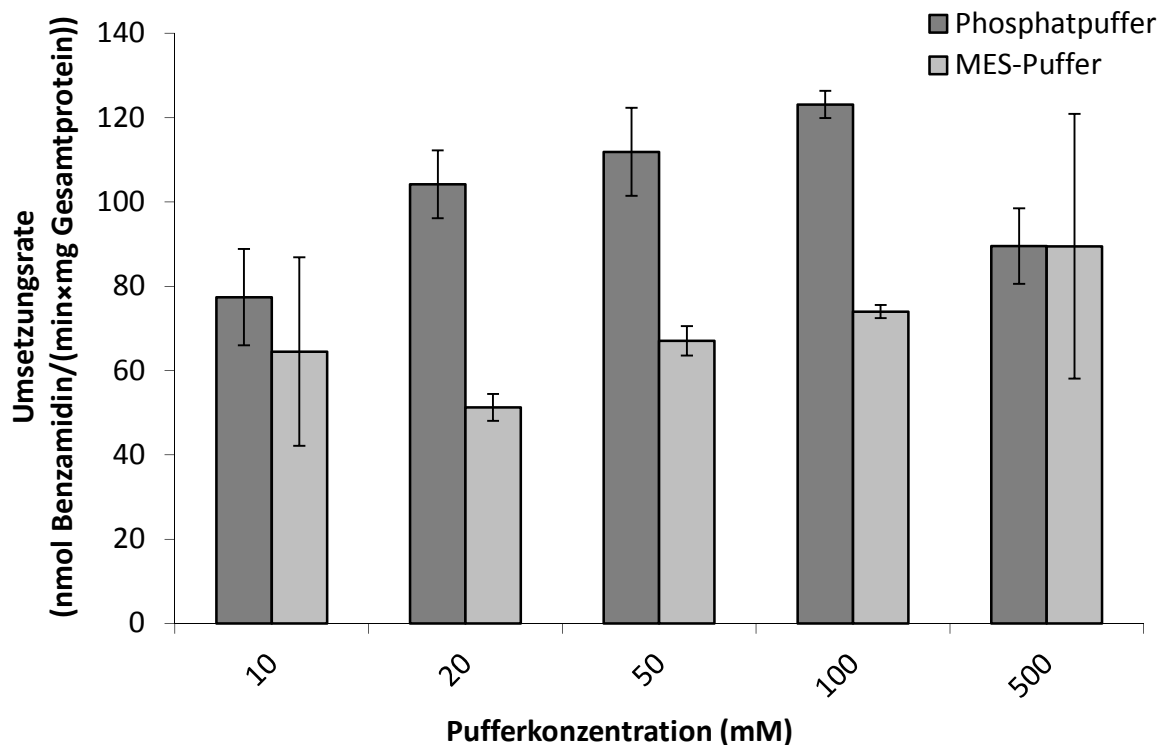


Abb. 3.3.3 Einfluss der Puffersubstanz und -konzentration auf die Reduktion von Benzamidoxim durch das rekombinante YcbX

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YcbX, 5 µg CysJ, 1 mM NADPH, 3 mM Benzamidoxim in 10-500 mM Phosphat-Puffer oder MES-Puffer (pH 6,5) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.2.3. Charakterisierung der Reduktion

Zur Bestimmung der Umsetzungsraten und Charakterisierung der Reduktion von Benzamidoxim wurden Inkubationen mit dem rekombinanten prokaryotischen Enzymsystem, bestehend aus YcbX und CysJ, und unter Austausch einzelner Komponenten durch äquivalente Mengen an Puffer durchgeführt.

Wie man Tab. 3.3.3 entnehmen kann, konnte eine Reduktion zum Benzamidin nur mit dem kompletten Reaktionsansatz detektiert werden. Das Fehlen einer Komponente führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Die Reaktion ist abhängig vom Cofaktor NADPH. Mit NADH als Cofaktor konnten nur etwa 2% der Aktivität erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.3.3 Umsetzung von Benzamidoxim durch rekombinantes YcbX

Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol Benzamidin/(min×mg Gesamtprotein))
komplett	133,2 ± 20,0
- NADPH	ND
- YcbX	ND
- CysJ	ND
- Substrat	ND

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YcbX, 5 µg CysJ, 1 mM NADPH, 3 mM Benzamidoxim in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,4 nmol Benzamidin/(min×mg Protein). Umsetzungsrate, die nicht detektiert werden bzw. unterhalb dieser Bestimmungsgrenze liegen, konnten nicht quantifiziert werden (ND).

Außerdem ist die Umsetzung sowohl abhängig vom Vorhandensein des Molybdän-cofaktors als auch des [Fe-S]-Clusters, da weder die YcbX-Variante aus dem *E. coli*-Stamm RK5204 noch die beiden YcbX-Varianten, bei denen die Aminosäure Cystein im [Fe-S]-bindenden Motiv durch Serin ersetzt ist, Umsetzungen zeigten (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.4. Bestimmung der kinetischen Parameter

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Reduktion von Benzamidoxim durch das rekombinante prokaryotische YcbX-haltige Enzymsystem wurde der Einfluss der Substratkonzentration getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Benzamidoxim durch YcbX zu Benzamidin reduziert wird. Die Reaktion folgte wie beim mARC-haltigen Enzymsystem einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.3.4) mit einem K_m -Wert von $0,23 \pm 0,05$ mM und einem v_{max} -Wert von $131,9 \pm 6,0$ nmol Benzamidin/(min×mg Protein).

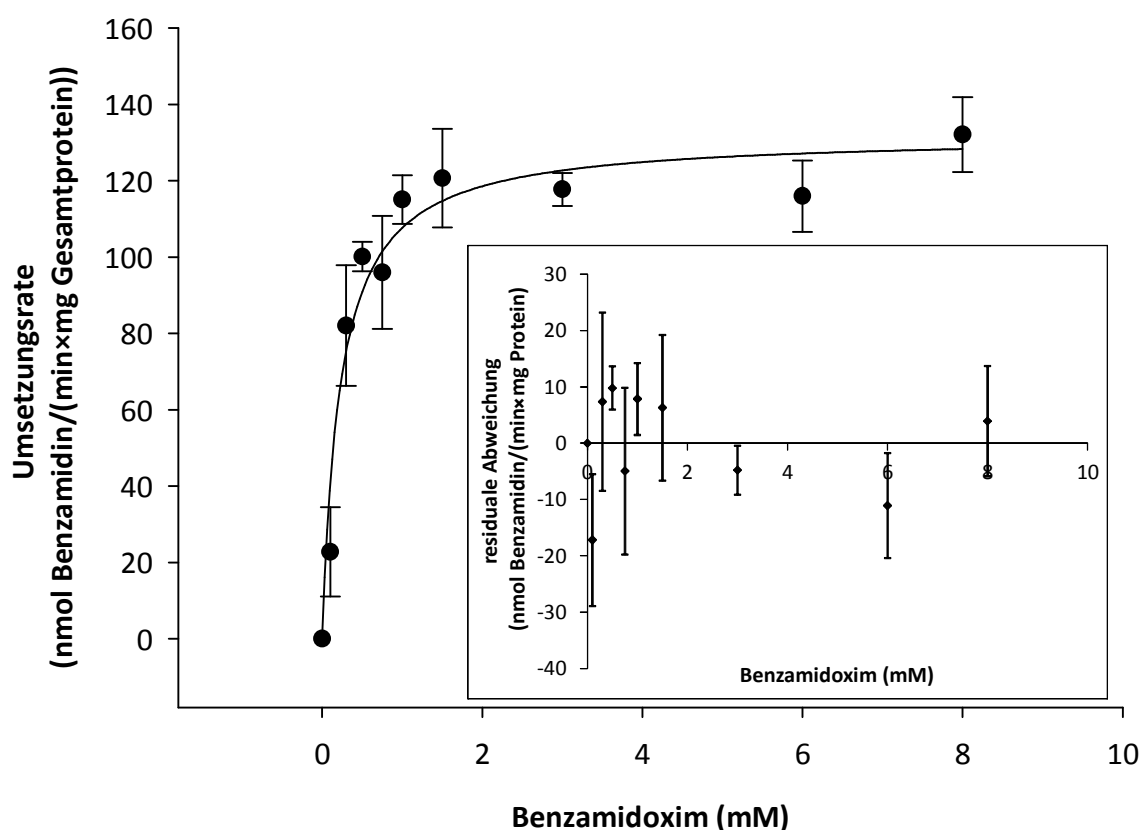


Abb. 3.3.4 Michaelis-Menten-Kinetik von Benzamidoxim mit rekombinatem YcbX

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 μ g YcbX, 5 μ g CysJ, 1 mM NADPH, 0,1-8 mM Benzamidoxim in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.3. Charakterisierung der *in vitro* Reduktion des Benzamidoxims durch YiiM

3.3.3.1. Charakterisierung der Reduktion

Zur Bestimmung der Umsetzungsraten und Charakterisierung der Reduktion von Benzamidoxim wurden Inkubationen mit dem rekombinanten prokaryotischen Enzymsystem, bestehend aus YiiM und Fre, und unter Austausch einzelner Komponenten durch äquivalente Mengen an Puffer durchgeführt.

Tab. 3.3.4 Umsetzung von Benzamidoxim durch rekombinantes YiiM

Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol Benzamidin/(min×mg Gesamtprotein))
komplett	162,4 ± 15,7
- FAD	10,2 ± 0,8
- NADH	4,4 ± 0,5
- YiiM	29,3 ± 5,0
- Fre	7,0 ± 2,2
- YiiM/-FAD	ND
- Fre/-FAD	ND
- Substrat	ND

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YiiM, 5 µg Fre mit 0,5 mM FAD und 1 mM NADH, 3 mM Benzamidoxim in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,4 nmol Benzamidin/(min×mg Protein). Umsetzungsrate, die nicht detektiert werden bzw. unterhalb dieser Bestimmungsgrenze liegen, konnten nicht quantifiziert werden (ND).

Wie man Tab. 3.3.4 entnehmen kann, konnten die höchsten Umsetzungsrate zum Benzamidin nur mit dem kompletten Reaktionsansatz detektiert werden. Das Fehlen von einer oder zwei Komponenten führte zu einer rapiden Erniedrigung oder sogar zum Verlust der Aktivität. Ohne YiiM im Inkubationsansatz konnten nur noch < 20% der Aktivität des Komplettansatzes erreicht werden. Die Reaktion ist abhängig von

den Cofaktoren FAD und NADH. Mit NADPH als Cofaktor konnte nur 15% der Aktivität erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.3.2. Bestimmung der kinetischen Parameter

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Reduktion von Benzamidoxim durch das rekombinante prokaryotische YiiM-haltige Enzymsystem wurde der Einfluss der Substratkonzentration getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Benzamidoxim durch YiiM zu Benzamidin reduziert wird. Die Reaktion folgte wie beim mARC-haltigen Enzymsystem einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.3.5) mit einem K_m -Wert von $0,64 \pm 0,12$ mM und einem v_{max} -Wert von $131,5 \pm 7,1$ nmol Benzamidin/(min×mg Protein).

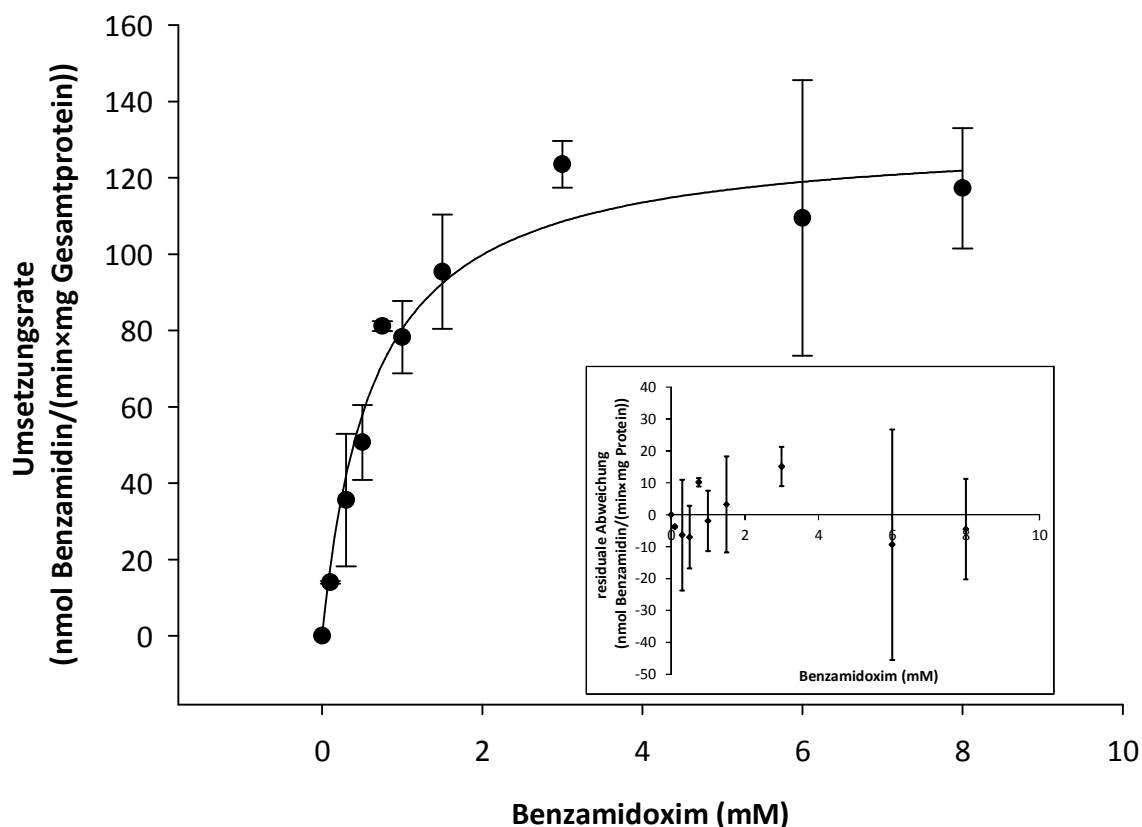


Abb. 3.3.5 Michaelis-Menten-Kinetik von Benzamidoxim mit rekombinatem YiiM

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YiiM, 5 µg Fre mit 0,5 mM FAD und 1 mM NADH, 0,1-8 mM Benzamidoxim in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.4. Austauschbarkeit der Elektronentransportproteine

Um die Substituierbarkeit der Elektronentransportproteine untereinander zu vergleichen und damit eventuell einen Hinweis auf ein alternatives Elektronentransportprotein für die einzelnen MOSC-Proteine zu erhalten, wurde das Modellsubstrat Benzamidoxim mit den jeweiligen MOSC-Proteinen unter Austausch ihrer Elektronentransportproteine inkubiert.

Wie man der Abb. 3.3.6 entnehmen kann, zeigen alle MOSC-Proteine mit ihrem dazugehörigen Elektronentransportprotein, wie schon zuvor gezeigt, eine N-reduktive Aktivität.

Während beim YiiM nur mit der Flavin-Reduktase Fre eine Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin detektiert werden konnte, findet die Umsetzung bei den MOSC-Homologen YcbX und mARC auch mit anderen Elektronentransportproteinen statt.

YcbX zeigt auch mit Fre als Elektronenüberträger sowie mit dem humanen Cytochrom b₅ und dessen Reduktase eine N-reduktive Aktivität.

Auch das eukaryotische mARC-Enzym setzt das Modellsubstrat Benzamidoxim mit den prokaryotischen Enzymen CysJ und Fre als Elektronenüberträger um.

Allerdings können keine Aussagen über die Höhe der Umsetzungsrate gemacht werden, da hier mit den entsprechenden Elektronentransportproteinen keine Optimierung der Stöchiometrie stattgefunden hat. Daher sind die Ansätze nicht vergleichbar und erlauben nur eine qualitative Aussage.

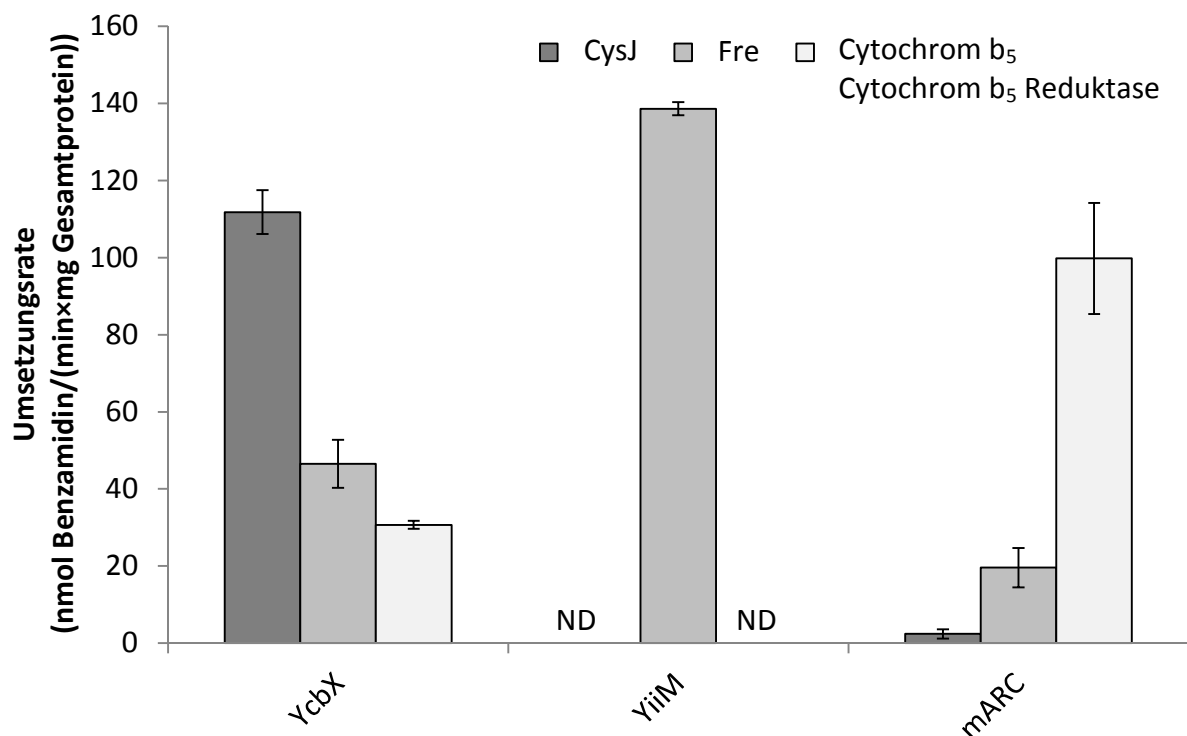


Abb. 3.3.6 Einfluss des Elektronentransportproteins auf die Reduktion von Benzamidoxim

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 μg YcbX oder 20 μg YiiM oder 10 μg mARC1, 5 μg CysJ mit 1 mM NADPH oder 5 μg Fre mit 0,5 mM FAD und 1 mM NADH oder 76,2 pmol Cytochrom b₅ und 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase mit 1 mM NADH, 3 mM Benzamidoxim in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.5. Untersuchungen zu prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Varianten

Um Aussagen zur Familienzugehörigkeit des Molybdäncofaktors der prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Proteine treffen zu können, wurde die *N*-reduktive Aktivität verschiedener MOSC-Varianten getestet. Dazu wurde das MOSC-typische hochkonservierte Cystein durch die ähnliche Aminosäure Serin ersetzt, wodurch beim YcbX die Variante C207S, beim YiiM die Variante C120S, bei mARC1 die Variante C273S und bei mARC2 die Variante C272S entsteht.

Die Abb. 3.3.7 zeigt, dass die MOSC-Varianten von YcbX, mARC1 und mARC2 im Gegensatz zum jeweiligen Wildtyp keine Aktivität aufweisen. Die MOSC-Variante von YiiM besitzt zwar noch 10% der Aktivität des Wildtyps. Dies liegt allerdings noch unter der Umsatzrate, die ohne YiiM im Inkubationsansatz erzielt wird (siehe Tab. 3.3.4).

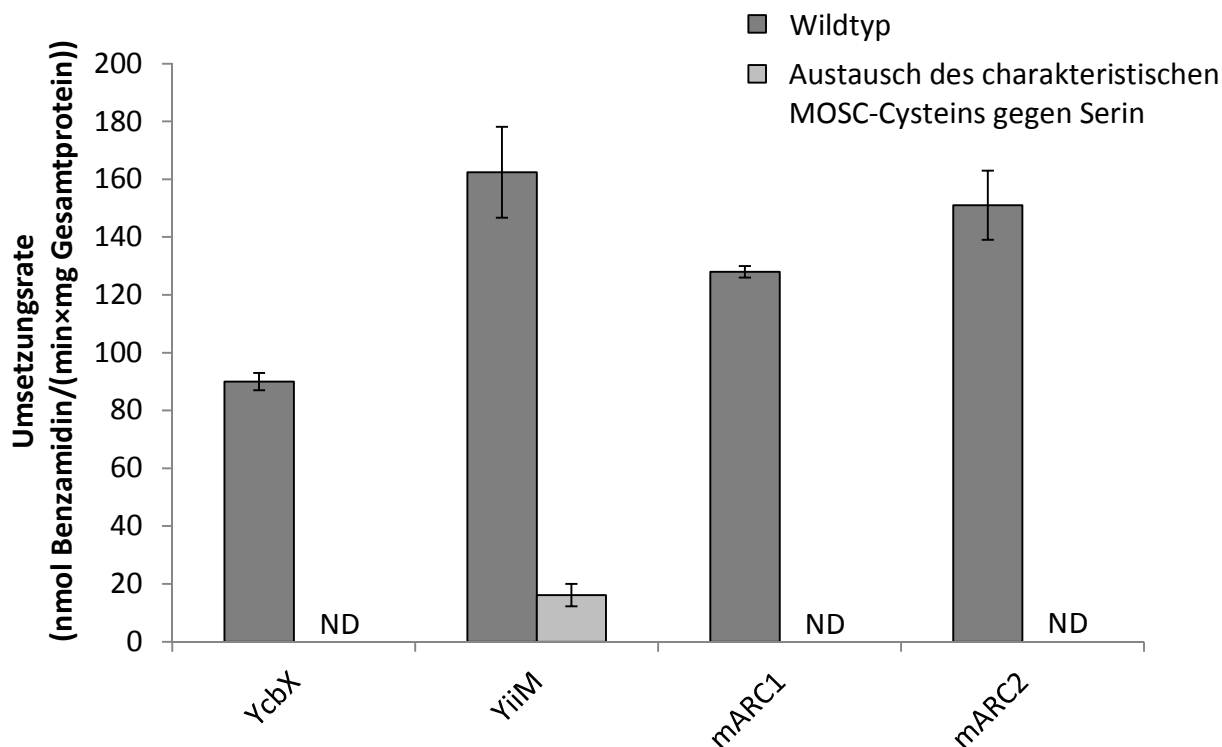


Abb. 3.3.7 Vergleich der prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Proteine und deren Varianten auf die Reduktion von Benzamidoxim

Die Inkubationsansätze mit YcbX waren wie folgt zusammengesetzt: 10 μ g YcbX und 5 μ g CysJ mit 1 mM NADPH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0)

Die Inkubationsansätze mit YiiM waren wie folgt zusammengesetzt: 20 μ g YiiM und 5 μ g Fre mit 0,5 mM FAD und 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0)

Die Inkubationsansätze mit mARC waren wie folgt zusammengesetzt: 10 μ g mARC und 76,2 pmol Cytochrom b_5 und 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase mit 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0).

Die Substratkonzentration betrug 3 mM Benzamidoxim (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 1 μ M Benzamidin. (ND = nicht detektierbar)

3.4. DISKUSSION

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit mit den rekombinant exprimierten prokaryotischen Molybdoenzymen YcbX und YiiM die Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim in *in vitro* Biotransformationsstudien gezeigt werden.

Die ermittelten Umsetzungsraten sind dabei vergleichbar mit dem eukaryotischen mARC-abhängigen Dreikomponenten-Enzymsystem, allerdings wurde hier auf eine Optimierung der Stöchiometrie verzichtet. Die Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim durch YcbX und YiiM folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.3.4 und Abb. 3.3.5). Dabei sind die MOSC-Proteine nicht alleine aktiv sondern nur zusammen mit ihren entsprechenden Elektronentransportproteinen CysJ beziehungsweise Fre.

Die Reduktion durch das Molybdoenzym YcbX ist dabei nicht nur abhängig von seinem Redoxpartner CysJ und dem Vorhandensein von NADPH als Cofaktor. Auch die gebundenen prosthetischen Gruppen (Moco und [Fe-S]-Cluster) müssen vorhanden sein, da weder die Variante aus dem *E. coli* Stamm RK5204, die keinen aktiven Moco bilden kann, noch die [Fe-S]-Varianten, bei denen das Cystein durch ein Serin ausgetauscht wurde, eine Aktivität aufwiesen.

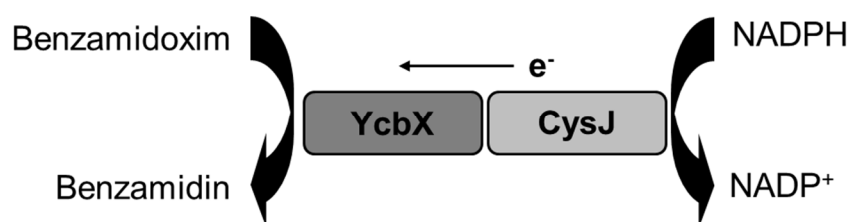


Abb. 3.4.1 Postulierter Mechanismus der Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim durch das prokaryotische YcbX-haltige System

CysJ transportiert die Elektronen dabei vermutlich vom NADPH über seine FAD und Flavodoxin Domäne auf die Ferredoxin-Domäne des YcbX. Von dort werden die Elektronen zur Molybdäncofaktor-bindenden MOSC-Domäne transportiert, wo die Reduktion der N-hydroxylierten Verbindungen stattfindet (Kozmin *et al.*, 2010).

Interessanterweise findet man in einigen *Vibrio*-Arten die Redox-Elemente aus YcbX und CysJ auf einem Polypeptid vereint (Kozmin *et al.*, 2010).

CysJ ist in der Literatur (Eschenbrenner *et al.*, 1995) als Octamer mit 1,6-1,7 mol Flavin pro mol Untereinheit beschrieben. Basierend auf dieser Annahme konnte in dieser Arbeit durch eine neu etablierte fluorimetrische Flavin-Bestimmung, die außerdem eine Unterscheidung in FMN und FAD erlaubt, eine Cofaktor-Saturierung des CysJ von etwa 30% bestimmt werden. Allerdings konnte, entgegen der Untersuchung von Eschenbrenner *et al.* (1995), mehr FMN als FAD nachgewiesen werden. Es wurde daher vermutet, dass das FAD während der Aufreinigung herausgelöst wird. Daraufhin wurde versucht durch Zugabe von FAD zum Inkubationsansatz die Umsetzung zu erhöhen. Dies führte allerdings zu einer Hemmung der Umsetzungsrate der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin (Daten nicht gezeigt). Den Oligomerisierungszustand betreffend wurde darüber hinaus gefunden, dass auch das in dieser Arbeit verwendete rekombinante CysJ als Octamer vorliegt (D. Reichmann, pers. Mitteilung) und daher den Anforderungen vollkommen entsprechen sollte.

Interessanterweise wurde bei der fluorimetrischen Flavin-Bestimmung der humanen Cytochrom b₅ Reduktase auch deutlich mehr FMN als FAD bestimmt. Schon in einer vorangegangenen Untersuchung fiel auf, dass die fluorimetrisch bestimmten FAD-Konzentrationen unrealistisch hoch lagen (Plitzko, 2010). Dies wurde auf den Zerfall von FAD zu FMN in wässriger Lösung zurückgeführt (Koziol, 1971). Die pflanzliche Reduktase, die analog der humanen Form aufgearbeitet wurde, wies allerdings höhere FAD- als FMN-Konzentrationen auf. Auch die mit der fluorimetrischen Methode bestimmten Flavin-Konzentrationen stimmten mit den photometrisch gemessenen überein. Daraufhin wurde versucht die Umsetzungsrate des humanen mARC-abhängigen Dreikomponenten-Enzymsystems durch den Zusatz von FAD zum Inkubationsansatz zu erhöhen. Allerdings wurde dadurch die Reduktion von Benzamidoxim drastisch verringert (Faktor 10) (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet,

dass schon geringe Mengen gebundenes FAD am Protein zur Weiterleitung der Elektronen ausreichen oder dass das FMN als Elektronenüberträger fungiert.

Die Reduktion durch das Molybdoenzym YiiM ist ebenso wie beim YcbX vom Molybdäncofaktor abhängig, was mit der RK5204-Variante gezeigt werden konnte. Außerdem werden neben dem Redoxpartner Fre auch die Cofaktoren NADH und FAD zur Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim benötigt.

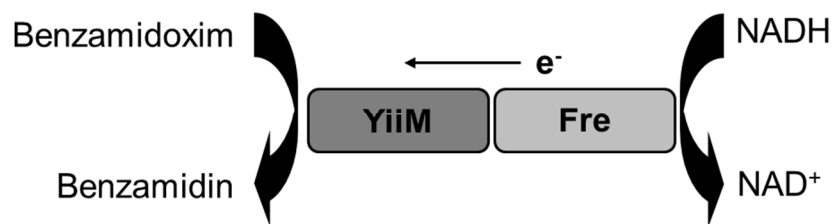


Abb. 3.4.2 Postulierter Mechanismus der Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim durch das prokaryotische YiiM-haltige System

Die Flavinreduktase Fre reduziert freie Flavine durch reduzierte Pyridinnucleotide, besitzt aber selbst nur eine geringe Affinität zu Riboflavin, FMN oder FAD. Diese Flavine gehen bei der Reinigung verloren und müssen von außen dazugegeben werden um eine katalytische Aktivität zu erhalten (Spyrou *et al.*, 1991). Auch das in dieser Arbeit rekombinant hergestellte Fre weist mit einer Cofaktor-Saturierung von 6% nur sehr geringe Mengen an gebundenem Flavin auf, so dass ohne die Zugabe von FAD zum Inkubationsansatz nur 6% der Aktivität erreicht werden.

Fre besitzt eine signifikante Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz des C-Terminus einer Untereinheit (Protein C) der Methanmonooxygenase von methanotrophen Bakterien. Protein C stellt eine kurze Elektronentransportkette dar, dessen N-Terminus zu pflanzlichen und bakteriellen Ferredoxinen homolog ist und dessen C-Terminus außerdem eine signifikante Homologie zu NADH Cytochrom b_5 Reduktasen besitzt (Spyrou *et al.*, 1991).

Da sowohl die prokaryotischen MOSC-Proteine YcbX und YiiM als auch das eukaryotische mARC-Enzym das Modellsubstrat Benzamidoxim zu Benzamidin umsetzen,

stellt die Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen eine Gemeinsamkeit der neuen Mitglieder der MOSC-Domänen-Superfamilie dar. Die Aufgabe der Sulfurierung des Molybdäncofaktors durch die namensgebende C-terminale Domäne der Moco-Sulfurase scheint damit eventuell nur eine Ausnahme dieser Superfamilie zu sein.

Durch Steady-state Experimente konnte zwar bei dem eukaryotischen Dreikomponenten-Enzymsystem ein Elektronenübergang vom NADH über FAD und Häm zum mARC-Protein und von dort auf das Substrat nachgewiesen werden. Allerdings erfolgte der Übergang vom Cytochrom b_5 auf den Molybdäncofaktor nur sehr langsam (Wahl, 2010). Außerdem ist das Vorkommen der einzelnen Komponenten in einzelnen Proteinen statt innerhalb eines gemeinsamen Polypeptids eher untypisch für Eukaryoten, sondern eher bei Prokaryoten zu finden (Schwarz, 2005). Daher schien es denkbar, dass eventuell *in vivo* auch andere Elektronentransportproteine für mARC in Frage kommen. Aus diesem Grund wurden die prokaryotischen Redoxproteine CysJ und Fre als Elektronenüberträger untersucht.

Dabei konnte sowohl durch YcbX als auch durch mARC das Modellsubstrat Benzamidoxim mit Hilfe anderer Redoxpartner, die die Elektronen weiterleiten, umgesetzt werden. Dies scheint vielleicht ein Hinweis darauf zu sein, dass *in vivo* eventuell auch andere Proteine mit anderen prosthetischen Gruppen bei der Weiterleitung der Elektronen beteiligt sein könnten.

Dazu wurden die Eisen-Schwefel-Proteine NADH-Reduktase (Komplex I der Atmungskette) und Adrenodoxin, welches bei den mitochondrialen Klasse I Cytochrom P450 Enzymen als Elektronenüberträger beteiligt ist, getestet (Efremov *et al.*, 2010; Omura, 2010). Allerdings konnte weder die N-reduktive Aktivität durch Rotenon, welches einen spezifischen Inhibitor der NADH-Reduktase darstellt (Navarro *et al.*, 2010), in Mitochondrien gehemmt werden noch mit rekombinantem Adrenodoxin und der entsprechenden Adrenodoxin Reduktase eine signifikante Umsetzung mit dem rekombinanten mARC detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die mARC-Proteine eine neue Molybdoenzymfamilie bilden (Wahl *et al.*, 2010). Dass die Aktivität von mARC durch Desulfurierungsversuche nicht gehemmt werden konnte, deutet darauf hin, dass bei den mARC-Proteinen kein sulfurierter Moco vorliegt, wie es bei der Xanthinoxidase-Familie der Fall ist. Obwohl die EPR-Spektren (Electron Paramagnetic Resonance) der mARC-Proteine anhand ihrer spezifischen g-Werte eine große Übereinstimmung mit den Enzymen der Sulfitoxidase-Familie zeigen, konnte dies nicht bestätigt werden. Da alle hergestellten Cystein-Varianten keine Veränderung des EPR-Spektrums zeigten und die gleiche N-reduktive Aktivität wie der Wildtyp aufwiesen, wurde davon ausgegangen, dass die mARC-Proteine eine neue Molybdoenzymfamilie bilden.

In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die prokaryotischen MOSC-Cystein-Varianten im Gegensatz zu ihrem Wildtyp keine Aktivität mehr aufweisen. Daraufhin wurden erneut die entsprechenden mARC-Varianten getestet, bei denen das für die MOSC-Superfamilie typische konservierte Cystein durch ein Serin ersetzt wurde. Wie für die Enzyme der Sulfitoxidase-Familie zu erwarten, wiesen auch sie keine N-reduktive Aktivität auf, so dass in den früheren Experimenten eine Verwechslung der zuvor getesteten MOSC-Cystein-Variante des mARC1 stattgefunden haben muss. Letzteres wurde mittlerweile durch erneute Sequenzierung sämtlicher Cystein-Varianten bestätigt (D. Reichmann, F. Bittner, pers. Mitteilung). Außerdem wurde sowohl bei den prokaryotischen wie auch bei den eukaryotischen MOSC-Cystein-Varianten über FormA-Analyse neben dem Molybdäncofaktor-Grundgerüst Molybdopterin auch Molybdän mittels ICP-MS Analyse nachgewiesen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch des MOSC-Cysteins nicht die Bindung des Molybdäncofaktors ans Apoprotein beeinflusst wird. Allerdings ist die Weiterleitung der Elektronen unterbrochen und damit keine N-reduktive Aktivität mehr vorhanden. Dies wurde auch für die Varianten der Sulfitoxidase beschrieben, die nicht mehr zur Koordinierung des Molybdäns über den Familien-typischen Cystein imstande sind (Hille *et al.*, 2011).

Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass der Molybdäncofaktor sowohl bei den mARC-Proteinen als auch bei den prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM an eine proteinogene Cysteinthiol-Gruppe bindet. Damit würden die MOSC-Proteine mARC, YcbX und YiiM neue Mitglieder der Sulfitoxidase-Familie darstellen.

Diese Ergebnisse korrelieren zum Teil auch mit den Untersuchungen von Chamizo-Ampudia *et al.* (2011) an mARC aus der Grünalge *Chlamydomonas*. Dieser substituierte das konservierte Cystein durch ein Alanin, wodurch allerdings nicht nur die N-reduktive Aktivität sondern auch die Bindung zum Molybdäncofaktor verloren ging.

3.5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal mit den rekombinanten prokaryotischen MOSC-Proteinen die Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen anhand des Modellsubstrats Benzamidoxim gezeigt werden.

Dabei war zum einen YcbX mit seinem Redoxpartner CysJ in der Lage Benzamidoxim zu Benzamidin umzusetzen. Diese Reaktion war dabei nicht nur abhängig von NADPH als Cosubstrat, sondern auch vom Vorhandensein der prosthetischen Gruppen des YcbX-Proteins (Molybdäncofaktor und [Fe-S]-Cluster).

Auch YiiM mit seinem Elektronentransportprotein Fre zeigte eine Umsetzung des Modellsubstrats Benzamidoxim zu Benzamidin, wobei die Reaktion nicht nur vom Molybdäncofaktor als prosthetische Gruppe des YiiM-Proteins abhängig war, sondern auch von den Cosubstraten NADH und FAD.

Die ermittelten Umsetzungsraten der prokaryotischen MOSC-Proteine waren vergleichbar mit denen des eukaryotischen mARC-abhängigen Systems, bestehend aus mARC, Cytochrom *b*₅ und Cytochrom *b*₅ Reduktase. Die Reduktion folgte außerdem wie beim mARC-haltigen System einer Michaelis-Menten-Kinetik.

Die neuen Elektronentransportproteine CysJ und Fre wurden als alternative Redoxpartner für das eukaryotische mARC-haltige Enzymsystem in *in vitro* Biotransformationsstudien getestet. Eine mögliche Beteiligung anderer Elektronentransportproteine für das eukaryotische mARC-Enzym konnte dabei allerdings weder bestätigt noch vollständig ausgeschlossen werden.

Der Austausch des für die MOSC-Superfamilie typischen konservierten Cysteins durch ein Serin führte sowohl bei den prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM als auch bei den eukaryotischen MOSC-Proteinen (mARC) zu einem Verlust der N-reduktiven Aktivität. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die MOSC-Proteine mARC, YcbX und YiiM neue Mitglieder der Sulfitoxidase-Familie darstellen.

Da diese Proteine den für die Funktion von MOSC-Proteinen charakteristischen hochkonservierten Cystein-Schwefel aufweisen und wie die eukaryotischen MOSC-Proteine (mARC und Moco-Sulfurase) den Molybdäncofaktor, der für die Funktion essentiell ist, binden, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei den prokaryotischen Proteinen YcbX und YiiM, wie per Datenbankanalyse vorausgesagt (Anantharaman und Aravind, 2002) tatsächlich um MOSC-Proteine handelt.

4. DETOXIFIZIERUNG N-HYDROXYLIERTER NUCLEO-BASEN UND NUCLEOSIDE

4.1. EINLEITUNG

4.1.1. Basenanaloga

Als Basenanaloga bezeichnet man eine Gruppe von chemischen Verbindungen, die in ihrer Struktur den natürlichen Bausteinen der Nukleinsäuren ähneln (Antimetabolite). Diese können in die DNA (RNA) eingebaut werden und besitzen dadurch eine toxische und/oder mutagene Wirkung (Freese, 1959). Unter bestimmten Voraussetzungen können Basenanaloga sogar stärker mutagen wirken als Standard-Mutagene wie UV-Licht oder alkylierende Agentien (Gee *et al.*, 1994). Daher werden diese Verbindungen oft eingesetzt, um die Mechanismen der DNA-Replikation und Reparatur zu untersuchen. Aber auch als Therapeutika finden verschiedene Basen- und Nucleosidanaloga vor allem in der antiretroviralen Therapie Verwendung. Am besten bekannt ist das Guanosin-Analogon Aciclovir gegen das Herpes-simplex-Virus (Elion, 1993). Das *N*-Hydroxycytidin, ein Ribonucleosid-Analogon, stellt einen erfolgversprechenden Kandidaten gegen das Hepatitis-C-Virus dar (Hernandez-Santiago *et al.*, 2004). Weitere Basenanaloga werden zum Beispiel als Zytostatika in der Chemotherapie der Leukämie eingesetzt wie das Mercaptopurin, ein Analogon der Nukleinbasen Adenin und Guanin (Karran, 2006). *N*-modifizierte Purinanaloga befinden sich in der Entwicklung zu Antimalariamitteln (Too *et al.*, 2007).

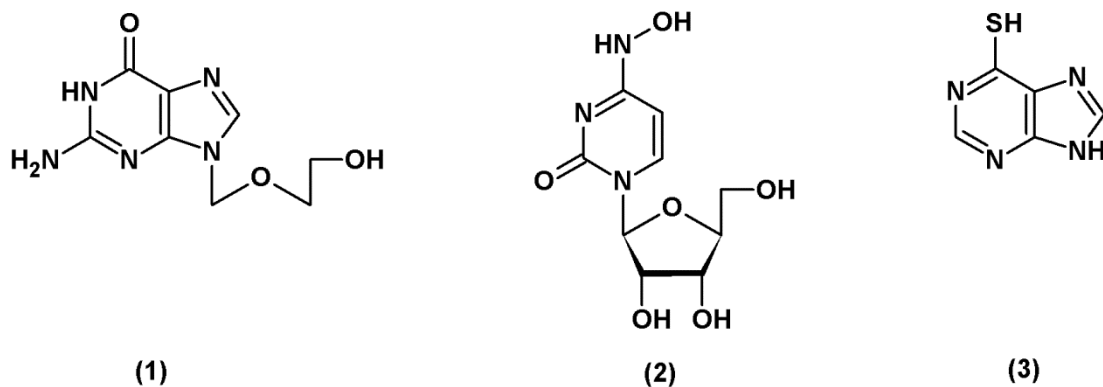


Abb. 4.1.1 Therapeutisch eingesetzte Basen- und Nucleosidanaloga

(1) *Aciclovir*; (2) *N-Hydroxycytidin*; (3) *Mercaptopurin*

Eine Gruppe der effektivsten und am besten untersuchten Basenanaloga sind neben dem Bromuracil und den Amino-, und Hydrazino-Derivaten die Hydroxylamino-Verbindungen von Purinen und Pyrimidinen. Diese zeichnen sich durch eine Hydroxylgruppe an der exocyclischen Aminogruppe aus. Die bekanntesten Vertreter der *N*-hydroxylierten Basenanaloga sind *N*-Hydroxycytosin (4-Hydroxyimino-2-oxopyrimidin), 2-Amino-*N*-hydroxyadenin (2-Amino-6-hydroxyaminopurin) und *N*-Hydroxyadenin (6-Hydroxylaminopurin) (Khromov-Borisov, 1997). Diese Verbindungen sind sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Organismen aktiv. Während *N*-Hydroxyadenin ein sehr starkes Mutagen für Eukaryoten, wie z.B. die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* darstellt, wirken *N*-Hydroxycytosin und sein Ribosid in Bakterien, Bakteriophagen und *Neurospora crassa* mutagen (Pavlov *et al.*, 1991; Sledziwska und Janion, 1980; de Serres und Brockman, 1993).

4.1.2. Entstehung *N*-hydroxylierter Basenanaloga

Die Entstehung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga kann durch verschiedene chemische Faktoren oder im Zuge des normalen zellulären Metabolismus erfolgen. Diese Reaktionen stellen eine Toxifizierung dar, weil die natürlich vorkommenden Nucleinsäuren zu ihren toxischen und mutagenen *N*-hydroxylierten Derivaten oxidiert werden. Allerdings konnte die Bildung bisher nur *in vitro* gezeigt werden

und die *N*-hydroxylierten Basenanaloga nicht wie z.B. das 8-oxo-Guanin *in vivo* nachgewiesen werden (White, 2010; Ohno *et al.*, 2006).

Die Reaktion von Cytosin und Cytidin mit Hydroxylamin führt zu *N*-hydroxylierten Derivaten. Dabei entstehen neben der 4-*N*-Hydroxy-6-hydroxyamino-5,6-dihydroverbindung in erster Linie die 4-*N*-hydroxylierten Verbindungen (Freese *et al.*, 1961; Budowsky *et al.*, 1971a). Aber auch das Nucleosid Adenosin reagiert mit Hydroxylamin in erster Linie zu 6-*N*-Hydroxyadenosin. Allerdings ist die Umsetzungsrate dieser Reaktion um etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger als die mit den Pyrimidinen (Budowsky *et al.*, 1971b).

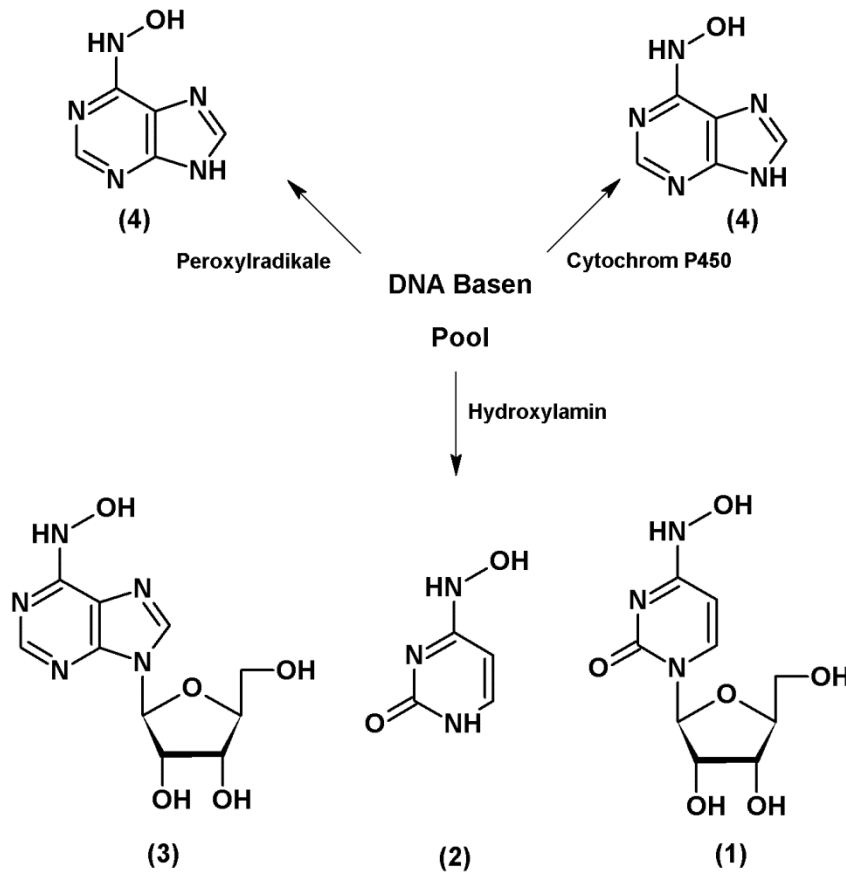


Abb. 4.1.2 Toxifizierung von DNA Basen (modifiziert nach Freese *et al.*, 1961; Budowsky *et al.*, 1971a + b; Simandan *et al.*, 1998; Clement und Kunze, 1990)

Reaktion mit Hydroxylamin zu N-Hydroxycytidin (1), N-Hydroxycytosin (2) und N-Hydroxyadenosin (3); mit Peroxylradikalen und Cytochrom P450 zu N-Hydroxyadenin (4)

N-Hydroxyadenin stellt das Hauptprodukt der Oxidation durch Peroxylradikale dar. Dadurch kann es eventuell als ein Biomarker für Peroxylradikale in Zellen und Geweben angesehen werden (Simandan *et al.*, 1998). Peroxylradikale sind in hoher Steady-State-Konzentration in der Zelle vorhanden, besitzen eine lange Halbwertszeit und sind an der Bildung einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie z.B. der Lipid- und Fettsäureautoxidation bzw. -peroxidation beteiligt (Dix und Aikens, 1993).

Des Weiteren konnte die *N*-Hydroxylierung von Adenin durch eine mikrosomale Monooxygenase gezeigt werden (Clement und Kunze, 1990). Dabei wird die Beteiligung eines Cytochrom P450 Isoenzymes postuliert, da diese Oxidation nur nach Induktion der Zellen durch 3-Methylcholanthren oder Isosafrol beobachtet werden konnte (Lam *et al.*, 1987). Diese beiden Verbindungen stellen typische Induktoren für das P450-Enzymsystem dar (Adams *et al.*, 1985). Auch wenn Adenin nur ein sehr schlechtes Substrat für Cytochrom P450 darstellt und die katalytische Effizienz der Adeninphosphoribosyltransferase, dessen Reaktion in Konkurrenz zur Oxidation durch P450 steht, deutlich höher liegt, darf diese Toxifizierung nicht vernachlässigt werden, da Adenin durch den Salvage Pathway immer in großen Mengen in der Zelle vorhanden ist.

4.1.3. Mutagene Wirkung *N*-hydroxylierter Basenanaloga

Die mutagene Wirkung der *N*-hydroxylierten Basenanaloga war schon früh bekannt, der Mechanismus wurde allerdings lange kontrovers diskutiert. Einige Autoren postulierten eine kovalente Bindung dieser Verbindungen an die DNA (McCartney *et al.*, 1985; Murray, 1987). Allerdings konnte die Reaktion dieser Derivate als Basenanaloga inzwischen mehrfach bewiesen werden (Abdul-Masih und Bessman, 1986; Kozmin *et al.*, 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass das *N*-hydroxylierte Basenanalogon *N*-Hydroxyadenin (HAP = Hydroxyaminopurin) wie Adenin über den Salvage Pathway aufgenommen werden kann. Mit Hilfe der Adeninphosphori-

bosyltransferase (1) findet dann die Umwandlung von *N*-Hydroxyadenin, welches ein gutes Substrat für dieses Enzym darstellt, in das entsprechende Monophosphat statt. Das entstandene *N*-Hydroxyadenosinmonophosphat (HAPMP) wird dann vermutlich, wie in Hefen gezeigt werden konnte, durch die Nucleosidmonophosphatkinase (2) zum Ribonucleotiddiphosphat phosphoryliert. Danach findet die Reduktion von *N*-Hydroxyadenosindiphosphat (HAPDP) durch die Ribonucleotidreduktase (3) zur entsprechenden Desoxyverbindung (dHAPDP) statt. Eine Phosphorylierung vom Desoxymonophosphat zum Desoxydiphosphat konnte in Hefen nicht nachgewiesen werden. Nach erneuter Phosphorylierung zum Desoxy-*N*-Hydroxyadenosintriphosphat (dHAPTP) durch die Nucleosiddiphosphatkinase (4) findet mit Hilfe von DNA Polymerasen (5) der Einbau in die DNA statt (Abdul-Masih und Bessman, 1986).

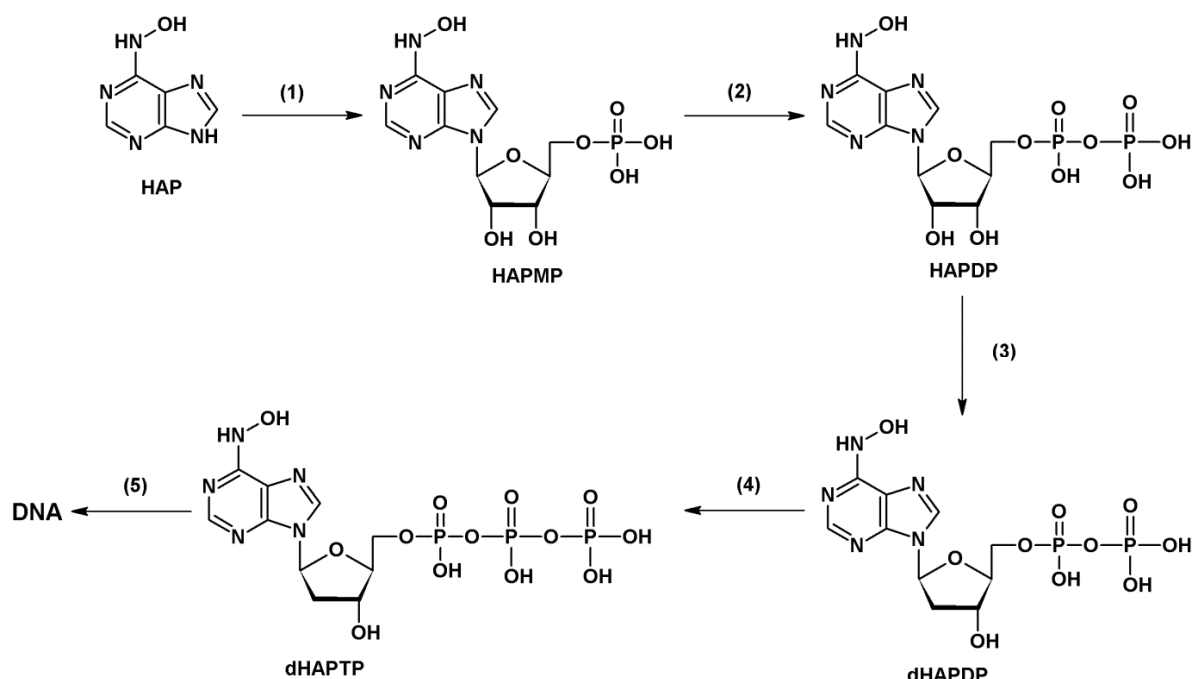


Abb. 4.1.3 Postulierter Metabolismus für den Einbau von *N*-Hydroxyadenin in die DNA (modifiziert nach Abdul-Masih und Bessman, 1986)

HAP = *N*-Hydroxyadenin, *HAPMP* = *N*-Hydroxyadenosinmonophosphat, *HAPDP* = *N*-Hydroxyadenosindiphosphat; *dHAPDP* = Desoxy-*N*-Hydroxyadenosindiphosphat, *dHAPTP* = Desoxy-*N*-Hydroxyadenosintriphosphat, (1) Adeninphosphoribosyltransferase, (2) Nucleosidmonophosphatkinase, (3) Ribonucleotidreduktase, (4) Nucleosiddiphosphatkinase, (5) DNA Polymerasen

Dabei kann dHAPTP sowohl gegenüber von Thymin als auch von Cytosin eingebaut werden, was in der Folge dann sowohl zu GC → AT-Übergängen als auch zu AT → GC-Übergängen führt (Abdul-Masih und Bessman, 1986).

Auch für *N*-Hydroxycytosin konnte eine Basenpaarung sowohl mit Adenin als auch mit Guanin festgestellt werden, wobei AT → GC-Übergänge häufiger auftreten (Janion und Glickman, 1980).

Die doppelte Basenpaarung kann aufgrund der tautomeren Formen der Basenanaloga zustande kommen. Diese können nämlich nicht nur in der Hydroxyaminoform sondern auch oximartig (Hydroxyiminoform) vorliegen. Während das Verhältnis beim *N*-Hydroxycytosin auf der Seite des Oxims liegt (1:10), wird beim *N*-Hydroxyadenin ein Verhältnis von 2,3:1 bis 1:3,5 diskutiert (Khromov-Borisov, 1997).

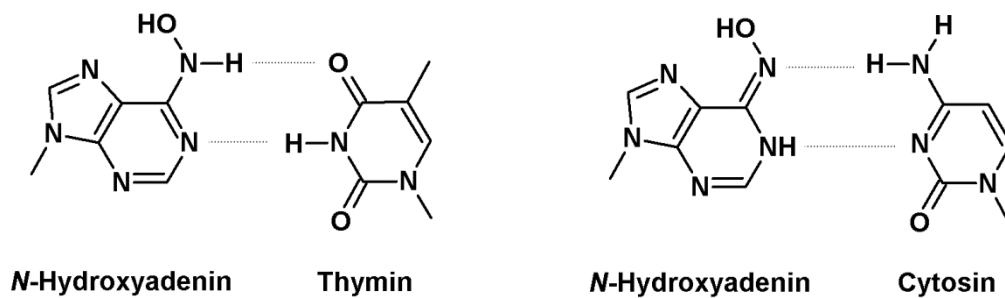


Abb. 4.1.4 Mögliche Basenpaarung von *N*-Hydroxyadenin (Abdul-Masih und Bessman, 1986)

4.1.4. Thema und Zielsetzung

Bereits vorangegangene Arbeiten ließen vermuten, dass das mARC-haltige Enzymsystem neben Amidoximen, *N*-hydroxylierten Guanidinen und Sulfhydroxamsäuren auch die *N*-hydroxylierte Nucleobase *N*-Hydroxycytosin reduziert. Weiterhin zeigten die Studien von Kozmin *et al.* (2008), dass in *E. coli* die beiden MOSC-haltigen Proteine YcbX und YiiM an der Detoxifizierung von *N*-Hydroxyadenin beteiligt sind. Daher sollte in dieser Arbeit sowohl die Detoxifizierung der *N*-hydroxylierten Nucleobasen *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin als auch der

N-hydroxylierten Nucleoside *N*-Hydroxycytidin und *N*-Hydroxyadenosin untersucht werden.

Die Charakterisierung sollte zum einen mit subzellulären Fraktionen verschiedener porciner Gewebe aber auch mit rekombinanten humanen, pflanzlichen und prokaryotischen Enzymsystemen erfolgen. Dazu war es zunächst erforderlich geeignete HPLC-Methoden zur Trennung der *N*-hydroxylierten Basenanaloga von ihren korrespondierenden Metaboliten zu entwickeln.

Diese Reaktion schützt die DNA während der Replikation vor dem Fehleinbau von toxischen und mutagenen *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch Reduktion zu den entsprechenden Nucleobasen und Nucleosiden. Dies könnte ein erster Hinweis auf die physiologische Funktion des mARC-abhängigen Enzymsystems sein.

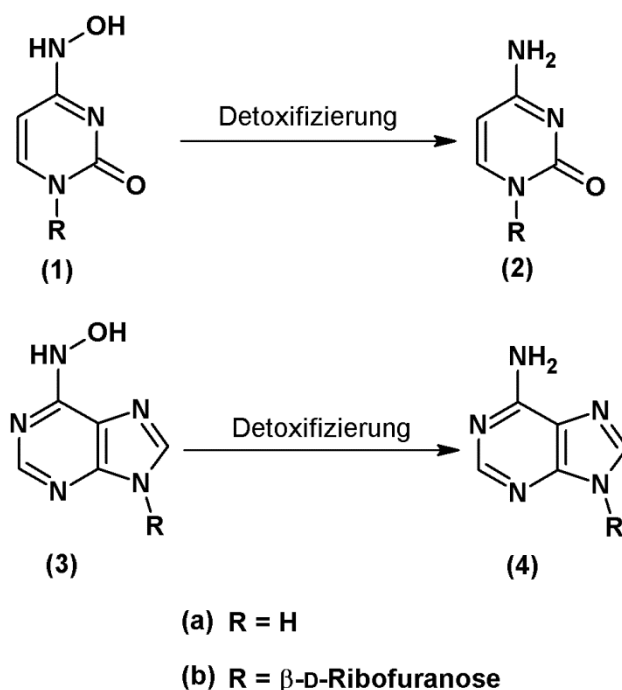


Abb. 4.1.5 Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basenanaloga

Reduktion von *N*-Hydroxycytosin (1a) zu Cytosin (2a), von *N*-Hydroxycytidin (1b) zu Cytidin (2b), von *N*-Hydroxyadenin (3a) zu Adenin (4a) und von *N*-Hydroxyadenosin (3b) zu Adenosin (4b)

4.2. METHODEN

4.2.1. Materialien und Geräte

Sofern nicht anders angegeben, befindet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 7 dieser Arbeit.

Die *N*-hydroxylierten Nucleobasen *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin waren kommerziell erhältlich. *N*-Hydroxycytidin wurde mir freundlicherweise von Dr. Schinazi (Veterans Affairs Medical Center, Decatur, USA) zur Verfügung gestellt. *N*-Hydroxyadenosin wurde angelehnt an Too *et al.* (2007) selbst synthetisiert. Dazu wurden 558 mg 6-Chloropurinribosid und 1,2 ml 50%ige (w/v) wässrige Hydroxylamin-Lösung in 10 ml Wasser/Ethanol (1:1) für 6 Stunden bei 40°C gerührt. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 80%.

4.2.2. Enzymquellen

4.2.2.1. Gewinnung porciner Enzymquellen

4.2.2.1.1. Gewinnung von Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol aus Leber

Die Subfraktionierung von porciner Leber in Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol wurde bereits in Kapitel 2.2.2.1.1 beschrieben.

4.2.2.1.2. Gewinnung von Mitochondrien aus extrahepatischen Organen

Die Organe zur Gewinnung von Mitochondrien aus hepatischen und extrahepatischen porcinen Organen (Gehirn, Niere, Herz, Schilddrüse, Lunge, Dünndarm, Pankreas) wurden von einem ortsansässigen Schlachter (Schlachtere Neidhard, Holtsee) oder einem lokalen Schlachthof (Kellinghusen) bezogen. Die Homogenisierung erfolgte durch Zerschneiden, Zerkleinerung durch einen handelsüblichen Fleischwolf (3-5 Mal) und eventuell je nach Organ anschließend mit einem Potter-

Elvehjem-Homogenisator oder einem Durchflusshomogenisator. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die anschließende Subfraktionierung erfolgte durch verschiedene Zentrifugationsschritte, wie unter Kapitel 2.2.2.1.1 beschrieben. Die erhaltenen Mitochondrien wurden suspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Mitochondrien aus Leber, Gehirn und Niere wurden von Carmen Krischkowski, die Mitochondrien aus der Schilddrüse von Dr. Antje Havemeyer und die Pankreasmitochondrien von Danilo Froriep isoliert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.2.2.2. Rekombinante Enzymquellen

Die Herstellung der rekombinanten humanen und pflanzlichen mARC Proteine wurde bereits in Kapitel 2.2.2.2.1 beschrieben. Die Herstellung der rekombinanten humanen und pflanzlichen Elektronentransportproteine Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase wurde bereits in Kapitel 2.2.2.2.2 beschrieben.

Die Herstellung der rekombinanten prokaryotischen MOSC-Proteine YcbX und YiiM sowie deren Redoxpartner CysJ und Fre wurde bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

4.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen

4.2.3.1. Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung der Proteingehälter der porcinen Subfraktionen sowie der rekombinanten eukaryotischen und prokaryotischen Enzymquellen wurde mit der BCA-Methode nach Smith *et al.* (1985) durchgeführt, wie bereits in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben.

4.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung der Identität und Reinheit der verwendeten Enzymquellen wurde eine Natrium Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt, wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben.

4.2.3.3. Bestimmung der Cofaktorgehälter der rekombinanten eukaryotischen Enzymquellen

Um die Umsetzungsraten der rekombinanten Proteine mARC, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase in den Reduktionsstudien besser miteinander vergleichen zu können, wurden diese einheitlich nach ihrem Cofaktor-Gehalt eingesetzt.

Der Molybdän-Gehalt der mARC Proteine wurde mittels ICP-MS bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.5).

Der Häm-Gehalts des Cytochrom b₅ wurde nach der Methode von Estabrook und Werringloer (1978) bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.6).

Der FAD-(Flavin-Adenin-Dinucleotid)Gehalt der NADH Cytochrom b₅ Reduktase erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm (Whitby, 1953) (siehe Kapitel 2.2.3.7).

4.2.3.4. Charakterisierung der *in vitro* Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim

Die Charakterisierung der hepatischen und rekombinanten Enzymquellen wurde in *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim bereits in Kapitel 2.2.3.8 beschrieben. Die Inkubationsansätze zur Charakterisierung der isolierten extrahepatischen Enzymquellen waren wie folgt zusammengesetzt: 0,01-0,1 mg mitochondriale Fraktion (0,01 mg Schilddrüse; 0,05 mg Leber, Niere, Herz, Lunge, Pankreas; 0,1 mg Hirn, Dünndarm), 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat Benzamidoxim wurde in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die Inkubationen wurden in einem 37°C Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen betrug 150 µl in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen. Nach 3-minütiger Vorinkubation des Substrats mit der jeweiligen Enzymquelle wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt und anschließend das präzipitierte Protein bei 22 000g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach der von Clement *et al.* (2005) beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.4. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxycytosin und Cytosin

4.2.4.1. HPLC-Methode

Zur Trennung von N-Hydroxycytosin und Cytosin wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 600 Pump	
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	EZChromElite Aufnahme und Auswertesoftware, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA)	
Stationäre Phase	Nucleodur [®] 100-5 C ₁₈ ec, 4,6 × 250 mm (Macherey-Nagel, Düren); Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, USA)	
Mobile Phase	95% 20 mM Ammoniumacetat in <i>Aqua bidest.</i> 5% Methanol (v/v)	
Flussrate	1 ml/min	
Laufzeit	18 min	
Detektion	UV, 267 nm	
Injektionsvolumen	10 μ l	
Retentionszeiten	N-Hydroxycytosin	5,1 \pm 0,1 min
	Cytosin	3,9 \pm 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (0,45 μ m, Whatman, Dassel), der organische Anteil lag in reiner Form (HPLC-grade) vor. Die mobile Phase wurde 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

4.2.4.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit in 7 verschiedenen Konzentrationen (5-500 μ M) in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Metabolit in 10 verschiedenen Konzentrationen (1-500 μ M) dem Inkubationsansatz mit 4 mM *N*-Hydroxycytosin, 1 mM NADH und 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 4.2.8.1 dargestellt aufgearbeitet und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.4.3. Stabilität von *N*-Hydroxycytosin und Cytosin

Zur Bestimmung der Stabilität wurde das Substrat *N*-Hydroxycytosin 2 mM und der Metabolit Cytosin 25 μ M in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und im Autosampler bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 11 und 24 Stunden wurden die Ansätze mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.5. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxyadenin und Adenin

4.2.5.1. HPLC-Methode

Zur Trennung von N-Hydroxyadenin und Adenin wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 600 Pump	
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	EZChromElite Aufnahme und Auswertesoftware, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA)	
Stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B (5 μ m), LiChroCART® 125 \times 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt); Vorsäule: RP select B, 4 \times 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt)	
Mobile Phase	82% 20 mM Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 3,0 18% Methanol (v/v)	
Flussrate	1 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Detektion	UV, 262 nm	
Injektionsvolumen	10 μ l	
Retentionszeiten	N-Hydroxyadenin	8,3 \pm 0,1 min
	Adenin	11,5 \pm 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (0,45 μ m, Whatman, Dassel), der organische Anteil lag in reiner Form (HPLC-grade) vor. Die mobile Phase wurde 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

4.2.5.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit in 8 verschiedenen Konzentrationen (3-500 μM) in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Metabolit in 12 verschiedenen Konzentrationen (3-500 μM) dem Inkubationsansatz mit 3 mM *N*-Hydroxyadenin, 1 mM NADH und 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 4.2.8.1 dargestellt aufgearbeitet und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.5.3. Stabilität von *N*-Hydroxyadenin und Adenin

Zur Bestimmung der Stabilität wurde das Substrat *N*-Hydroxyadenin 1,5 mM und der Metabolit Adenin 50 μM in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und im Autosampler bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden wurden die Ansätze mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.6. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxycytidin und Cytidin

4.2.6.1. HPLC-Methode

Zur Trennung von N-Hydroxycytidin und Cytidin wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 600 Pump	
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	EZChromElite Aufnahme und Auswertesoftware, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA)	
Stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B (5 μ m), LiChroCART® 125 \times 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt); Vorsäule: RP select B, 4 \times 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt)	
Mobile Phase	75% 10 mM Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 2,0 25% Methanol (v/v)	
Flussrate	1 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Detektion	UV, 281 nm	
Injektionsvolumen	10 μ l	
Retentionszeiten	N-Hydroxycytidin	5,9 \pm 0,1 min
	Cytidin	10,8 \pm 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (0,45 μ m, Whatman, Dassel), der organische Anteil lag in reiner Form (HPLC-grade) vor. Die mobile Phase wurde 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

4.2.6.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit in 8 verschiedenen Konzentrationen (0,5-500 μ M) in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Metabolit in 8 verschiedenen Konzentrationen (0,5-500 μ M) dem Inkubationsansatz mit 3 mM *N*-Hydroxycytidin, 1 mM NADH und 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 4.2.8.1 dargestellt aufgearbeitet und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.6.3. Stabilität von *N*-Hydroxycytidin und Cytidin

Zur Bestimmung der Stabilität wurde das Substrat *N*-Hydroxycytidin 1,5 mM und der Metabolit Cytidin 25 μ M in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und im Autosampler bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden wurden die Ansätze mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.7. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxyadenosin und Adenosin

4.2.7.1. HPLC-Methode

Zur Trennung von N-Hydroxyadenosin und Adenosin wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 600 Pump	
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	EZChromElite Aufnahme und Auswertesoftware, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA)	
Stationäre Phase	Nucleodur [®] 100-5 C ₁₈ ec, 4,6 × 250 mm (Macherey-Nagel, Düren); Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, USA)	
Mobile Phase	80% 20 mM Ammoniumacetat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 4,0 20% Methanol (v/v)	
Flussrate	1 ml/min	
Laufzeit	10 min	
Detektion	UV, 260 nm	
Injektionsvolumen	10 μ l	
Retentionszeiten	N-Hydroxyadenosin	4,1 ± 0,1 min
	Adenosin	6,4 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (0,45 μ m, Whatman, Dassel), der organische Anteil lag in reiner Form (HPLC-grade) vor. Die mobile Phase wurde 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

4.2.7.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit in 9 verschiedenen Konzentrationen (0,5-500 μ M) in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Metabolit in 10 verschiedenen Konzentrationen (1-500 μ M) dem Inkubationsansatz mit 6 mM *N*-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH und 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 4.2.8.1 dargestellt aufgearbeitet und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.7.3. Stabilität von *N*-Hydroxyadenosin und Adenosin

Zur Bestimmung der Stabilität wurde das Substrat *N*-Hydroxyadenosin 3 mM und der Metabolit Adenosin 250 μ M in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und im Autosampler bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden wurden die Ansätze mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.8. *In vitro* Biotransformationsstudien von N-hydroxylierten Basenanaloga

4.2.8.1. *In vitro* Biotransformationsansatz

Die Inkubationen mit den N-hydroxylierten Basenanaloga wurden in einem 37°C Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen betrug 150 µl in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen. Nach 3-minütiger Vorinkubation des Substrats mit der jeweiligen Enzymquelle in 20 mM MES- oder 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrats gestartet. Nach 15 bzw. 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt und anschließend das präzipitierte Protein bei 22 000g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

4.2.8.1.1. Inkubation mit hepatischen Subfraktionen

Die Standardinkubationsansätze mit den subzellulären hepatischen Fraktionen waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Homogenat, Mitochondrien, Mikrosomen bzw. Cytosol, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt. Dazu wurde die Substratkonzentration des Standardinkubationsansatzes variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot.

Die jeweils eingesetzte Substratkonzentration an N-hydroxyliertem Basenanalogen kann Tab. 4.2.1 entnommen werden.

Tab. 4.2.1 Verwendete Substratkonzentrationen bei der Inkubation *N*-hydroxylierter Basenanaloga mit hepatischen Subfraktionen

Substrat	Standardinkubationsansatz	Substratabhängigkeit
	(mM)	(mM)
<i>N</i> -Hydroxycytosin	4,0	0,1 - 9,0
<i>N</i> -Hydroxyadenin	1,5	0,1 - 8,0
<i>N</i> -Hydroxycytidin	3,0	0,1 - 8,0
<i>N</i> -Hydroxyadenosin	6,0	0,1 - 9,0

4.2.8.1.2. Inkubation mit extrahepatischen porcinen Enzymquellen

Die Standardinkubationsansätze mit den extrahepatischen mitochondrialen Fraktionen waren wie folgt zusammengesetzt: 0,01-0,1 mg mitochondriale Fraktion (0,01 mg Schilddrüse; 0,05 mg Leber, Niere, Herz, Lunge, Pankreas; 0,1 mg Hirn, Dünndarm), 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die jeweils eingesetzte Substratkonzentration an *N*-hydroxyliertem Basenanalogen kann Tab. 4.2.2 entnommen werden.

Tab. 4.2.2 Verwendete Substratkonzentrationen bei der Inkubation *N*-hydroxylierter Basenanaloga mit extrahepatischen porcinen Enzymquellen

Substrat	Standardinkubationsansatz
	(mM)
<i>N</i> -Hydroxycytosin	4,0
<i>N</i> -Hydroxyadenin	1,5
<i>N</i> -Hydroxycytidin	3,0
<i>N</i> -Hydroxyadenosin	6,0

4.2.8.1.3. Inkubation mit rekombinanten humanen oder pflanzlichen

Enzymquellen

Die Standardinkubationsansätze mit den rekombinanten humanen oder pflanzlichen Enzymen waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC1 oder mARC2, 76,2 pmol Cytochrom b_5 , 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Proteine wurden nach ihrem Cofaktorgehalt eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurde für jedes *N*-hydroxylierte Basenanalogen unter den Standardinkubationsbedingungen eine Zeitabhängigkeit durchgeführt. Dazu wurde bei den Pyrimidinen das humane mARC2 und bei den Purinen das humane mARC1 verwendet und die Inkubationszeit von 5 bis 120 Minuten variiert.

Zur Charakterisierung der Reduktion wurden nacheinander die einzelnen Komponenten des Standardinkubationsansatzes durch äquivalente Mengen an Puffer ersetzt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt. Dazu wurde die Substratkonzentration des Standardinkubationsansatzes variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot. Zur Berechnung der katalytischen Effizienz wurde die eingesetzte Enzymmenge auf den Molybdängehalt bezogen.

Die jeweils eingesetzte Substratkonzentration an *N*-hydroxyliertem Basenanalogen kann Tab. 4.2.3 entnommen werden.

Tab. 4.2.3 Verwendete Substratkonzentrationen bei der Inkubation *N*-hydroxylierter Basenanaloga mit rekombinanten humanen und pflanzlichen Enzymquellen

Substrat	Standardinkubationsansatz	Substratabhängigkeit
	(mM)	(mM)
<i>N</i> -Hydroxycytosin	4	0,1 - 8,6
<i>N</i> -Hydroxyadenin	3	0,1 - 8,0
<i>N</i> -Hydroxycytidin	3 (hmARC1/pmARC2)	0,1 - 8,0
	6 (pmARC1)	
	10 (hmARC2)	
<i>N</i> -Hydroxyadenosin	6	0,1 - 9,0
		1 - 20 (hmARC2)

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Enzymchargen wurden Standardinkubationen mit *N*-Hydroxycytosin als Substrat unter Verwendung dreier unterschiedlicher mARC-Chargen durchgeführt und mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim verglichen.

Zur Optimierung der Standardinkubationsbedingungen wurden im Vorfeld Stöchiometrierversuche mit *N*-Hydroxycytosin als Substrat durchgeführt. Zur Bestimmung der optimalen Stöchiometrie wurden die Proteine mARC, Cytochrom *b*₅ und Cytochrom *b*₅ Reduktase in verschiedenen Verhältnissen zueinander eingesetzt. Dabei lag die Gesamtcofaktor-Konzentration konstant bei 160 pmol.

4.2.8.1.4. Inkubation mit rekombinanten prokaryotischen Enzymquellen

Die Standardinkubationsansätze mit dem rekombinanten prokaryotischen MOSC-Protein YcbX waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YcbX, 5 µg CysJ, 1 mM NADPH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0).

Die Standardinkubationsansätze mit dem rekombinanten prokaryotischen MOSC-Protein YiiM waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YiiM, 5 µg Fre, 1 mM NADH, 0,5 mM FAD in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0).

Die Inkubationszeit betrug jeweils 15 Minuten.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt. Dazu wurde die Substratkonzentration des Standardinkubationsansatzes variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot. Zur Berechnung der katalytischen Effizienz wurde für YcbX ein Molekulargewicht von 40 kDa und für YiiM ein Molekulargewicht von 26 kDa zugrunde gelegt und die eingesetzte Enzymmenge auf die verwendete Proteinmenge an YcbX bzw. YiiM bezogen.

Die jeweils eingesetzte Substratkonzentration an *N*-hydroxyliertem Basenanaloga kann Tab. 4.2.4 entnommen werden.

Tab. 4.2.4 Verwendete Substratkonzentrationen bei der Inkubation *N*-hydroxylierter Basenanaloga mit rekombinanten prokaryotischen Enzymquellen

Substrat	Standardinkubationsansatz (mM)		Substratabhängigkeit (mM)
	YcbX	YiiM	YcbX/YiiM
<i>N</i> -Hydroxycytosin	3	3	0,3 - 6,0
<i>N</i> -Hydroxyadenin	1	3	0,3 - 6,0
<i>N</i> -Hydroxycytidin	3	10	0,3 - 6,0
<i>N</i> -Hydroxyadenosin	3	3	0,3 - 6,0

4.3. ERGEBNISSE

4.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen

4.3.1.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Charakterisierung der verwendeten hepatischen und rekombinanten Enzymquellen mittels SDS-PAGE zur Bestimmung der Identität und Reinheit wurde bereits in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben.

4.3.1.2. Cofaktor-Gehälter der rekombinanten eukaryotischen Enzymquellen

Da die rekombinanten eukaryotischen Enzymquellen in den *in vitro* Biotransformationsstudien einheitlich nach ihrem Cofaktorgehalt eingesetzt wurden, wurde der Molybdän-, Häm- und FAD-Gehalt im Vorfeld bestimmt. Da in der gesamten Arbeit jeweils nur eine Enzymcharge verwendet wurde, fand die Charakterisierung der Enzymquellen bereits in Kapitel 2 statt.

Der Molybdän-Gehalt der rekombinanten humanen und pflanzlichen mARC-Proteine wurde bereits in Kapitel 2.3.1.2 bestimmt.

Der Häm-Gehalt des rekombinanten humanen und pflanzlichen Cytochrom b_5 wurde bereits in Kapitel 2.3.1.3 bestimmt.

Der FAD-Gehalt der rekombinanten humanen und pflanzlichen Cytochrom b_5 Reduktasen wurde bereits in Kapitel 2.3.1.4 bestimmt.

4.3.1.3. *In vitro* Reduktion mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim

Die *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim zur Charakterisierung der isolierten hepatischen und rekombinanten eukaryotischen Enzymquellen wurde bereits in Kapitel 2 und zur Charakterisierung der rekombinanten prokaryotischen Enzymquellen in Kapitel 3 beschrieben.

Zur Charakterisierung der extrahepatischen mitochondrialen Fraktionen wurden Reduktionsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim durchgeführt. Dabei konnte in allen getesteten extrahepatischen Mitochondrien eine N-reduktive Aktivität gezeigt werden (Abb. 4.3.1). Die höchsten Umsetzungsrate, bezogen auf Milligramm Gesamtprotein, wurden mit den Mitochondrien der Niere, der Schilddrüse und des Pankreas erhalten. Diese waren vergleichbar oder höher als die Umsetzungsrate der hepatischen mitochondrialen Fraktion.

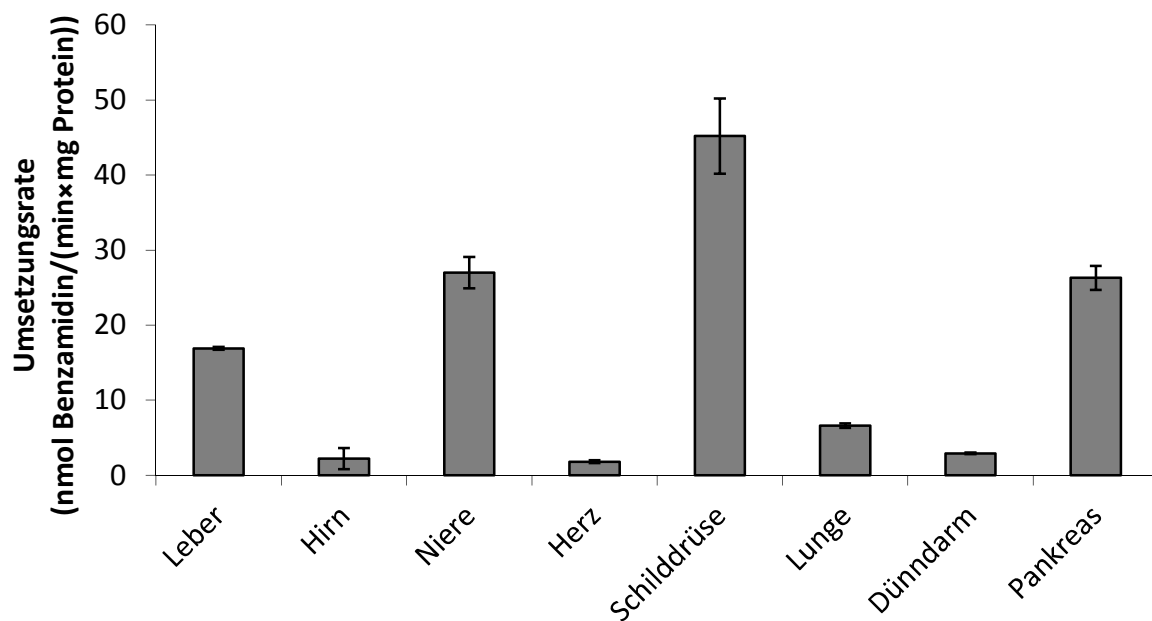


Abb. 4.3.1 Reduktion von Benzamidoxim durch hepatische und extrahepatische Mitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,01-0,1 mg Mitochondrien, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxycytosin und Cytosin

4.3.2.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm

Die Trennung von N-Hydroxycytosin und Cytosin erfolgte mit einer neu entwickelten HPLC-Methode. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 4.3.2 dargestellt. Die Trennung von Substrat und Metabolit gelang mit einer guten Auflösung ($R = 3$) und innerhalb kurzer Retentionszeiten (< 6 Minuten). Auch die Trennung vom Cofaktor NADH/NAD⁺ war gegeben.

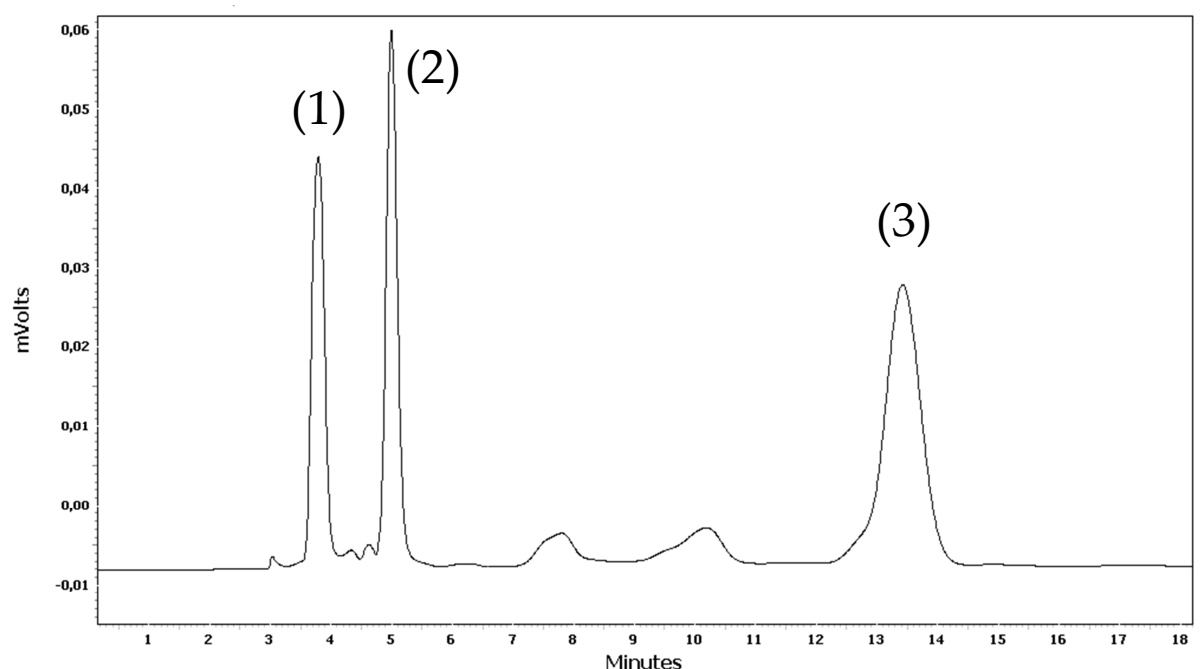


Abb. 4.3.2 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von N-Hydroxycytosin und Cytosin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien 4 mM N-Hydroxycytosin, 1 mM NADH und 500 μ M Cytosin in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). (1) Cytosin; (2) N-Hydroxycytosin; (3) NADH/NAD⁺

4.3.2.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade war im Konzentrationsbereich von 5-500 μM linear ($R^2 = 1,0000$). Die Richtigkeit für den ermittelten Bestimmungsbereich (5-500 μM) betrug $98 \pm 5\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (5 μM) die Richtigkeit einen Wert von 86% aufwies.

Die mithilfe der Kalibriergeraden ermittelte Wiederfindung betrug im Konzentrationsbereich von 1-500 μM $904 \pm 1304\%$. Dies war auf die 2,2%ige Verunreinigung des Substrates mit Metabolit zurückzuführen, die mittels HPLC ermittelt wurde. Um diese Verunreinigung bei künftigen Inkubationsansätzen zu berücksichtigen, wurde diese von den Werten zur Quantifizierung der enzymatisch gebildeten Metabolitenkonzentration abgezogen.

Dadurch ergab sich im Bestimmungsbereich von 5-500 μM eine durchschnittliche Richtigkeit von $102 \pm 11\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (5 μM) die Richtigkeit 103% betrug.

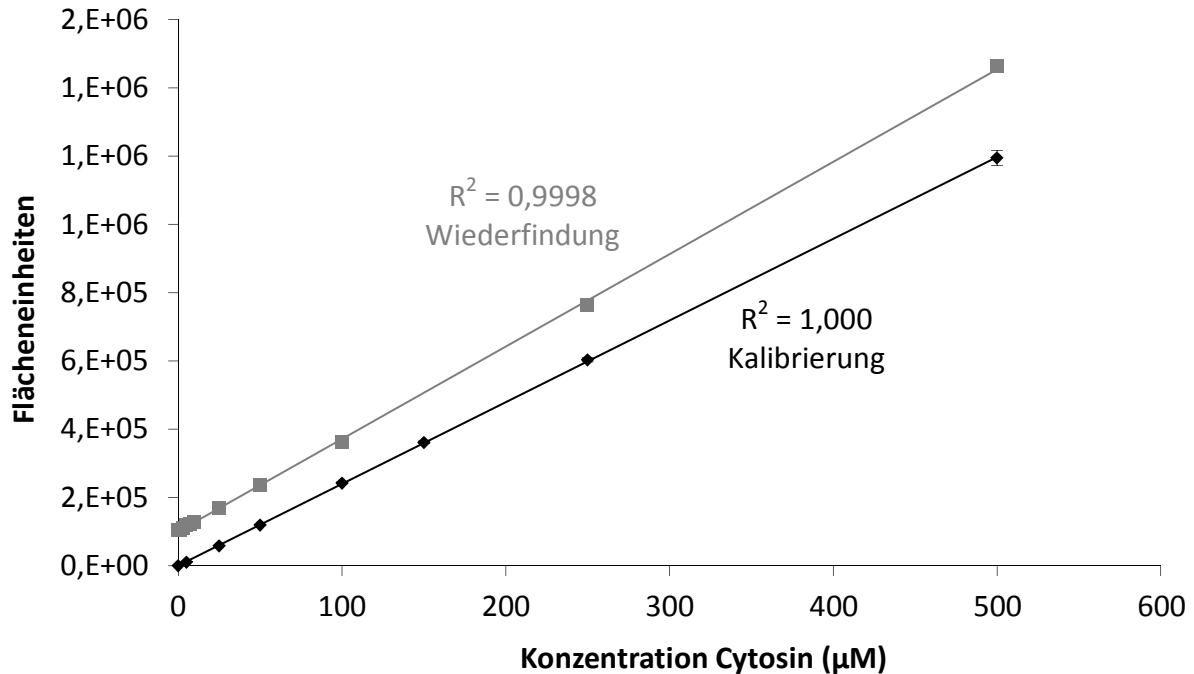


Abb. 4.3.3 Kalibrierung und Wiederfindung von Cytosin

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Durchführung sind in Kapitel 4.2.4.2 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2.3. Stabilität

Die Bestimmung der Stabilität zeigt, dass sowohl der Metabolit Cytosin als auch das Substrat *N*-Hydroxycytosin über mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler stabil sind (Abb. 4.3.4). Nach 24 Stunden waren noch $99,9 \pm 0,7\%$ Cytosin und $98,8 \pm 0,2\%$ *N*-Hydroxycytosin nachweisbar. Die Verunreinigung des Substrates mit etwa 2,2% Metabolit blieb ebenfalls über den beobachteten Zeitraum konstant und konnte daher bei künftigen Inkubationsansätzen subtrahiert werden.

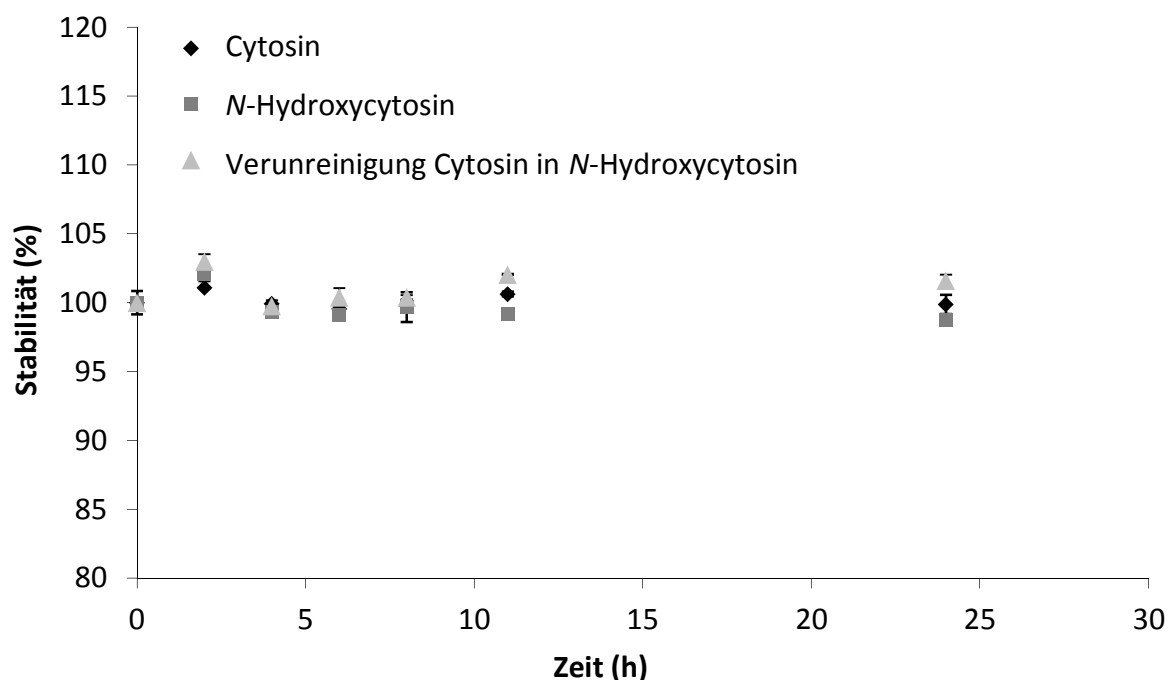


Abb. 4.3.4 Stabilität von Cytosin und *N*-Hydroxycytosin in Puffer/Methanol bei Raumtemperatur

Die Konzentration des Substrats *N*-Hydroxycytosin betrug 2 mM und die des Metaboliten Cytosin 25 μ M. Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.4.3 beschrieben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei verschiedenen Ansätzen.

4.3.3. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxyadenin und Adenin

4.3.3.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm

Die Trennung von N-Hydroxyadenin und Adenin erfolgte mit einer neu entwickelten HPLC-Methode. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 4.3.5 dargestellt. Die Trennung von Substrat und Metabolit gelang mit einer guten Auflösung ($R = 5$) und innerhalb kurzer Retentionszeit (< 12 Minuten). Auch die Trennung vom Cofaktor NADH/NAD⁺ war gegeben.

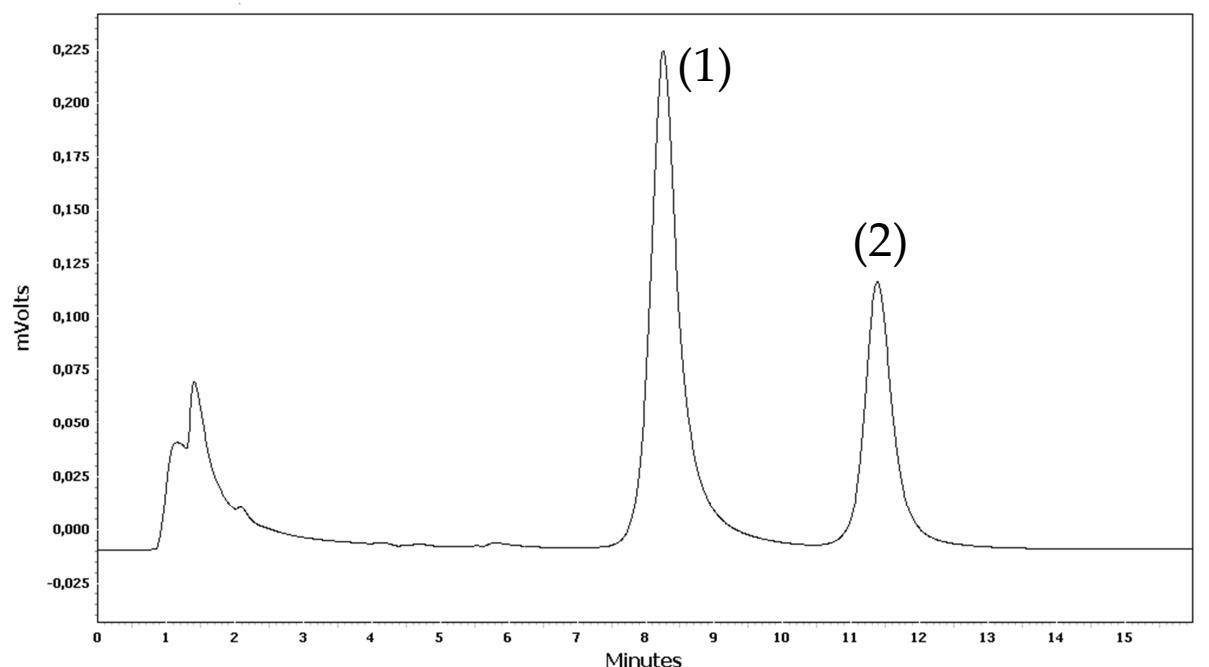


Abb. 4.3.5 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von N-Hydroxyadenin und Adenin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien 3 mM N-Hydroxyadenin, 1 mM NADH und 500 μ M Adenin in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). (1) N-Hydroxyadenin; (2) Adenin

4.3.3.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade war im Konzentrationsbereich von 3-500 μM linear ($R^2 = 0,9998$). Die Richtigkeit für den ermittelten Bestimmungsbereich (3-500 μM) betrug $104 \pm 4\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (3 μM) die Richtigkeit einen Wert von 98% aufwies.

Die mithilfe der Kalibriergeraden ermittelte Wiederfindung betrug im Konzentrationsbereich von 3-500 μM $184 \pm 78\%$. Dies war auf die etwa 0,8%ige Verunreinigung des Substrates mit Metabolit zurückzuführen, die mittels HPLC ermittelt wurde. Um diese Verunreinigung bei künftigen Inkubationsansätzen zu berücksichtigen, wurde diese von den Werten zur Quantifizierung der enzymatisch gebildeten Metabolitenkonzentration abgezogen.

Dadurch ergab sich im Bestimmungsbereich von 10-500 μM eine durchschnittliche Richtigkeit von $106 \pm 11\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (10 μM) die Richtigkeit 86% betrug. (Abb. 4.3.6)

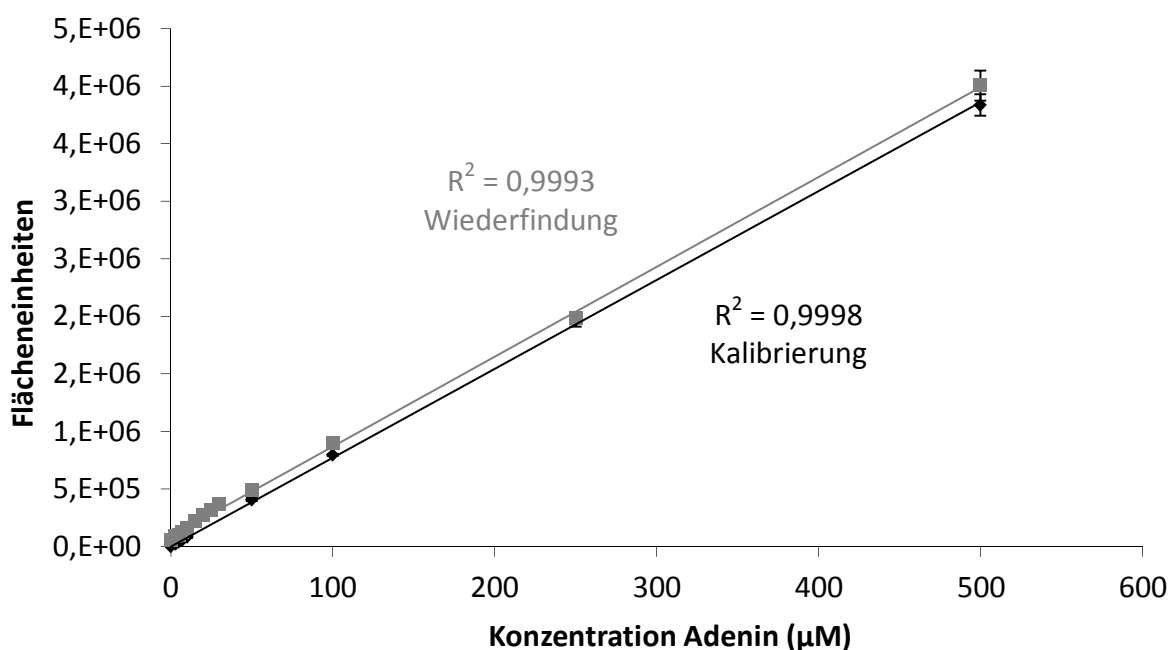


Abb. 4.3.6 Kalibrierung und Wiederfindung von Adenin

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Durchführung sind in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.3.3. Stabilität

Die Bestimmung der Stabilität zeigt, dass der Metabolit Adenin über 24 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler stabil ist (Abb. 4.3.7). Nach 24 Stunden waren noch $99 \pm 4\%$ Adenin nachweisbar. Die Konzentration des Substrates *N*-Hydroxyadenin nahm zwar innerhalb von 24 Stunden um etwa 20% ab, allerdings blieb die Verunreinigung des Substrates mit etwa 0,8% Metabolit ebenfalls über den beobachteten Zeitraum konstant und konnte daher bei künftigen Inkubationsansätzen subtrahiert werden.

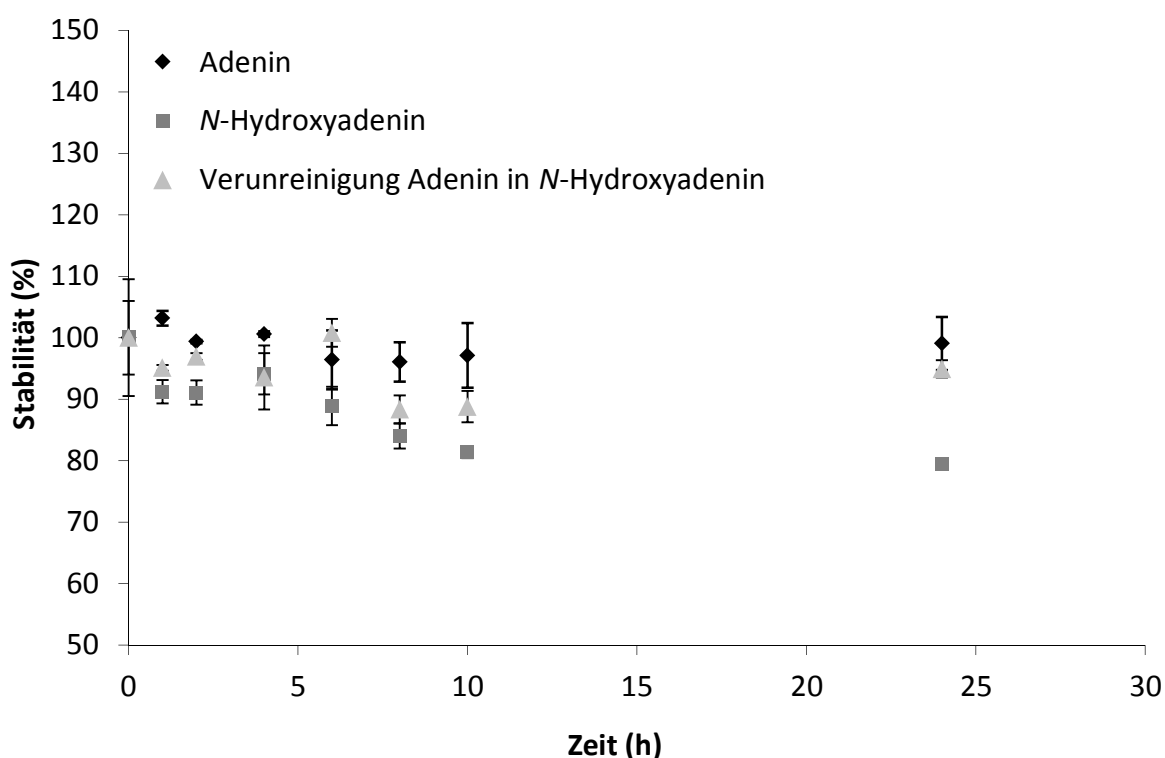


Abb. 4.3.7 Stabilität von Adenin und *N*-Hydroxyadenin in Puffer/Methanol bei Raumtemperatur

Die Konzentration des Substrats *N*-Hydroxyadenin betrug 1,5 mM und die des Metaboliten Adenin 50 μM . Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.5.3 beschrieben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei verschiedenen Ansätzen.

4.3.4. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxycytidin und Cytidin

4.3.4.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm

Die Trennung von N-Hydroxycytidin und Cytidin erfolgte mit einer neu entwickelten HPLC-Methode. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 4.3.8 dargestellt. Die Trennung von Substrat und Metabolit gelang mit einer guten Auflösung ($R > 6$) und innerhalb kurzer Retentionszeit (< 11 Minuten). Auch die Trennung vom Cofaktor NADH/NAD⁺ war gegeben.

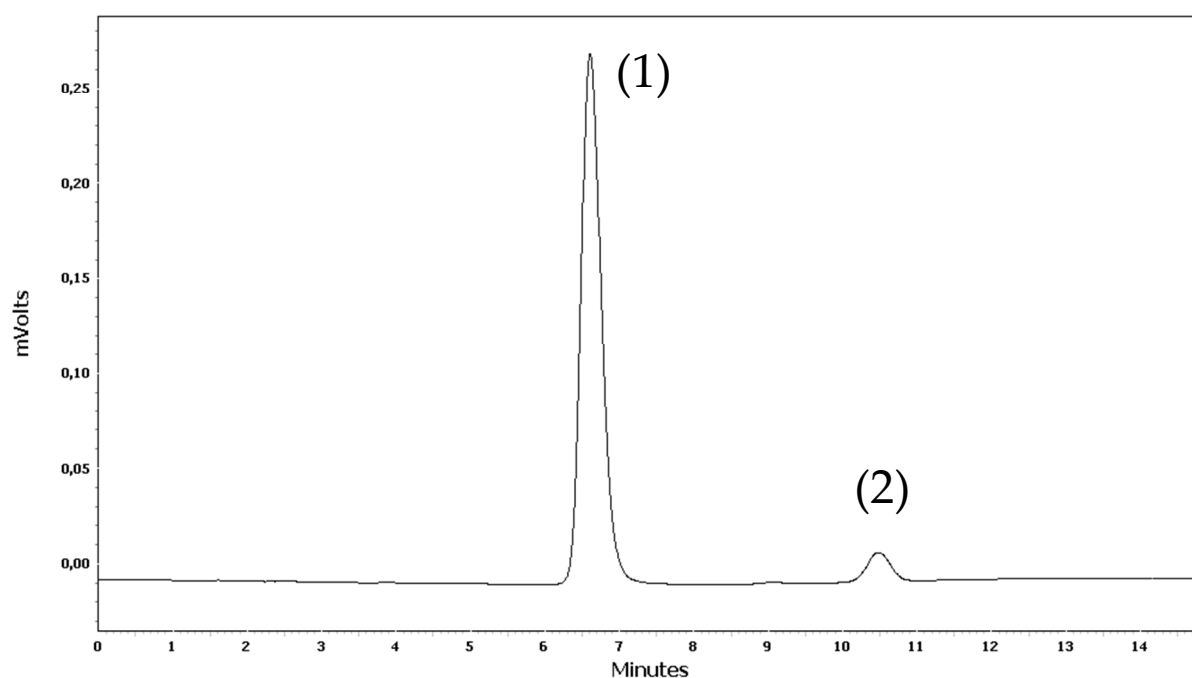


Abb. 4.3.8 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von N-Hydroxycytidin und Cytidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien 3 mM N-Hydroxycytidin, 1 mM NADH und 100 μ M Cytidin in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). (1) N-Hydroxycytidin; (2) Cytidin

4.3.4.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade war im Konzentrationsbereich von 0,5-500 μM linear ($R^2 = 0,9997$). Die Richtigkeit für den ermittelten Bestimmungsbereich (5-500 μM) betrug $105 \pm 5\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (5 μM) die Richtigkeit einen Wert von 114% aufwies.

Die mithilfe der Kalibriergeraden ermittelte Wiederfindung betrug im Bestimmungsbereich von 5-500 μM $108 \pm 8\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (5 μM) die Richtigkeit einen Wert von 100% aufwies. (Abb. 4.3.9)

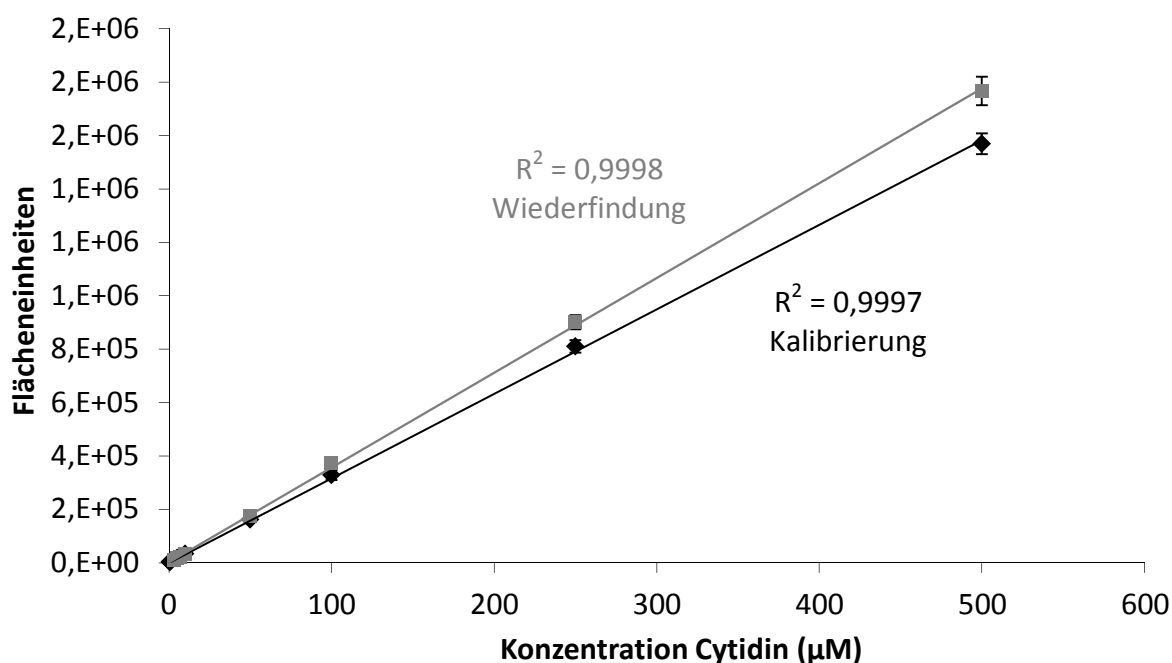


Abb. 4.3.9 Kalibrierung und Wiederfindung von Cytidin

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Durchführung sind in Kapitel 4.2.6.2 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.4.3. Stabilität

Die Bestimmung der Stabilität zeigt, dass sowohl das Substrat *N*-Hydroxycytidin als auch der Metabolit Cytidin über 24 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler stabil sind (Abb. 4.3.10). Nach 24 Stunden waren noch $102 \pm 1\%$ *N*-Hydroxycytidin und $104 \pm 1\%$ Cytidin nachweisbar.

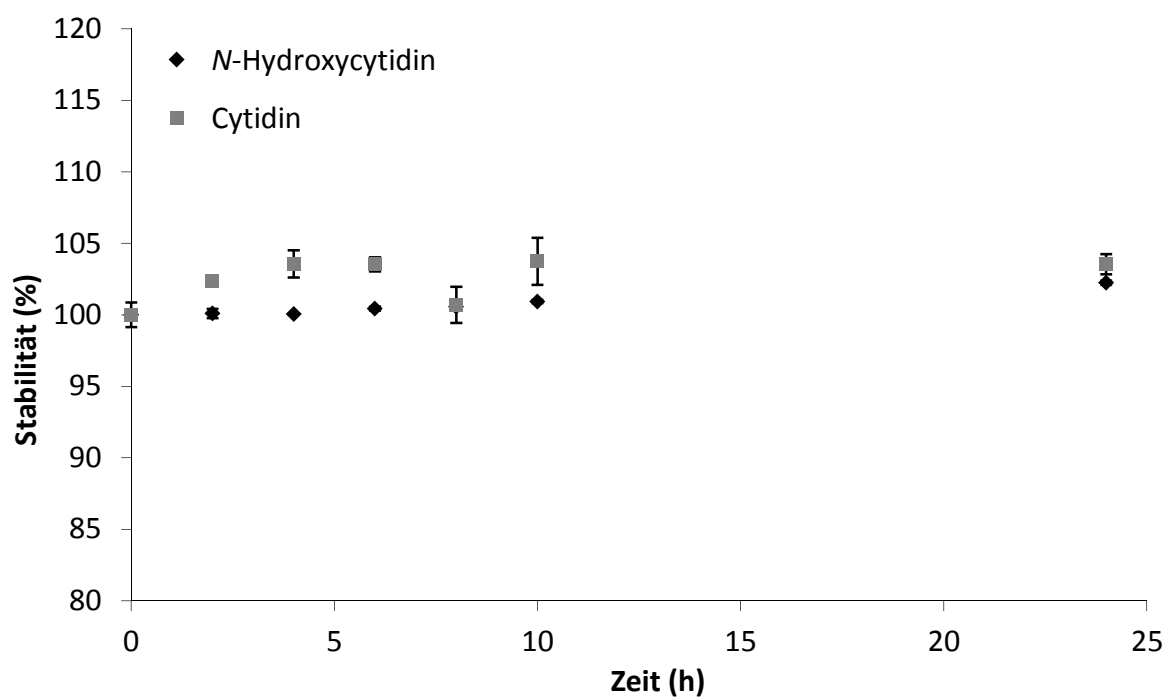


Abb. 4.3.10 Stabilität von Cytidin und *N*-Hydroxycytidin in Puffer/Methanol bei Raumtemperatur

*Die Konzentration des Substrats *N*-Hydroxycytidin betrug 1,5 mM und die des Metaboliten Cytidin 25 μ M. Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.6.3 beschrieben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei verschiedenen Ansätzen.*

4.3.5. HPLC-Analytik zur Trennung von N-Hydroxyadenosin und Adenosin

4.3.5.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm

Die Trennung von N-Hydroxyadenosin und Adenosin erfolgte mit einer neu entwickelten HPLC-Methode. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 4.3.11 dargestellt. Die Trennung von Substrat und Metabolit gelang mit einer guten Auflösung ($R > 6$) und innerhalb kurzer Retentionszeiten (< 7 Minuten). Auch die Trennung vom Cofaktor NADH/NAD⁺ war gegeben.

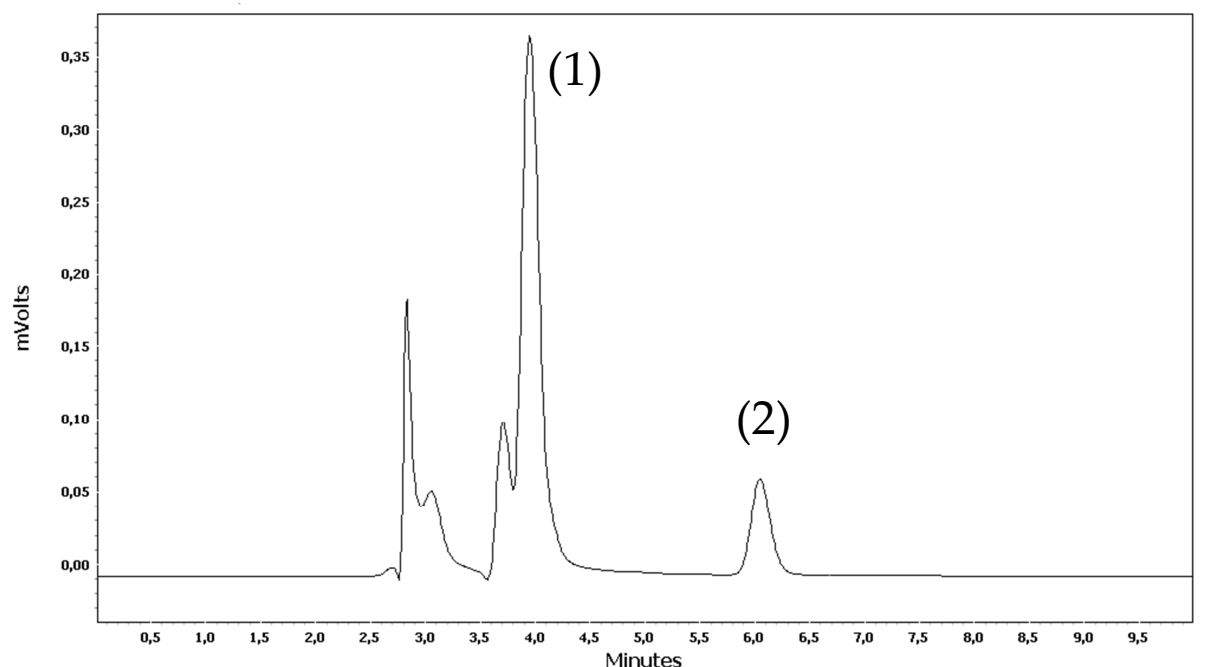


Abb. 4.3.11 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von N-Hydroxyadenosin und Adenosin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien 3 mM N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH und 250 μ M Adenosin in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). (1) N-Hydroxyadenosin; (2) Adenosin

4.3.5.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade war im Konzentrationsbereich von 0,5-500 μM linear ($R^2 = 0,9999$). Die Richtigkeit für den ermittelten Bestimmungsbereich (0,5-500 μM) betrug $100 \pm 1\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (0,5 μM) die Richtigkeit einen Wert von 113% aufwies.

Die mithilfe der Kalibriergeraden ermittelte Wiederfindung betrug im Konzentrationsbereich von 1-500 μM $203 \pm 143\%$. Dies war auf die etwa 0,1%ige Verunreinigung des Substrates mit Metabolit zurückzuführen, die mittels HPLC ermittelt wurde. Um diese Verunreinigung bei künftigen Inkubationsansätzen zu berücksichtigen, wurde diese von den Werten zur Quantifizierung der enzymatisch gebildeten Metabolitenkonzentration abgezogen.

Dadurch ergab sich im Bestimmungsbereich von 1-500 μM eine durchschnittliche Richtigkeit von $114 \pm 18\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (1 μM) die Richtigkeit 72% betrug (Abb. 4.3.12).

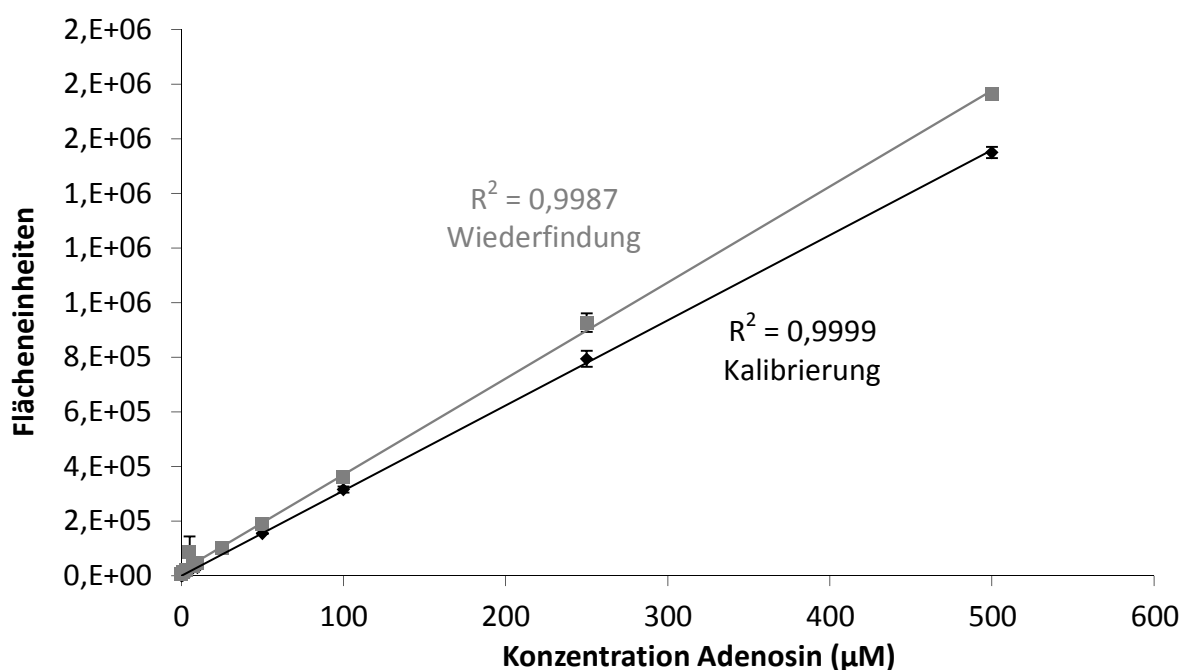


Abb. 4.3.12 Kalibrierung und Wiederfindung von Adenosin

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Durchführung sind in Kapitel 4.2.7.2 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.5.3. Stabilität

Die Bestimmung der Stabilität zeigt, dass der Metabolit Adenosin über 24 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler stabil ist (Abb. 4.3.13). Nach 24 Stunden waren noch $102 \pm 1\%$ Adenosin nachweisbar. Die Konzentration des Substrates *N*-Hydroxyadenosin konnte aufgrund der mangelnden Peaksymmetrie nicht bestimmt werden. Allerdings blieb die Verunreinigung des Substrates mit etwa 0,1% Metabolit über den beobachteten Zeitraum konstant ($101 \pm 1\%$ nach 10 Stunden und $107 \pm 3\%$ nach 24 Stunden) und konnte daher bei künftigen Inkubationsansätzen subtrahiert werden.

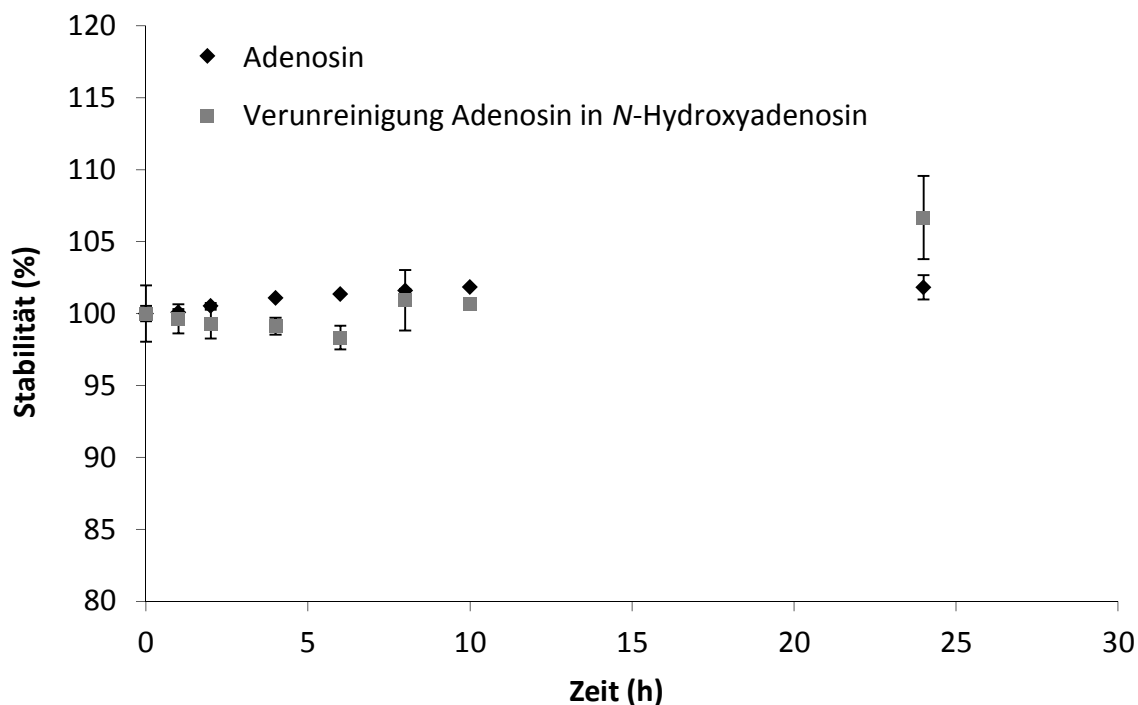


Abb. 4.3.13 Stabilität von Adenosin und *N*-Hydroxyadenosin in Puffer/Methanol bei Raumtemperatur

Die Konzentration des Substrats *N*-Hydroxyadenosin betrug 3 mM und die des Metaboliten Adenosin 250 μ M. Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.7.3 beschrieben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei verschiedenen Ansätzen.

4.3.6. *In vitro* Biotransformationsstudien mit N-hydroxylierten Basenanaloga

4.3.6.1. Reduktion durch porcine Enzymquellen

4.3.6.1.1. Subzelluläre hepatische Fraktionen

Die Umsetzung von N-hydroxylierten Basenanaloga wurde mit verschiedenen subzellulären Fraktionen getestet. Dabei konnte sowohl bei den N-hydroxylierten Nucleobasen N-Hydroxycytosin und N-Hydroxyadenin als auch bei den N-hydroxylierten Nucleosiden N-Hydroxycytidin und N-Hydroxyadenosin eine Reduktion zur korrespondierenden Nucleobase bzw. zum korrespondierenden Nucleosid festgestellt werden. Die Metabolite wurden mit der beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert.

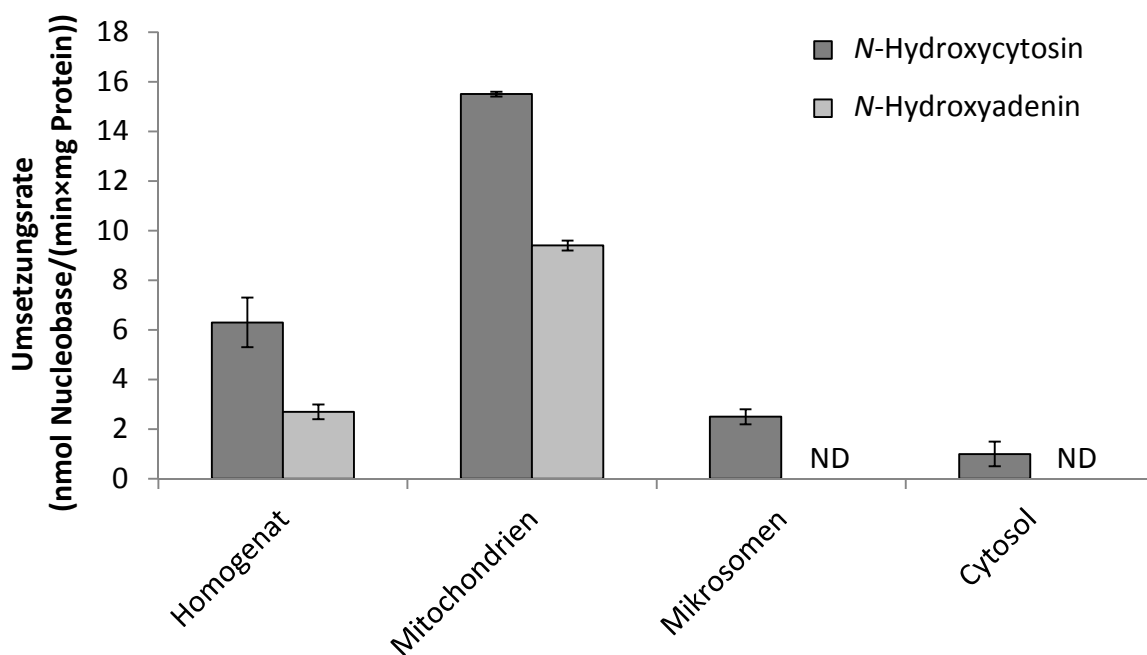


Abb. 4.3.14 Reduktion von N-Hydroxycytosin und N-Hydroxyadenin durch hepatische subzelluläre Fraktionen

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg subzelluläre Fraktion, 4 mM N-Hydroxycytosin bzw. 1,5 mM N-Hydroxyadenin, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 1,5 nmol Cytosin/(min×mg Protein) bzw. 3 nmol Adenin/(min×mg Protein). (ND = nicht detektierbar)

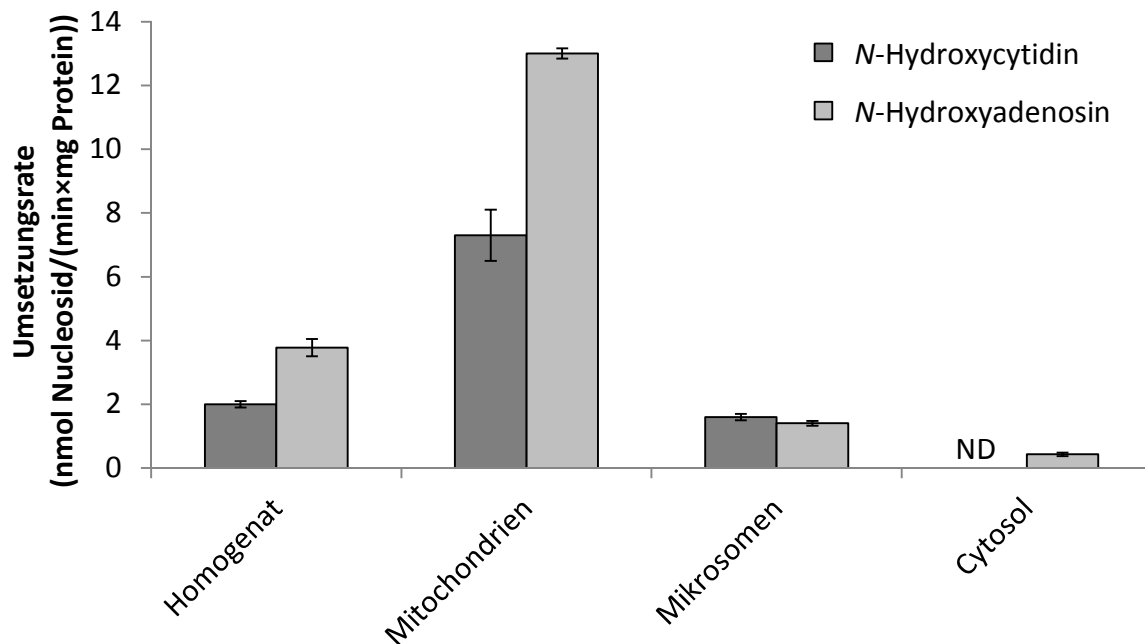


Abb. 4.3.15 Reduktion von N-Hydroxycytidin und N-Hydroxyadenosin durch hepatische subzelluläre Fraktionen

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg subzelluläre Fraktion, 3 mM N-Hydroxycytidin bzw. 6 mM N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat eventuell vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 1,5 nmol Cytidin/(min x mg Protein) bzw. 0,3 nmol Adenosin/(min x mg Protein). (ND = nicht detektierbar)

Die höchsten Umsetzungsrate wurden bei allen getesteten N-hydroxylierten Basenanaloga in den Mitochondrien detektiert (Anreicherungsfaktor 2 bis 4), wohingegen in den Mikrosomen und im Cytosol nur geringe Umsetzungen beobachtet werden konnten (Abb. 4.3.14 und Abb. 4.3.15). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung bei allen getesteten N-hydroxylierten Basenanaloga vom Cofaktor NADH abhängig ist (Daten nicht gezeigt).

4.3.6.1.2. Bestimmung der kinetischen Parameter der mitochondrialen hepatischen Fraktion

Da gezeigt werden konnte, dass die *N*-reduktive Aktivität bei allen getesteten *N*-hydroxylierten Nucleobasen und Nucleosiden in den Mitochondrien angereichert ist, wurden die kinetischen Parameter K_m und v_{max} der Umsetzung von *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin sowie von *N*-Hydroxycytidin und *N*-Hydroxyadenosin mit porcinen Lebermitochondrien bestimmt.

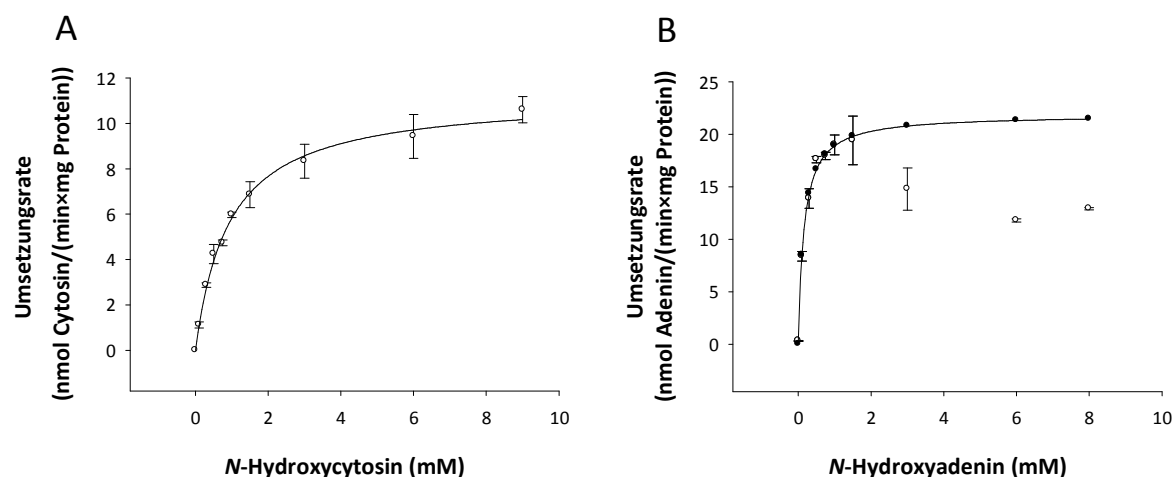


Abb. 4.3.16 Michaelis-Menten-Kinetik von *N*-Hydroxycytosin (A) und *N*-Hydroxyadenin (B) mit porcinen hepatischen Mitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Mitochondrien, 0,1-9 mM *N*-Hydroxycytosin (A) bzw. 0,1-8 mM *N*-Hydroxyadenin (B), 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden über SigmaPlot berechnet.

Dargestellt sind die gemessenen (\circ) und die kalkulierten (\bullet) Werte.

Die Reaktion folgte bei allen getesteten *N*-hydroxylierten Basenanaloga einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 4.3.16 und Abb. 4.3.17). Allerdings wurde die *N*-reduktive Aktivität bei *N*-Hydroxyadenin durch Substratkonzentration über 1 mM gehemmt, so dass für die Berechnung der kinetischen Parameter nur der lineare Bereich (0,1-1,0 mM) des Lineweaver-Burk-Diagramms herangezogen wurde.

Die enzymkinetischen Parameter K_m und v_{max} sind in Tab. 4.3.1 dargestellt.

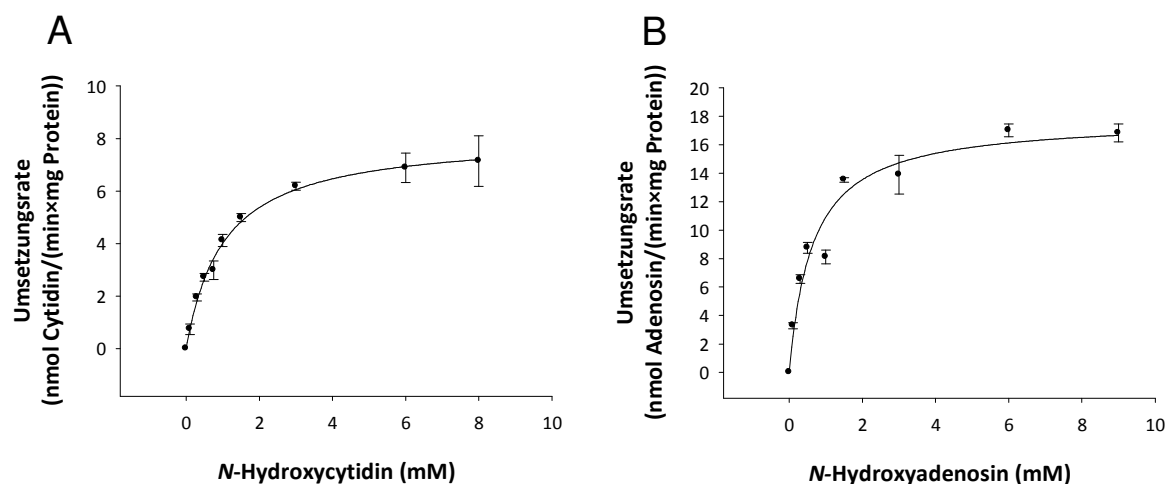


Abb. 4.3.17 Michaelis-Menten-Kinetik von N-Hydroxycytidin (A) und N-Hydroxyadenosin (B) mit porcinen hepatischen Mitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Mitochondrien, 0,1-8 mM N-Hydroxycytidin (A) bzw. 0,1-9 mM N-Hydroxyadenosin (B), 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die gemessenen Werte sind bei N-Hydroxyadenosin um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden über SigmaPlot berechnet.

Tab. 4.3.1 Kinetische Parameter der Reduktion von N-hydroxylierten Basenanaloga durch porcine hepatische Mitochondrien

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (nmol/(min×mg))
N-Hydroxycytosin	0,92 \pm 0,07	11,2 \pm 0,3
N-Hydroxyadenin	0,16* \pm 0,02	21,9* \pm 0,6
N-Hydroxycytidin	1,02 \pm 0,07	8,2 \pm 0,2
N-Hydroxyadenosin	0,63 \pm 0,15	17,8 \pm 1,1

* = Zur Berechnung wurde nur der lineare Bereich des Lineweaver-Burk-Diagramms verwendet (siehe Text)

Zusammensetzung der Inkubationsansätze siehe Abb. 4.3.16 und Abb. 4.3.17.

4.3.6.1.3. Hepatische und extrahepatische Mitochondrien

Des Weiteren sollte die *N*-reduktive Aktivität extrahepatischer Mitochondrien bestimmt und mit der hepatischen Aktivität verglichen werden. Dabei konnte in allen getesteten extrahepatischen Geweben eine *N*-reduktive Aktivität gezeigt werden, mit den höchsten Umsetzungsraten, bezogen auf Milligramm Gesamtprotein, in den mitochondrialen Fraktionen von Schilddrüse, Niere, Pankreas und Leber (Abb. 4.3.18 und Abb. 4.3.19).

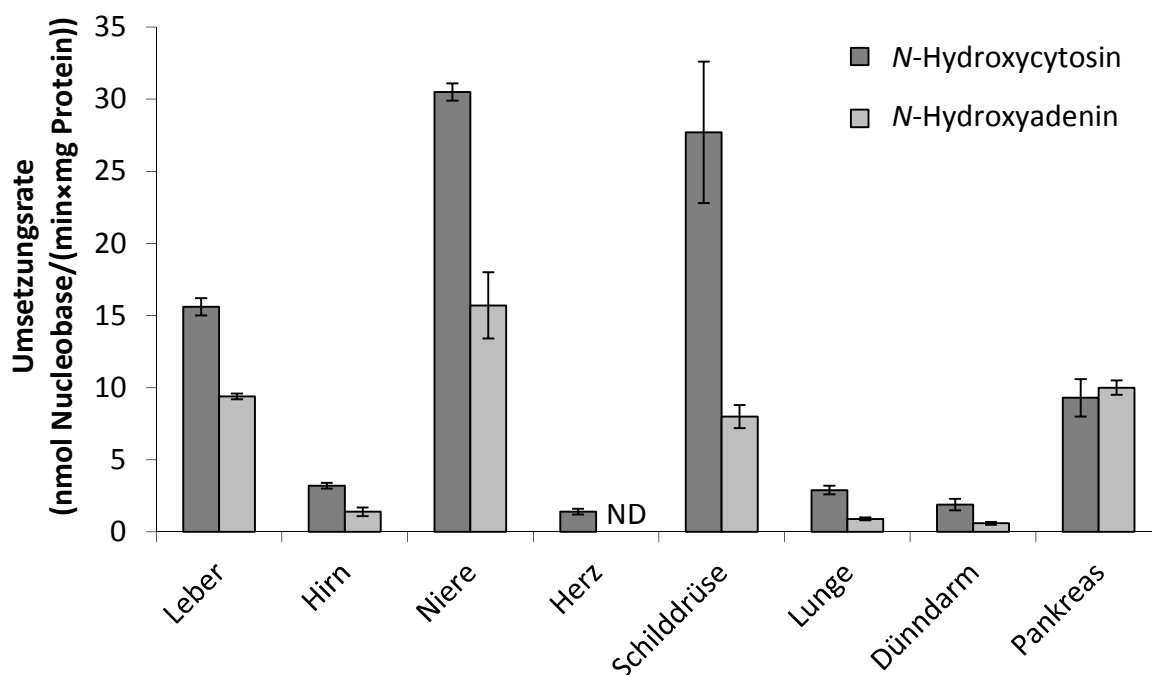


Abb. 4.3.18 Reduktion von *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin durch hepatische und extrahepatische Mitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,01-0,1 mg Mitochondrien, 4 mM *N*-Hydroxycytosin bzw. 1,5 mM *N*-Hydroxyadenin, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag mit 0,05 mg Protein bei 1,5 nmol Cytosin/(min x mg Protein) bzw. 3 nmol Adenin/(min x mg Protein). (ND = nicht detektierbar)

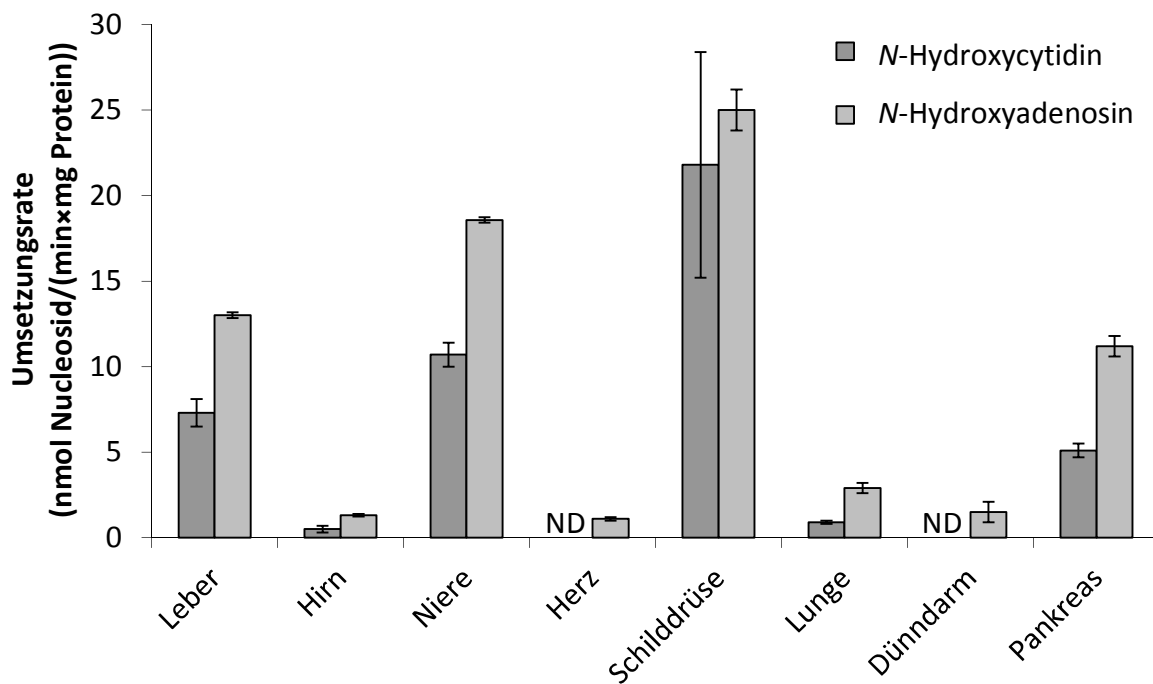


Abb. 4.3.19 Reduktion von N-Hydroxycytidin und N-Hydroxyadenosin durch hepatische und extrahepatische Mitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,01-0,1 mg Mitochondrien, 1,5 mM N-Hydroxycytidin bzw. 6 mM N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die gemessenen Werte sind bei N-Hydroxyadenosin um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bestimmungsgrenze lag mit 0,05 mg Protein bei 1,5 nmol Cytidin/(min×mg Protein) bzw. 0,3 nmol Adenosin/(min×mg Protein). (ND = nicht detektierbar)

4.3.6.2. Reduktion durch rekombinante humane und pflanzliche mARC-Homologe im rekonstituierten System

4.3.6.2.1. Einfluss der Enzymcharge

Anhand der Reduktion der Nucleobase *N*-Hydroxycytosin und des Modellsubstrats Benzamidoxim durch das rekombinante humane Enzymsystem sollte der Einfluss verschiedener Enzymchargen auf die Umsetzungsraten bestimmt werden. Dafür wurden drei verschiedene mARC-Chargen getestet während die Cytochrom *b*₅- und Cytochrom *b*₅ Reduktase-Charge konstant blieben.

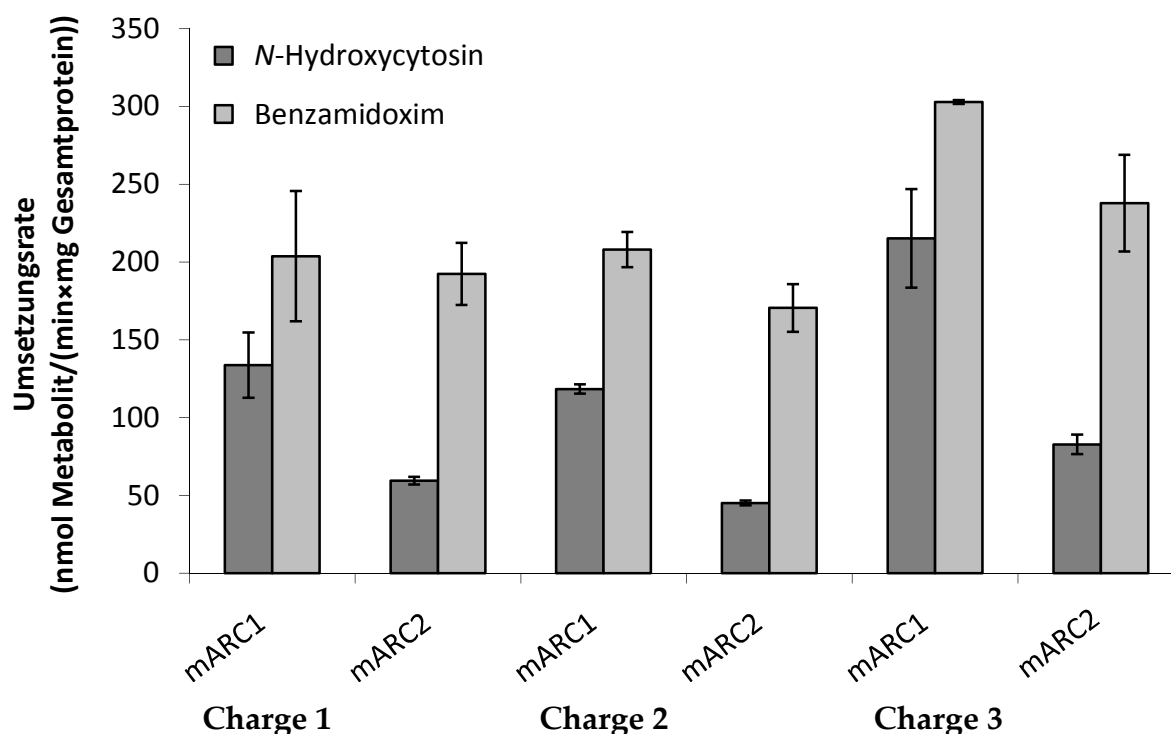


Abb. 4.3.20 Einfluss der Enzymcharge auf die Reduktion von *N*-Hydroxycytosin und des Modellsubstrats Benzamidoxim

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 7,5 µg mARC, 75 pmol Cytochrom *b*₅, 7,5 pmol Cytochrom *b*₅ Reduktase, 4 mM *N*-Hydroxycytosin oder 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind bei *N*-Hydroxycytosin um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Wie man in Abb. 4.3.20 erkennen kann, lassen sich mit Charge 3 etwas höhere Umsetzungsraten erzielen wie mit Charge 1 und 2. Das Modellsubstrat Benzamidoxim wird von mARC1 und mARC2 in allen drei Chargen etwa gleich gut umgesetzt, während *N*-Hydroxycytosin bei jeder Charge von mARC1 deutlich besser als von mARC2 umgesetzt wird. Wie man auch in Tab. 4.3.2 erkennen kann, bleibt die Umsetzungsrate von *N*-Hydroxycytosin bezogen auf die Umsetzung von Benzamidoxim bei jeder mARC-Charge immer konstant. Bei der Umsetzung von *N*-Hydroxycytosin mit mARC1 werden im Schnitt 65% und mit mARC2 etwa 30% der Umsetzung des Modellsubstrates Benzamidoxim erreicht.

Tab. 4.3.2 Vergleich der Umsetzungsraten von Benzamidoxim und *N*-Hydroxycytosin mit verschiedenen mARC-Chargen bezogen auf die Umsetzung von Benzamidoxim in Prozent

	Charge 1		Charge 2		Charge 3	
	mARC1	mARC2	mARC1	mARC2	mARC1	mARC2
Benzamidoxim [%]	100	100	100	100	100	100
<i>N</i> -Hydroxycytosin [%]	66	31	57	26	71	35

Das heißt die mARC-Charge hat zwar einen geringen Einfluss auf die Höhe der Umsetzungsrate, allerdings bleibt die Tendenz zwischen mARC1 und mARC2 bei jeder Charge gleich. Alle folgenden *in vitro* Biotransformationsstudien wurden mit der Charge 2 durchgeführt.

4.3.6.2.2. Ermittlung der optimalen Stöchiometrie

Um möglichst hohe Umsetzungsraten erzielen zu können, sollten im Vorfeld die stöchiometrischen Verhältnisse des Dreikomponenten-Enzymsystems bestehend aus mARC, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase basierend auf den Arbeiten von Plitzko (2010) optimiert werden. Alle drei Komponenten wurden nach ihrem molaren Cofaktor-Gehalt eingesetzt (Bestimmung siehe Kapitel 2.2.3). Es wurden konstant 160 pmol Gesamtcofaktor pro Ansatz verwendet, wobei Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase in einem Verhältnis von 1:1 oder 10:1 vorlagen und mARC1 oder mARC2 in einem Verhältnis von 0-100 Teilen dazugegeben wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei mARC1 (Abb. 4.3.21) als auch bei mARC2 (Abb. 4.3.22) ein Cytochrom b₅ zu Cytochrom b₅ Reduktase Verhältnis von 10:1 gegenüber 1:1 deutlich bevorzugt ist. Die höchsten Umsetzungsraten wurden dabei erzielt, wenn mARC in einem Verhältnis von 10-20 Teilen in einem Ansatz aus 10 Teilen Cytochrom b₅ und 1 Teil Cytochrom b₅ Reduktase enthalten war. Für alle weiteren Inkubationsansätze wurden die drei Komponenten mARC, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase in einem Verhältnis von 10:10:1 eingesetzt, was bei 160 pmol Gesamtcofaktormenge 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b₅ und 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase entspricht. Dieses Ergebnis konnte bei mARC2 für zwei weitere mARC-Chargen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

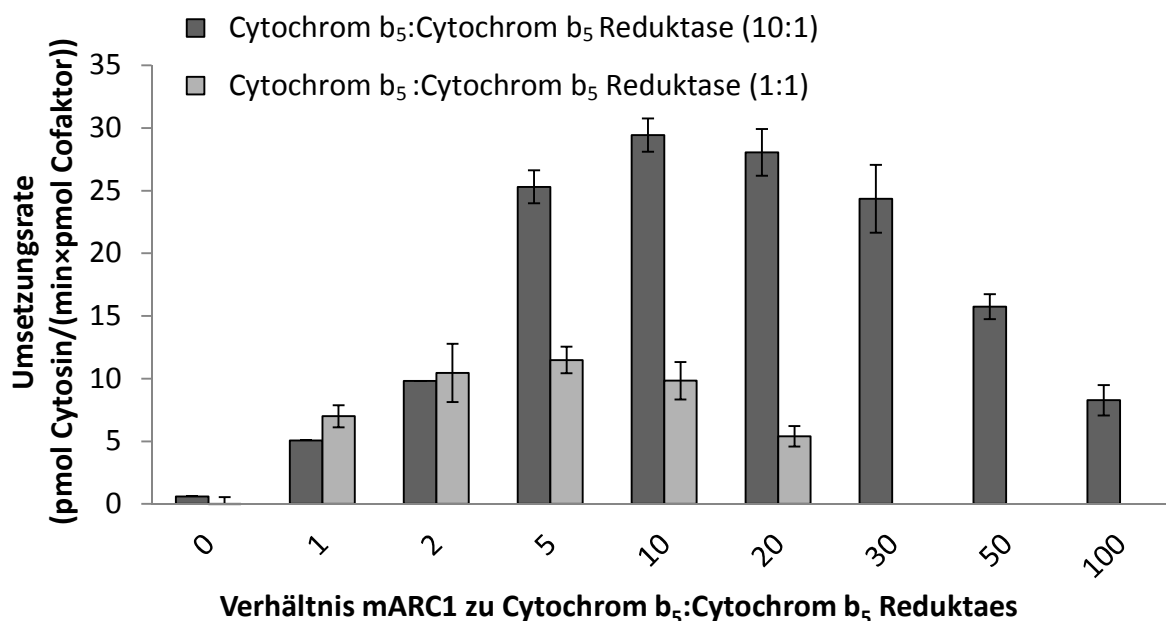


Abb. 4.3.21 Umsetzung von *N*-Hydroxycytosin in Abhängigkeit vom Verhältnis mARC1 zu Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase

Zusammensetzung der Inkubationsansätze siehe Abb. 4.3.22.

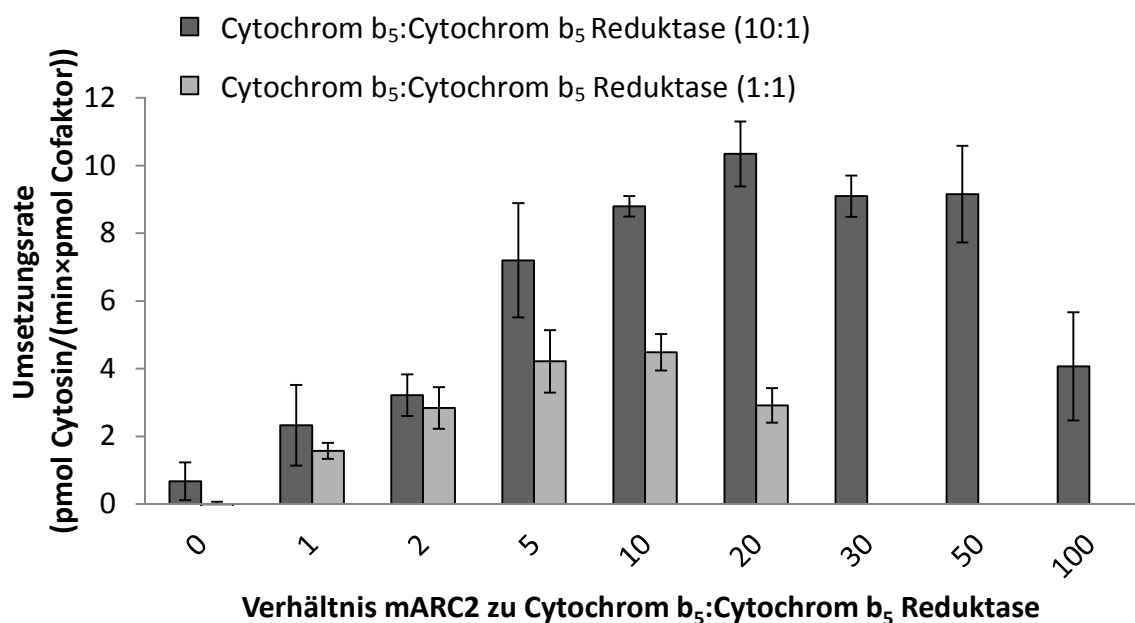


Abb. 4.3.22 Umsetzung von *N*-Hydroxycytosin in Abhängigkeit vom Verhältnis mARC2 zu Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0-145,5 pmol mARC1 oder mARC2 (Abb. 4.3.22), 7,3-145,5 pmol Cytochrom b₅, 1,4-80 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 1 mM NADH, 4 mM *N*-Hydroxycytosin in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.6.2.3. Einfluss der Inkubationszeit

Die Reduktion der N-hydroxylierten Nucleobasen durch das rekombinante Enzymsystem verlief über einen Zeitraum von mindestens 20 Minuten linear. Danach nahm die Umsetzungsgeschwindigkeit ab (Abb. 4.3.23). Daher wurde für künftige Inkubationen eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt.

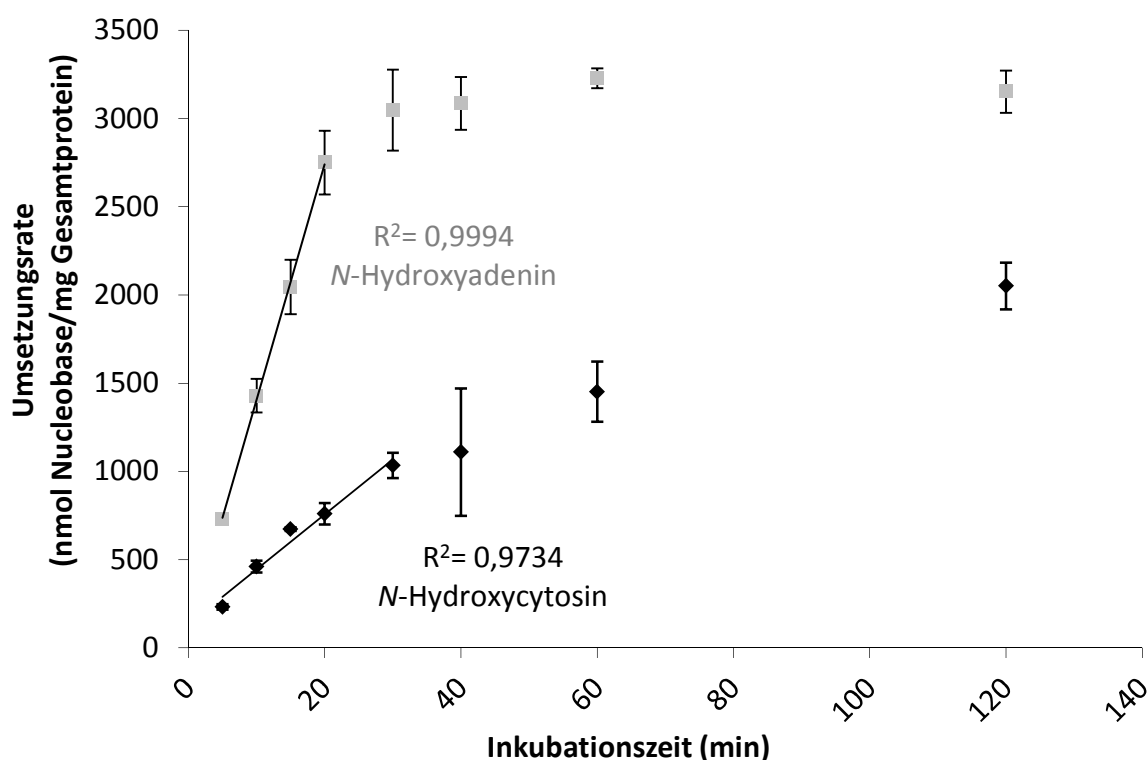


Abb. 4.3.23 Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von N-Hydroxycytosin und N-Hydroxyadenin durch das rekombinante Enzymsystem

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC2 (N-Hydroxycytosin) bzw. mARC1 (N-Hydroxyadenin), 76,2 pmol Cytochrom *b₅*, 7,6 pmol Cytochrom *b₅* Reduktase, 1 mM NADH, 4 mM N-Hydroxycytosin bzw. 3 mM N-Hydroxyadenin in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit wurde zwischen 5 und 120 Minuten variiert.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Auch die Reduktion der *N*-hydroxylierten Nucleoside durch das rekombinante Enzymsystem verlief über einen Zeitraum von etwa 20 Minuten linear. Danach nahm die Umsetzungsgeschwindigkeit ab (Abb. 4.3.24). Daher wurde für künftige Inkubationen eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt.

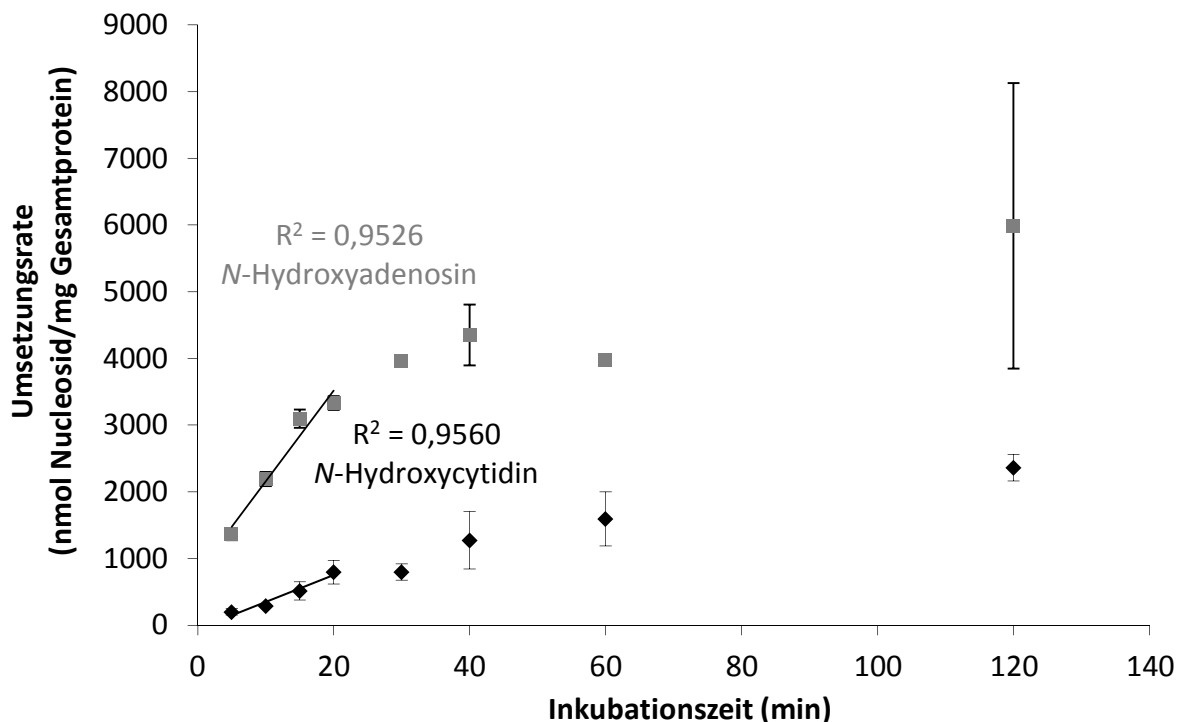


Abb. 4.3.24 Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von *N*-Hydroxycytidin und *N*-Hydroxyadenosin durch das rekombinante Enzymsystem

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol *mARC2* (*N*-Hydroxycytidin) bzw. *mARC1* (*N*-Hydroxyadenosin), 76,2 pmol Cytochrom *b₅*, 7,6 pmol Cytochrom *b₅* Reduktase, 1 mM NADH, 3 mM *N*-Hydroxycytidin bzw. 3 mM *N*-Hydroxyadenosin in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit wurde zwischen 5 und 120 Minuten variiert.

Die gemessenen Werte sind bei *N*-Hydroxyadenosin um die im Substrat vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.6.2.4. Bestimmung der kinetischen Parameter

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante mARC-haltige Enzymsystem getestet. Sowohl die Reduktion durch das humane als auch durch das pflanzliche Enzymsystem folgte bei allen getesteten *N*-hydroxylierten Nucleobasen und Nucleosiden mit jeweils beiden mARC-Homologen einer Michaelis-Menten-Kinetik.

Allerdings wird die *N*-reduktive Aktivität beim *N*-Hydroxyadenin außer beim humanen mARC2 durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt, so dass für die Berechnung der kinetischen Parameter beim humanen mARC1 (0,1-1,0 mM) und den beiden pflanzlichen mARC-Homologen (0,1-3,0 mM pmARC1/0,1-1,5 mM pmARC2) nur der lineare Bereich des Lineweaver-Burk-Diagramms herangezogen wurde (Abb. 4.3.25).

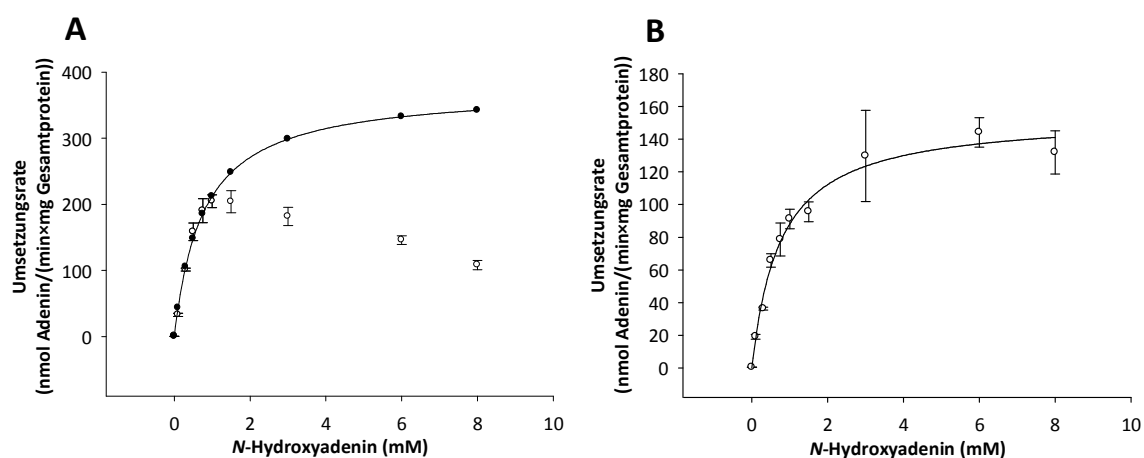


Abb. 4.3.25 Michaelis-Menten-Kinetik von *N*-Hydroxyadenin mit rekombinatem humanen mARC1 (A) und mARC2 (B)

Zusammensetzung der Inkubationsansätze siehe Tab. 4.3.3 und Tab. 4.3.4. Dargestellt sind die gemessenen (\circ) und die kalkulierten (\bullet) Werte.

Die enzymkinetischen Parameter K_m und v_{max} sind in Tab. 4.3.3 und Tab. 4.3.4 dargestellt.

Tab. 4.3.3 Kinetische Parameter der Reduktion von N-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante humane Enzym-system

Substrat	mARC Isoform	K_m (mM)	V_{max} (nmol/(min×mg))	katalytische Effizienz (1/(M×s))
N-Hydroxycytosin	hmARC1	0,52 ± 0,14	174,1 ± 12,6	2100
	hmARC2	1,52 ± 0,28	65,3 ± 4,4	260
N-Hydroxyadenin	hmARC1	0,77* ± 0,20	375,1* ± 51,5	3000
	hmARC2	0,72 ± 0,11	120,2 ± 5,7	1000
N-Hydroxycytidin	hmARC1	0,44 ± 0,04	130,2 ± 3,2	1800
	hmARC2	5,65 ± 0,51	111,1 ± 5,4	120
N-Hydroxyadenosin	hmARC1	0,98 ± 0,11	279,8 ± 10,8	1800
	hmARC2	5,28 ± 1,26	210,9 ± 17,1	520

* = Zur Berechnung wurde nur der lineare Bereich des Lineweaver-Burk-Diagramms verwendet (siehe Text)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom *bs*, 7,6 pmol Cytochrom *bs* Reduktase, 0,1-8,6 mM N-Hydroxycytosin bzw. 0,1-8 mM N-Hydroxyadenin bzw. 0,1-8 mM N-Hydroxycytidin bzw. 0,1-9 mM N-Hydroxyadenosin (mARC1)/1-20 mM N-Hydroxyadenosin (mARC2), 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat eventuell vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden über SigmaPlot berechnet.

Tab. 4.3.4 Kinetische Parameter der Reduktion von N-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante pflanzliche Enzymsystem

Substrat	mARC Isoform	K_m (mM)	V_{max} (nmol/(min×mg))	katalytische Effizienz (1/(M×s))
N-Hydroxycytosin	pmARC1	1,32 ± 0,15	121,6 ± 4,9	570
	pmARC2	0,61 ± 0,10	758,2 ± 37,0	2900
N-Hydroxyadenin	pmARC1	1,83* ± 0,16	804,1* ± 38,2	2700
	pmARC2	0,60* ± 0,15	955,9* ± 102,6	3700
N-Hydroxycytidin	pmARC1	4,40 ± 1,57	379,4 ± 67,0	540
	pmARC2	0,80 ± 0,11	825,5 ± 36,7	2400
N-Hydroxyadenosin	pmARC1	2,51 ± 0,22	945,9 ± 34,8	170
	pmARC2	0,30 ± 0,10	795,9 ± 58,1	6300

* = Zur Berechnung wurde nur der lineare Bereich des Lineweaver-Burk-Diagramms verwendet (siehe Text)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom bs, 7,6 pmol Cytochrom bs Reduktase, 0,1-8,6 mM N-Hydroxycytosin bzw. 0,1-8 mM N-Hydroxyadenin bzw. 0,1-8 mM N-Hydroxycytidin bzw. 0,1-9 mM N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat eventuell vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden über SigmaPlot berechnet.

Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten *N*-hydroxylierten Nucleobasen und Nucleoside durch jeweils beide mARC-Homologe zur korrespondierenden Nucleobase bzw. zum korrespondierenden Nucleosid reduziert werden. Allerdings wiesen die Umsetzungen mit dem humanen Enzymsystem mit hmARC1 höhere v_{\max} -Werte und kleinere K_m -Werte als die Umsetzungen mit hmARC2 auf, was für eine höhere Affinität von hmARC1 zu dem getesteten Substrat spricht.

Bei dem pflanzlichen Enzymsystem verhielt es sich genau anders herum, hier scheint pmARC2 eine höhere Affinität zum Substrat zu besitzen. Dieses lässt sich auch anhand der höheren katalytischen Effizienz für hmARC1 und pmARC2 erkennen.

4.3.6.2.5. Charakterisierung der Reduktion

Zur Bestimmung der Umsetzungsraten und Charakterisierung der Reduktion der *N*-hydroxylierten Nucleobasen *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin sowie der *N*-hydroxylierten Nucleoside *N*-Hydroxycytidin und *N*-Hydroxyadenosin wurden Inkubationen mit dem rekombinanten Enzymsystem bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase und unter Austausch einzelner Komponenten durch äquivalente Mengen an Puffer durchgeführt. Dabei wurden die Substratkonzentrationen so gewählt, dass diese im gesättigten Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik lagen.

Wie man Tab. 4.3.5 und Tab. 4.3.6 entnehmen kann, konnten die höchsten Umsetzungen zur korrespondierenden Nucleobase Cytosin bzw. Adenin sowie zum korrespondierenden Nucleosid Cytidin bzw. Adenosin sowohl für das humane als auch für das pflanzliche System nur mit dem kompletten Enzymsystem detektiert werden. Das Fehlen einer Komponente führte zu einem starken Verlust (mindestens > Faktor 6) oder sogar zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Die Reaktion ist abhängig vom Cofaktor NADH.

Tab. 4.3.5 Umsetzung von N-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante humane Enzymsystem

Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol Metabolit/(min×mg Gesamtprotein))							
	N-Hydroxycytosin		N-Hydroxyadenin		N-Hydroxycytidin		N-Hydroxyadenosin	
	hmARC1	hmARC2	hmARC1	hmARC2	hmARC1	hmARC2	hmARC1	hmARC2
komplett	118,9 ± 26,6	36,6 ± 2,7	180,8 ± 3,6	133,5 ± 2,0	103,1 ± 38,7	50,2 ± 2,8	186,0 ± 24,4	105,3 ± 8,7
- NADH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
- Cytochrom b ₅	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
- Cytochrom b ₅ Reduktase	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,1
- mARC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
- Protein	-	-	-	-	-	-	-	-
- Substrat	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = nicht detektierbar

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b₅, 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 4 mM N-Hydroxycytosin bzw. 3 mM N-Hydroxyadenin bzw. 3 mM N-Hydroxycytidin (mARC1)/10 mM N-Hydroxycytidin (hmARC2) bzw. 6 mM N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat eventuell vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 3,7 nmol Cytosin/(min×mg Gesamtprotein) bzw. 7,3 nmol Adenin/(min×mg Gesamtprotein) bzw. 3,7 nmol Cytidin/(min×mg Gesamtprotein) bzw. 0,7 nmol Adenosin/(min×mg Gesamtprotein). Umsetzungsdaten, die nicht detektiert werden bzw. unterhalb dieser Bestimmungsgrenze liegen, konnten nicht quantifiziert werden (ND).

Tab. 4.3.6 Umsetzung von N-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante pflanzliche Enzymsystem

Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol Metabolit/(min×mg Gesamtprotein))							
	N-Hydroxycytosin		N-Hydroxyadenin		N-Hydroxycytidin		N-Hydroxyadenosin	
	pmARC1	pmARC2	pmARC1	pmARC2	pmARC1	pmARC2	pmARC1	pmARC2
komplett	117,3 ± 6,2	625 ± 17,1	483,2 ± 19,0	553,7 ± 21,5	83,8 ± 8,2	711,1 ± 30,8	594,0 ± 17,7	546,4 ± 81,7
- NADH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
- Cytochrom b ₅	18,4 ± 22,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
- Cytochrom b ₅ Reduktase	ND	ND	ND	ND	11,0 ± 0,7	10,0 ± 1,1	4,9 ± 0,2	3,9 ± 0,8
- mARC	ND	13,6 ± 18,4	ND	ND	ND	ND	10,3 ± 0,8	12,1 ± 7,2
- Protein	-	-	-	-	-	-	-	-
- Substrat	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = nicht detektierbar

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b₅, 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 4 mM N-Hydroxycytosin bzw. 3 mM N-Hydroxyadenin bzw. 6 mM N-Hydroxycytidin (mARC1)/3 mM N-Hydroxycytidin (mARC2) bzw. 6 mM N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat eventuell vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 9,2 nmol Cytosin/(min×mg Gesamtprotein) bzw. 19,0 nmol Adenin/(min×mg Gesamtprotein) bzw. 10,5 nmol Cytidin/(min×mg Gesamtprotein) bzw. 1,9 nmol Adenosin/(min×mg Gesamtprotein). Umsetzungsraten, die nicht detektiert werden bzw. unterhalb dieser Bestimmungsgrenze liegen, konnten nicht quantifiziert werden (ND).

4.3.6.3. Reduktion durch rekombinante prokaryotische Enzymquellen im rekonstituierten System

Um die Umsetzung der *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante prokaryotische Enzymsystem zu quantifizieren, wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion getestet. Sowohl die Umsetzung durch YcbX als auch durch YiiM folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik.

Allerdings wird die *N*-reduktive Aktivität bei YcbX durch hohe Substratkonzentrationen an *N*-Hydroxyadenin gehemmt, so dass für die Berechnung der kinetischen Parameter in diesem Fall nur der lineare Bereich (0,3-1,0 mM) des Lineweaver-Burk-Diagramms herangezogen wurde (Abb. 4.3.26).

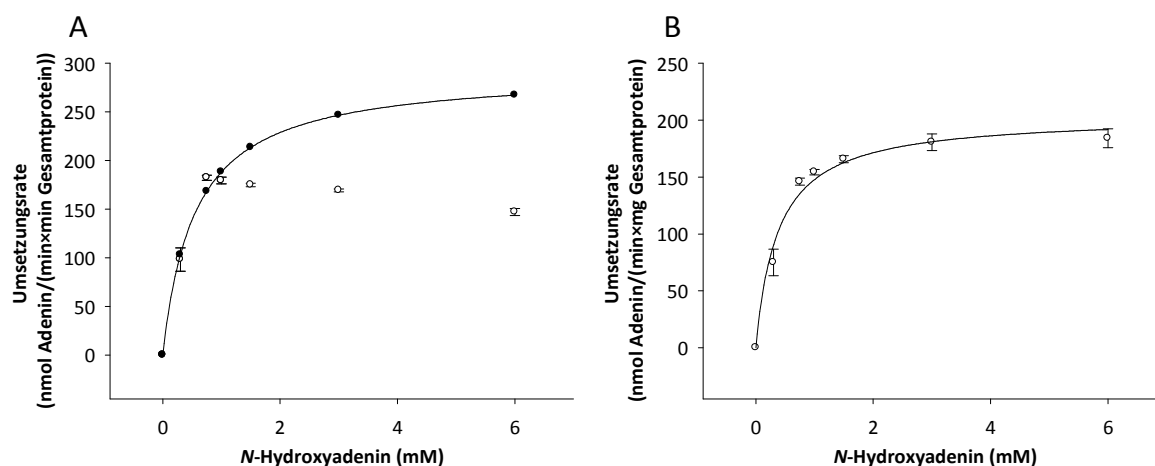


Abb. 4.3.26 Michaelis-Menten-Kinetik von *N*-Hydroxyadenin mit rekombinatem prokaryotischen YcbX (A) und YiiM (B)

Zusammensetzung der Inkubationsansätze siehe Tab. 4.3.7 und Tab. 4.3.8. Dargestellt sind die gemessenen (○) und die kalkulierten (●) Werte.

Die aus der Substratabhängigkeit bestimmten enzymkinetischen Parameter K_m und v_{max} sind in Tab. 4.3.7 und Tab. 4.3.8 dargestellt.

Tab. 4.3.7 Kinetische Parameter der Reduktion von N-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante prokaryotische YcbX

Substrat	K_m (mM)	v_{max} (nmol/(min×mg))	katalytische Effizienz (1/(M×s))
N-Hydroxycytosin	0,41 ± 0,08	171,4 ± 8,2	350
N-Hydroxyadenin	0,55* ± 0,25	291,7* ± 58,0	450
N-Hydroxycytidin	0,30 ± 0,07	162,8 ± 7,8	460
N-Hydroxyadenosin	0,24 ± 0,08	201,5 ± 11,8	710

* = Zur Berechnung wurde nur der lineare Bereich des Lineweaver-Burk-Diagramms verwendet (siehe Text)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YcbX, 5 µg CysJ, 0,3-6 mM N-Hydroxycytosin bzw. N-Hydroxyadenin bzw. N-Hydroxycytidin bzw. N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADPH in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat eventuell vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden über SigmaPlot berechnet.

Tab. 4.3.8 Kinetische Parameter der Reduktion von N-hydroxylierten Basenanaloga durch das rekombinante prokaryotische YiiM

Substrat	K_m (mM)	v_{max} (nmol/(min×mg))	katalytische Effizienz (1/(M×s))
N-Hydroxycytosin	3,18 ± 1,16	139,0 ± 25,7	20
N-Hydroxyadenin	0,38 ± 0,07	203,9 ± 9,1	290
N-Hydroxycytidin	4,97 ± 0,53	116,8 ± 7,3	10
N-Hydroxyadenosin	0,31 ± 0,06	176,9 ± 7,5	310

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YiiM, 5 µg Fre, 0,5 mM FAD, 0,3-6 mM N-Hydroxycytosin bzw. N-Hydroxyadenin bzw. N-Hydroxycytidin bzw. N-Hydroxyadenosin, 1 mM NADH in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die gemessenen Werte sind um die im Substrat eventuell vorhandene Metabolitenverunreinigung korrigiert. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden über SigmaPlot berechnet.

Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch jeweils beide prokaryotischen MOSC-Proteine zur korrespondierenden Nucleobase bzw. zum korrespondierenden Nucleosid reduziert werden. Die Umsetzungen mit YcbX weisen dabei für alle *N*-hydroxylierten Basenanaloga in etwa gleiche v_{\max} - und K_m -Werte auf. Bei den Umsetzungen der *N*-hydroxylierten Purine *N*-Hydroxyadenin und *N*-Hydroxyadenosin konnten allerdings mit YiiM kleinere K_m -Werte bestimmt werden als für die *N*-hydroxylierten Pyrimidine, was für eine höhere Affinität von YiiM zu den *N*-hydroxylierten Purinen spricht.

4.4. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mARC an der Detoxifizierung von toxischen und mutagenen *N*-hydroxylierten Nucleobasen beteiligt ist. Des Weiteren konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch *N*-hydroxylierte Nucleoside vom mARC-haltigen System umgesetzt werden.

Alle bisher untersuchten Organismen besitzen zwei mARC-Gene, die auf Nucleinsäure und Aminosäure-Ebene sehr ähnlich sind. Die Beteiligung beider mARC-Proteine bei der Reduktion von *N*-hydroxylierten Substraten konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden. Dabei werden nicht nur Amidoxime wie z.B. das Modellsubstrat Benzamidoxim und das Benzylamidoxim (siehe Kapitel 2) sondern auch *N*-hydroxylierte Guanidine und Sulfhydroxamsäuren reduziert (Grünwald *et al.*, 2008). Allerdings sind die mARC Proteine nicht alleine aktiv sondern nur im Dreikomponenten-Enzymsystem mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase. Die Elektronen werden dabei vom NADH über die Cytochrom b_5 Reduktase und das Cytochrom b_5 auf das mARC Protein übertragen, am mARC Protein findet dann die Reduktion *N*-hydroxylierter Substanzen statt.

Die Lokalisierung von mARC in den Mitochondrien konnte bereits in Kapitel 2 durch die Anreicherung der Umsetzungsrate des Modellsubstrats Benzamidoxim in dieser Fraktion und durch Westernblots mit den spezifischen mARC-Antikörpern bestätigt werden. Die geringen Umsetzungsraten die in den Mikrosomen detektiert wurden, gehen vermutlich auf eine Verunreinigung der mikrosomalen Fraktion mit Mitochondrien zurück, was auch im Westernblot durch das Auftreten der leichten-mARC2-Bande in den Mikrosomen bestätigt wird (Abb. 2.3.1). Sowohl die Umsetzung der *N*-hydroxylierten Nucleobasen *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin als auch der *N*-hydroxylierten Nucleoside *N*-Hydroxycytidin und *N*-Hydroxyadenosin war in der mitochondrialen Fraktion angereichert. Dabei wurden diese jeweils zur korrespondierenden Nucleobase oder zum korrespondie-

renden Nucleosid reduziert. Dass eine Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in der mitochondrialen Fraktion für alle *N*-hydroxylierten Basenanaloga genauso wie für das Modellsubstrat Benzamidoxim gezeigt werden konnte, spricht dafür, dass diese Reduktionen durch das gleiche Enzymsystem auf eine ähnliche Art und Weise stattfinden. Die höchsten Umsetzungsraten konnten dabei für die Purinderivate bestimmt werden, wobei die Aktivitäten etwa doppelt so hoch waren wie für die entsprechenden Pyrimidinderivate.

Interessanterweise konnte die Reduktion von *N*-Hydroxyadenin bereits durch die Xanthinoxidase, welche ebenfalls ein molybdänhaltiges Enzym dargestellt, gezeigt werden (Clement und Kunze, 1992). Da in dieser Arbeit allerdings eindeutig die Anreicherung der Reduktion von *N*-Hydroxyadenin zu Adenin in den Mitochondrien gezeigt werden konnte, kann man davon ausgehen, dass die mARC-abhängige Reduktion gegenüber dem cytosolischen Weg bevorzugt ist.

Neben der hepatischen Reduktion von *N*-hydroxylierten Basenanaloga wiesen alle getesteten extrahepatischen Gewebe eine Detoxifizierung zur entsprechenden Nucleobase bzw. zum entsprechenden Nucleosid auf.

Dabei konnten beide mARC-Proteine in allen getesteten Geweben mittels Western-blot und spezifischen Antikörpern detektiert werden (Krompholz *et al.*, 2012) und auch die *N*-reduktive Aktivität des Modellsubstrates Benzamidoxim korreliert mit der Umsetzung aller getesteten *N*-hydroxylierten Basenanaloga. Die jeweils höchsten Umsetzungsraten wurden in den Mitochondrien von Leber, Niere, Pankreas und Schilddrüse detektiert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit zuvor beschriebenen Studien, die die höchste *N*-reduktive Aktivität in Leber, Niere und Schilddrüse nachweisen konnten (Clement *et al.*, 2005; Krischkowski, 2010). Außerdem postuliert eine mRNA-Expressionsanalyse für mARC neben einer hohen Expression in der Leber eine hohe Expression von mARC2 in der Schilddrüse (Su *et al.*, 2004). Diese Übereinstimmung stellt einen weiteren Hinweis darauf dar, dass die Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim und die Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten

Basenanaloga durch ein und dasselbe System stattfinden. Andere Arbeitskreise konnten auch in humanem Blut neben einer Desaminierung eine Reduktion von *N*-Hydroxycytidin zu Cytidin nachweisen (Hernandez-Santiago *et al.*, 2004). Diese Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen im Blut spielt nicht nur bei der Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga sondern auch bei der Entwicklung von Prodrugs eine wichtige Rolle und sollte Bestandteil weiterer Untersuchungen sein (Krischkowski, Dissertation in Vorbereitung).

Bevor *in vitro* Biotransformationsversuche mit dem rekombinanten mARC-abhängigen Enzymsystem zur Umsetzung *N*-hydroxylierter Nucleobasen und Nucleoside durchgeführt wurden, sollten einige Parameter der Inkubationsbedingungen weiter optimiert werden.

Da durch einen Wechsel des Puffersystems von 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) zu 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) die Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim um den Faktor 4 gesteigert werden konnte (Plitzko, 2010), wurde dieses Puffersystem auch in diesen Studien verwendet.

Außerdem sollte untersucht werden, welches das optimale Verhältnis der drei Komponenten des Inkubationsansatzes, bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, zueinander ist. Dazu wurde *N*-Hydroxycytosin als Beispielsubstrat verwendet und alle drei Komponenten nach ihrem jeweiligen molaren Cofaktorgehalt eingesetzt. Die totale Cofaktorkonzentration wurde mit 160 pmol, was in etwa der in früheren Studien verwendeten Enzymmenge entsprach, immer konstant gehalten (Huang, 1982). In dieser Arbeit erwies sich ein Verhältnis mARC: Cytochrom b_5 : Cytochrom b_5 Reduktase von 10:10:1 als optimal, so dass für alle Inkubationsansätze 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b_5 und 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase verwendet wurden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten aus vorangegangenen Studien, die mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim und 550 pmol Cofaktor ein optimales Cytochrom b_5 zu Cytochrom b_5 Reduktase-Verhältnis von 1:1 bis 1:10 ermittelt hatten (Plitzko, 2010).

Die Beteiligung von mARC an der Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basenanaloga konnte durch die Verwendung des rekombinanten humanen und pflanzlichen Dreikomponenten-Enzymsystems, bestehend aus mARC, Cytochrom *b*₅ und Cytochrom *b*₅ Reduktase, bestätigt werden. Dabei war jeweils das komplette Enzymsystem in der Lage alle getesteten *N*-hydroxylierten Nucleobasen und Nucleoside zu reduzieren, wobei das Fehlen einer Komponente zum vollständigen oder zumindest teilweisen Verlust der Aktivität führte. Im Zweikomponentensystem waren in der Regel weniger als 3% der Aktivität des kompletten Systems vorhanden. Die höchsten Umsetzungsraten konnten dabei, wie schon mit den Mitochondrien, für die Purinderivate bestimmt werden, wobei die Aktivität des rekombinanten Enzymsystems etwa 15mal höher war.

Die durchgeführten kinetischen Studien mit den rekombinanten Enzymsystemen zeigen, dass *N*-hydroxylierte Basenanaloga für das mARC-haltige Enzymsystem sehr gute Substrate darstellen. Es fällt auf, dass im humanen System mit mARC1 immer höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{\max}) und kleinere Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) bestimmt wurden als mit mARC2, während es sich im pflanzlichen System genau anders herum verhält. Dabei konnten mit dem pflanzlichen System allerdings in der Regel wesentlich höhere Umsetzungsraten erzielt werden, als mit dem humanen System.

Dies konnte bereits zuvor bei Grünewald (2008) beobachtet werden. Auch dort setzte das pflanzliche Enzymsystem das Substrat *N*-Hydroxycytosin etwa 10 Mal besser um. Ein Grund hierfür könnte zum einen in der höheren Saturierung des Cytochrom *b*₅ mit Häm liegen, was einen Einfluss auf den eingesetzten Proteingehalt hat. Dieser geht direkt in die Berechnung der Umsetzungsrate mit ein. Betrachtet man nämlich die Umsetzungsrate auf den Gesamtproteinhalt berechnet, liegen die v_{\max} -Werte des pflanzlichen Systems um den Faktor 3 bis 4 höher als mit dem humanen System. Bezieht man die Umsetzungsrate allerdings nur auf den mARC-Gehalt liegen die v_{\max} -Werte im pflanzlichen System im Schnitt nicht einmal mehr

um den Faktor 2 höher. Allerdings scheint das pflanzliche System dennoch eine höhere Affinität zu den *N*-hydroxylierten Substraten zu besitzen.

Interessant ist außerdem, dass bei *N*-Hydroxyadenin Substratkonzentrationen über 1 mM bei der Umsetzung mit Mitochondrien, dem humanen mARC1 und beiden pflanzlichen mARC-Homologen zu einer Hemmung der reduktiven Aktivität führen, während die Substratkonzentration auf die Reduktion durch das humane mARC2 und bei allen weiteren getesteten Substraten keinen Einfluss hat. Dass es sich hierbei um eine Hemmung durch das entstandene Produkt Adenin handelt, konnte durch Inkubationsansätze mit und ohne Zugabe von Adenin ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Phänomen um eine Substrathemmung handelt, was für viele bekannte Enzyme beschrieben ist.

Weiterhin fällt auf, dass die K_m Werte im rekombinanten System nur bei jeweils einem mARC-Homologen zu denen der Mitochondrien sehr ähnlich sind, während diese für das jeweils andere mARC-Protein wesentlich höher liegen. Dies spricht dafür, dass nur eine der beiden mARC-Isoformen an der Detoxifizierung *in vivo* beteiligt ist. Neve *et al.* (2012) konnte durch knock-down-Versuche an murinen Zellen zeigen, dass nur murines mARC2 an der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin beteiligt ist. Allerdings konnte außerdem gezeigt werden, dass ein knock-down von humanem mARC1 in HEK-293 Zellen zu einer starken Reduktion der Reduktaseaktivität führt (Plitzko, Dissertation in Vorbereitung). Es werden weitere Experimente notwendig sein, um zu klären, ob eine oder beide mARC-Isoformen an der Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga beteiligt sind.

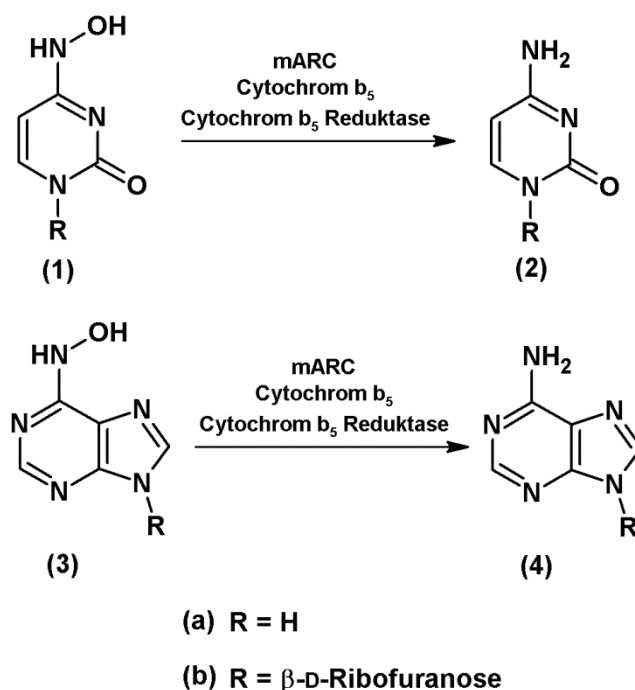


Abb. 4.4.1 Detoxifizierung N-hydroxylierter Nucleobasen und Nucleoside durch das mARC-abhängige Enzymsystem

Reduktion von N-Hydroxycytosin (1a) zu Cytosin (2a), von N-Hydroxycytidin (1b) zu Cytidin (2b), von N-Hydroxyadenin (3a) zu Adenin (4a) und von N-Hydroxyadenosin (3b) zu Adenosin (4b)

Die N-Reduktion stellt einen Detoxifizierungsmechanismus dar, der die Zellen gegen die mutagenen und toxischen Effekte der N-hydroxylierten Basenanaloga schützt. Damit wird der Einbau der modifizierten Nucleotide in die DNA oder RNA verhindert.

Ähnliche Detoxifizierungswege von MOSC-haltigen Proteinen wurden schon in anderen Organismen beschrieben. Unter anderem wurde in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* eine Amidoxim reduzierende Komponente gefunden, welche eine etwa 26%ige Sequenzhomologie zu den beiden humanen mARC-Homologen aufweist und zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase N-Hydroxyadenin zu Adenin reduziert (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2011). Auch in Prokaryoten wurden zwei molybdänhaltige Proteine gefunden, die wie die mARC-Homologen zu der MOSC-Proteinfamilie gehören und

an der Detoxifizierung von *N*-Hydroxyadenin in *Escherichia coli* beteiligt sind (Kozmin *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich um YcbX mit seinem Redoxpartner CysJ und YiiM mit seinem Redoxpartner Fre (Kozmin *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal *in vitro* Biotransformationsstudien mit den rekombinant hergestellten prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM mit ihren entsprechenden Elektronentransportproteinen CysJ und Fre durchgeführt werden. Dabei wurden neben dem bereits von Kozmin *et al.* (2008) in *E. coli*-Zellen untersuchten *N*-Hydroxyadenin auch das Pyrimidinderivat *N*-Hydroxycytosin sowie deren Nucleoside von beiden MOSC-Proteinen zu den korrespondierenden Nucleobasen bzw. Nucleosiden reduziert. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die von Kozmin *et al.* (2008) beschriebenen Proteine YcbX und YiiM an der Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga beteiligt sind.

Die hier berechnete katalytische Effizienz lässt sich allerdings nicht mit den eukaryotischen mARC-Proteinen vergleichen, da sich die eingesetzte Enzymmenge dabei nur auf den eingesetzten Molybdängehalt und nicht wie bei den prokaryotischen Proteinen auf den eingesetzten Proteingehalt bezieht. Auch die katalytische Effizienz der beiden prokaryotischen MOSC-Proteine YcbX und YiiM kann nur bedingt untereinander verglichen werden, da im Vorfeld keine Optimierung der jeweiligen Inkubationsansätze stattgefunden hat. Aber anhand der kinetischen Parameter v_{\max} und K_m kann man vermuten, dass die Purinderivate *N*-Hydroxyadenin und -adenosin von beiden MOSC-Proteinen relativ gleich gut und die Pyrimidinderivate *N*-Hydroxycytosin und -cytidin besser von YcbX umgesetzt werden. Interessant ist außerdem, dass bei der Umsetzung von *N*-Hydroxyadenin mit YcbX bei höheren Substratkonzentrationen auch wieder wie bei den eukaryotischen mARC-Proteinen (außer bei hmARC2) eine Substrathemmung erkennbar ist.

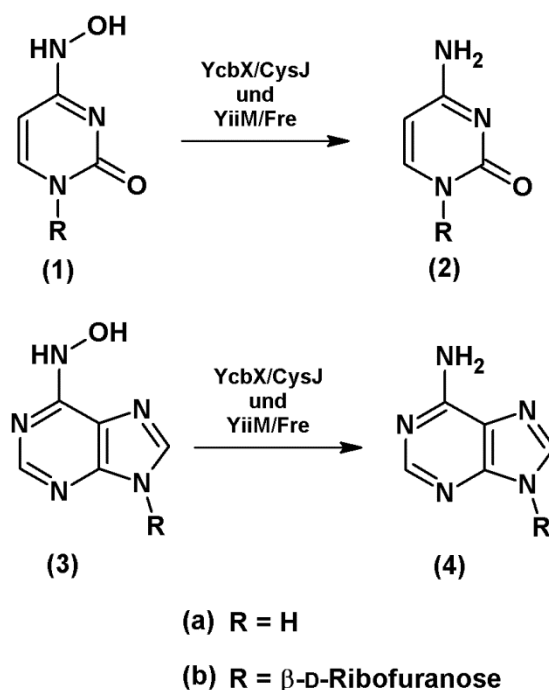


Abb. 4.4.2 Detoxifizierung N-hydroxylierter Nucleobasen und Nucleoside durch das prokaryotische molybdänhaltige Enzymsystem

Reduktion von N-Hydroxycytosin (1a) zu Cytosin (2a), von N-Hydroxycytidin (1b) zu Cytidin (2b), von N-Hydroxyadenin (3a) zu Adenin (4a) und von N-Hydroxyadenosin (3b) zu Adenosin (4b)

Wie es scheint, ist die Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen eine signifikante Gemeinsamkeit der prokaryotischen und eukaryotischen MOSC-Proteine. Dabei stellt die Detoxifizierung von mutagenen N-hydroxylierten Basenanaloga durch die MOSC-Proteine möglicherweise auch einen Grund dafür dar, dass diese Verbindungen bisher *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnten. Diese Detoxifizierung ist vielleicht eine wichtige, wenn auch wahrscheinlich nicht die einzige, physiologische Funktion der eukaryotischen mARC-Enzyme und des bakteriellen YcbX und YiiM.

4.5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine mögliche physiologische Funktion des mARC-abhängigen Enzymsystems beschrieben werden. Es wurde gezeigt, dass das Dreikomponenten-Enzymsystem, bestehend aus mARC, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase, toxische und mutagene N-hydroxylierte Basenanaloga zu ihren entsprechenden Nucleobasen bzw. Nucleosiden reduziert.

In allen getesteten Geweben konnte eine Reduktion der N-hydroxylierten Basenanaloga gezeigt werden, wobei die höchste Aktivität in Leber, Niere, Schilddrüse und Pankreas detektiert werden konnte. Dabei war die N-reduktive Aktivität vor allem in den mitochondrialen subzellulären Fraktionen angereichert, was mit der vorhergesagten Lokalisation des mARC Enzyms korreliert.

In vitro Biotransformationsstudien mit dem rekombinanten humanen und pflanzlichen Dreikomponenten-Enzymsystem haben gezeigt, dass die N-hydroxylierten Basenanaloga durch beide mARC-Isoformen reduziert werden. Allerdings stellen das humane mARC1 und das pflanzliche mARC2 jeweils die effizientere Isoform dar.

Auch mit den von Kozmin *et al.* (2008) beschriebenen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM konnte zum ersten Mal anhand rekombinant exprimierter Proteine die Reduktion der N-hydroxylierten Basenanaloga gezeigt werden.

5. DETOXIFIZIERUNG N-HYDROXYLIERTER NUCLEOTIDE

5.1. EINLEITUNG

5.1.1. Stoffwechsel der Adeninnucleotide

Die Purinbase Adenin spielt eine wichtige Rolle in allen lebenden Zellen (Zöllner, 1982). Dabei ist Adenin nicht nur als eine der vier Nucleinbasen am Aufbau der Erbinformation in Form von DNA oder RNA beteiligt, sondern auch in vielen anderen biologisch wichtigen Molekülen vertreten (ATP, cAMP, NADH) (Löffler, 2005).

Adenosintriphosphat (ATP) spielt eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle. Durch die Spaltung von ATP in ADP und Phosphat wird Energie frei (Erecińska und Wilson, 1982). Das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein sehr verbreiteter Second Messenger der zellulären Signaltransduktion (Shirakawa *et al.*, 1988). Außerdem ist Adenin ein Bestandteil des Nicotinamidadenindinucleotids (NAD⁺), das als Coenzym bei vielen Redox-Reaktionen in der Zelle beteiligt ist (Berger *et al.*, 2004). Das Nucleosid Adenosin ist als ein wichtiger Neuromodulator des Zentralnervensystems an der Steuerung von Schlaf und der motorischen Aktivität beteiligt (Hauber, 2002).

Die Adeninnucleotide können in jeder Zelle *de novo* synthetisiert werden. Dabei wird ausgehend vom 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) das Puringrundgerüst in zehn Schritten aus den Aminosäuren Glutamin, Aspartat und Glycin sowie Kohlendioxid und Formiat aufgebaut. Das so entstandene IMP (Inosinmonophosphat) kann dann weiter zum GMP (Guanosinmonophosphat) oder über das Adenosylsuccinat und anschließender Abspaltung von Fumarat zum Nucleotid AMP (Adenosinmonophosphat) umgewandelt werden.

Das entstandene AMP wird dann durch die Nucleosidmonophosphat- und die Nucleosiddiphosphatkinase in das entsprechende Di- und Triphosphat (ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat) überführt. Die Umwandlung in die Desoxyribonucleotide, die für die Biosynthese der DNA erforderlich sind, wird durch die Ribonucleotidreduktase katalysiert. Diese kann sowohl Di- als auch Triphosphate zu den entsprechenden Desoxyverbindungen reduzieren (dADP = Desoxyadenosindiphosphat; dATP = Desoxyadenosintriphosphat) (Moffatt und Ashihara, 2002).

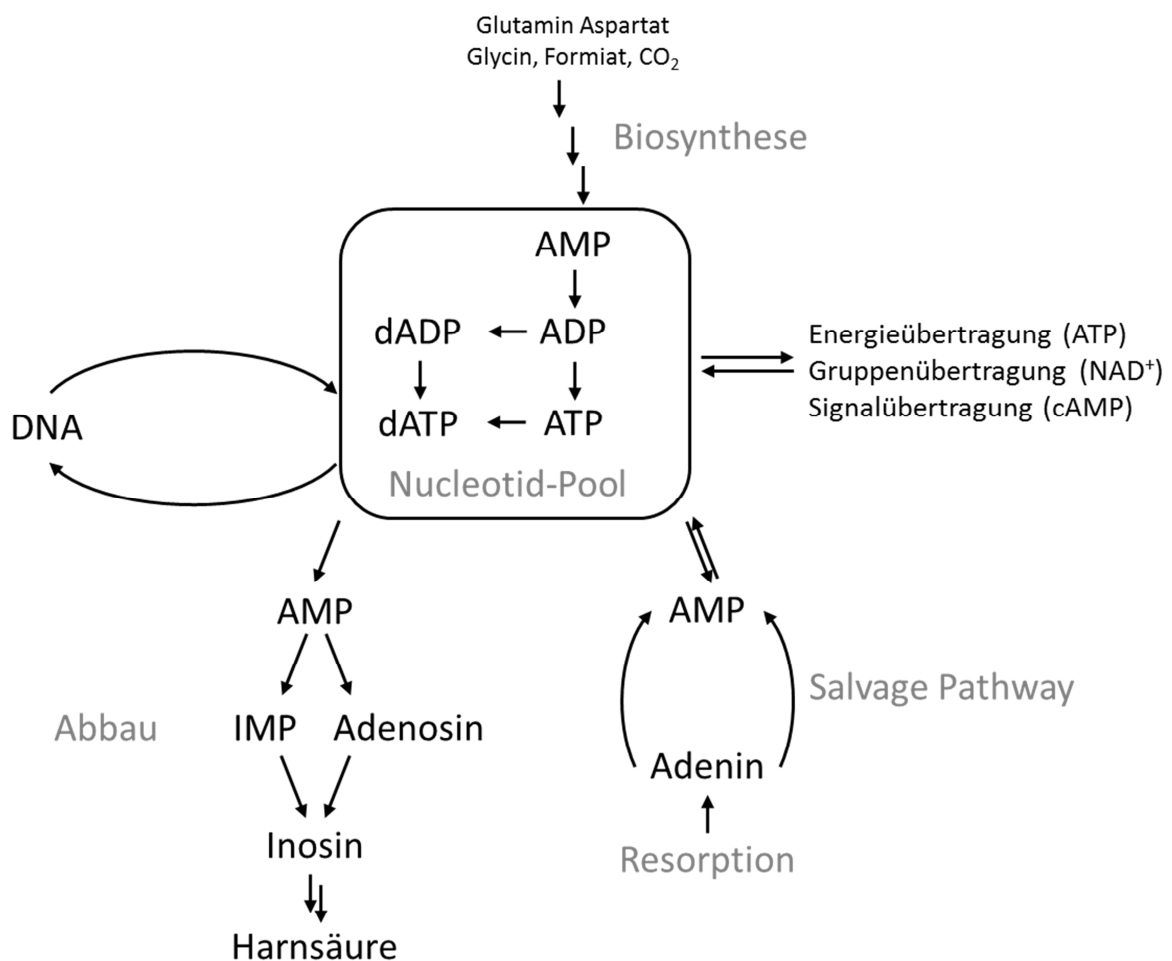


Abb. 5.1.1 Übersicht über den Stoffwechsel der Purinbase Adenin (angelehnt an Löffler und Petrides, 2002)

AMP = Adenosinmonophosphat; ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat; dADP = Desoxyadenosindiphosphat; dATP = Desoxyadenosintriphosphat; IMP = Inosinmonophosphat

Neben dieser *de novo* Synthese können auch Purinbasen, die beim intrazellulären Abbau von Nucleinsäuren entstehen oder die aus der Nahrung resorbiert werden, wiederverwertet werden. Dafür wird das Adenin dann im sogenannten Salvage-Pathway mittels der Adenin-Phosphoribosyltransferase unter Verbrauch von PRPP zu AMP umgewandelt und so dem Nucleotid-Pool wieder zugeführt (Moffatt und Ashihara, 2002).

Dieser Pool an verschiedenen (Desoxy-)Ribonucleotiden steht dann zum einen für den Aufbau von zellulärer DNA bzw. RNA aber auch zum Aufbau der zirkulären doppelsträngigen mitochondrialen DNA zur Verfügung. Darüber hinaus finden die verschiedenen Nucleoside auch als Energielieferant (ATP) oder bei der Synthese von Coenzymen Verwendung (Moffatt und Ashihara, 2002).

Der Abbau der Adeninnucleotide erfolgt im menschlichen Organismus ausgehend vom AMP über die Zwischenstufe des Inosins. Dabei wird AMP entweder zuerst durch Dephosphorylierung zum Adenosin umgewandelt und anschließend desaminiert oder zuerst durch Desaminierung zum IMP umgesetzt und anschließend dephosphoryliert. Das Nucleosid Adenosin entsteht also nur beim Abbau von Nucleotiden. Nach Abspaltung des Riboserests wird das entstandene Hypoxanthin durch die Xanthinoxidase zuerst zu Xanthin und dann zu Harnsäure oxidiert, die dann ausgeschieden werden muss (Moffatt und Ashihara, 2002).

Da die Harnsäure schlecht löslich ist, kommt es bei Harnsäure-Konzentrationen im Blut von über 6,4 mg/dl zum Auskristallisieren der Harnsäure vor allem in den Gelenken, was zu den Symptomen der Gicht führt (Zöllner, 1982).

Die Gesamtkonzentration an Adeninnucleotiden in Erythrozyten beträgt etwa 1,5 mM (Dudzinska und Hlynczak, 2004; Stocchi *et al.*, 1985). Dabei entfallen jedoch etwa 80-90% auf das Triphosphat, welches eine große Rolle bei der Energieversorgung der Zelle spielt, während das Diphosphat zu etwa 5-15% und das Monophos-

phat nur zu 1-3% vertreten sind (Dudzinska und Hlynczak, 2004; Stocchi *et al.*, 1985; Pontarin *et al.*, 2003).

Auch in der Leber (50%) und im Skelettmuskel (80%) macht das ATP den größten Teil der Adeninnucleotide aus (Grune *et al.*, 1991), während die Konzentrationen der Nucleobase Adenin und des Nucleosids Adenosin in der Leber nur etwa im mikromolaren Bereich liegen.

Die sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien von muriner Leber bestimmten dATP-Konzentrationen liegen bei weniger als 0,1% der dortigen ATP-Konzentration (Ferraro *et al.*, 2006). Dies korreliert mit den Angaben anderer Autoren, die in den Mitochondrien von HeLa-Zellen und verschiedener Gewebe von Ratten dATP-Konzentrationen von 3-10 μM detektierten (Song *et al.*, 2005).

5.1.2. Thema und Zielsetzung

Die Beteiligung des mARC-haltigen Dreikomponenten-Enzymsystems an der Reduktion von toxischen und mutagenen *N*-hydroxylierten Nucleobasen sowie von *N*-hydroxylierten Nucleosiden konnte bereits in dieser Arbeit gezeigt werden. Diese Reduktion stellt dabei eine Detoxifizierungsreaktion zu den korrespondierenden Nucleobasen bzw. Nucleosiden dar.

Für das *N*-hydroxylierte Basenanalogen *N*-Hydroxyadenin konnte gezeigt werden, dass die Umwandlung in das Desoxytriphosphat, welches dann in die DNA eingebaut wird, über das entsprechende Monophosphat verläuft (Abdul-Masih und Bessman, 1986). Daher sollte das *N*-hydroxylierte Mononucleotid *N*-Hydroxy-AMP als ein mögliches Substrat für das mARC-haltige Enzymsystem getestet werden, um die Frage zu beantworten, ob neben den *N*-hydroxylierten Nucleobasen und Nucleosiden auch *N*-hydroxylierte Nucleotide umgesetzt werden.

Dazu musste zuerst das *N*-Hydroxy-AMP in zwei Schritten synthetisiert werden. Danach sollten mit diesem *N*-hydroxylierten Nucleotid *in vitro* Biotransformations-

studien mit den gereinigten hepatischen Subfraktionen sowie den rekombinant hergestellten eukaryotischen und prokaryotischen Enzymquellen durchgeführt werden.

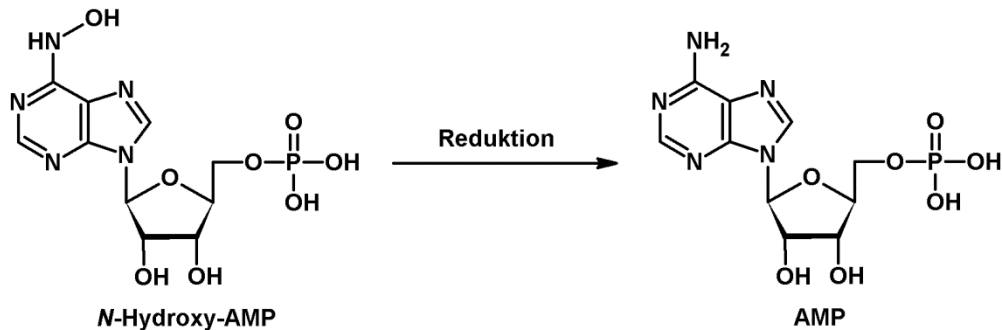


Abb. 5.1.2 Postulierte Reduktion des *N*-Hydroxy-AMP zum AMP

Die dabei erhaltenen Ergebnisse können mit den Umsetzungsraten der *N*-hydroxylierten Nucleobase *N*-Hydroxyadenin und des *N*-hydroxylierten Nucleosids *N*-Hydroxyadenosin verglichen und eine relative Umsetzungsrate bestimmt werden. Diese sollte einen Hinweis darauf geben auf welcher Stufe des Purinmetabolismus eine Detoxifizierung der *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymssystem stattfindet.

5.2. METHODEN

5.2.1. Materialien und Geräte

Sofern nicht anders angegeben, befindet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 7 dieser Arbeit.

Schmelzpunkt:

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3 (Staffordshire, USA). Die Angabe des Schmelzpunktes erfolgt unkorrigiert.

Massenspektrometrie:

Bruker Esquire-LC, Elektronenstoßionisierung (ESI), Direkteinlass als Methanol-Lösung

NMR-Spektroskopie:

Kernresonanzspektrometer Bruker (Rheinstetten) ARX 300

^1H -NMR: Messfrequenz = 300,13 MHz

^{13}C -NMR: Messfrequenz = 75,47 MHz

Interner Standard: 3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure, Natriumsalz (DSS)

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen benutzt:

s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett

Die Auswertung erfolgte nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Elementaranalyse:

Institut für anorganische Chemie der Christian-Albrechts Universität zu Kiel (CHNS Analysator der Fa. HEKAtech GmbH, Wegberg)

5.2.2. Enzymquellen

5.2.2.1. Gewinnung porciner Enzymquellen

Die Subfraktionierung von porciner Leber in Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol wurde bereits in Kapitel 2.2.2.1.1 beschrieben. Die Gewinnung von Mitochondrien aus extrahepatischen Organen ist in Kapitel 4.2.2.1.2 beschrieben worden.

5.2.2.2. Rekombinante Enzymquellen

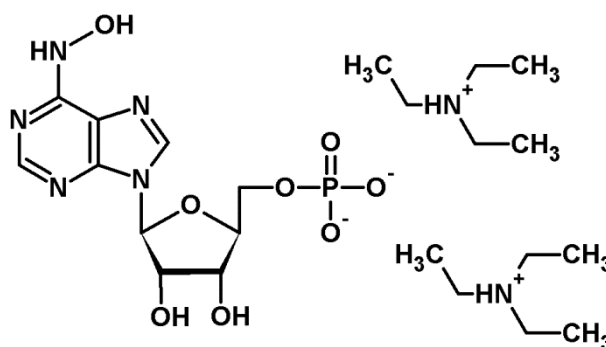
Die Herstellung der rekombinanten humanen mARC Proteine sowie der rekombinanten humanen Elektronentransportproteine Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase wurde bereits in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben. Die Herstellung der rekombinanten prokaryotischen MOSC-Proteine YcbX und YiiM sowie deren Redoxpartner CysJ und Fre wurde bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

5.2.3. Charakterisierung der Enzymquellen

Zur Charakterisierung der hepatischen und rekombinanten Proteine wurde die Identität und Reinheit mittel SDS-PAGE, der Proteingehalt, die Cofaktor-Gehälter und die *in vitro* Reduktion mit dem Modells substrat Benzamidoxim bestimmt. Dies wurde, da in der gesamten Arbeit immer die gleiche Enzymcharge verwendet wurde, bereits in den Kapiteln 2 und 4 beschrieben.

5.2.4. *In vitro* Biotransformationsstudien von *N*-Hydroxy-AMP

5.2.4.1. Synthese von *N*-Hydroxy-AMP



Die Synthese von *N*-Hydroxy-AMP wurde in 2 Schritten durchgeführt. Der erste Schritt wurde an die Methode nach El-Tayeb *et al.* (2009) angelehnt. Es wurden 574,8 mg (2 mmol) 6-Chloropurinribosid in 10 ml Triethylphosphat zuerst bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt und dann auf 4°C gebracht. Dazu wurden 643 mg (3 mmol) Dimethylaminonaphthalin und 5 Minuten später 240 µl (2,6 mmol) Phosphorylchlorid gegeben und alles für mehrere Stunden bei 0°C gerührt. Bei Bedarf wurde weiteres Phosphorylchlorid dazugegeben bis kein Edukt mehr per HPLC-Verlaufskontrolle (Methode siehe 5.2.4.2 mit 20% Methanol (v/v)) nachgewiesen werden konnte. Der Reaktionsansatz wurde in 60 ml 0,5 M wässrige TEAC(Triethylammoniumhydrogencarbonat)-Lösung, pH 7,5 gegeben und für eine Stunde stehen gelassen. Triethylphosphat wurde mehrmals mit *tert.* Butylmethyl-ether ausgeschüttelt und die wässrige Phase einrotiert. Auf eine weitere Aufreinigung wurde verzichtet und das Rohprodukt komplett weiter umgesetzt.

Der zweite Schritt wurde an die Methode nach Too *et al.* (2007) angelehnt. Dazu wurde das im ersten Schritt erhaltene 6-Chloropurinribosidmonophosphat in 10 ml Wasser/Ethanol gelöst. Dazu wurden 1,2 ml (20 mmol) wässrige 50%ige (w/v) Hydroxylamin-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) gegeben und mehrere Stunden bei 40°C gerührt. Bei Bedarf wurde weitere Hydroxylamin-Lösung dazugegeben bis kein Edukt mehr per HPLC-Verlaufskontrolle (Methode siehe 5.2.4.2) nachgewiesen werden konnte. Das Lösungsmittel wurde abrotiert, der Rückstand in wenig Wasser

suspendiert und abfiltriert. Das Wasser wurde abrotiert und das erhaltene *N*-Hydroxy-AMP mittels Flash-Chromatographie (Säule: RediSep C18c (43 g); Fließmittel: Wasser; Flussrate: 200 ml/min) aufgereinigt.

Ausbeute: 220 mg eines weißen bis leicht gelben kristallinen Pulvers (19,5%)

Schmelzpunkt: 118°C

MS (ESI): $m/z = 364 [M + H]^+$, $152 [C_5H_5N_5O + H]^+$

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz)

δ /ppm (DSS) = 4,10 (t, 2H, H-5 Ribose), 4,36 (q, 1H H-4 Ribose), 4,49 (q, 1H, H-3 Ribose); 4,73 (t, 1H, H-2 Ribose), 6,06 (d, 1H, H-1 Ribose), 8,04 (s, 1H, H-2 Purin), 8,34 (s, 1H, H-8 Purin)

¹³C-NMR (D₂O, 75 MHz)

δ /ppm (DSS) = 66,8 (d, C-5 Ribose), 73,2 (C-3 Ribose), 77,3 (C-2 Ribose), 87,1 (d, C-4 Ribose), 89,9 (C-1 Ribose), 120,3 (C-5 Purin), 141,6 (C-8 Purin), 142,4 (C-4 Purin), 147,4 (C-6 Purin), 151,2 (C-2 Purin)

Mittels HPLC konnte eine leichte Verunreinigung mit AMP detektiert werden, die allerdings unter dem Quantifizierungslimit lag. Das *N*-Hydroxy-AMP lag als Di-Triethylammoniumsalz vor. Trotz intensiver Bemühungen konnte keine eindeutige Elementaranalyse erhalten werden.

5.2.4.2. HPLC-Analytik

Zur Trennung von *N*-Hydroxy-AMP und AMP wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 616 Pump	
Detektor	Waters 486 Tunable Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	EZChromElite Aufnahme und Auswertesoftware, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA)	
Stationäre Phase	Synergi 4 µm Hydro RP, 250 × 3 mm, (Phenomenex, Torrance, USA), Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, USA)	
Mobile Phase	20 mM Ammoniumacetat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 4,0	
Flussrate	0,8 ml/min	
Laufzeit	22 min	
Detektion	UV, 258 nm	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeiten	<i>N</i> -Hydroxy-AMP	4,4 ± 0,1 min
	AMP	8,6 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (0,45 µm, Whatman, Dassel), der organische Anteil lag in reiner Form (HPLC-grade) vor. Die mobile Phase wurde 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

5.2.4.3. Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit in 7 verschiedenen Konzentrationen (1-500 μM) in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Metabolit in 10 verschiedenen Konzentrationen (1-500 μM) dem Inkubationsansatz mit 3 mM *N*-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH und 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden wie in Kapitel 5.2.4.5 dargestellt aufgearbeitet und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

5.2.4.4. Stabilität von *N*-Hydroxy-AMP und AMP

Zur Bestimmung der Stabilität wurde das Substrat *N*-Hydroxy-AMP 1,5 mM und der Metabolit AMP 100 μM in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) und Methanol (1:1) gelöst und im Autosampler bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 11 und 24 Stunden wurden die Ansätze mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

5.2.4.5. *In vitro* Biotransformationsansatz

Die Inkubationen wurden in einem 37°C Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen betrug 150 μl in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen. Nach 3-minütiger Vorinkubation des Substrats mit der jeweiligen Enzymquelle in 20 mM MES- oder 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) wurde die Reaktion durch Zugabe des jeweiligen Cosubstrats gestartet. Nach 15 bzw. 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt und anschließend das präzipitierte Protein bei 22 000g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

5.2.4.5.1. Inkubation mit hepatischen Subfraktionen

Die Inkubationsansätze mit den subzellulären hepatischen Fraktionen waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Homogenat, Mitochondrien, Mikrosomen bzw. Cytosol, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat *N*-Hydroxy-AMP wurde in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt. Dazu wurde die Substratkonzentration von 0,1 bis 9 mM variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot.

5.2.4.5.2. Inkubation mit extrahepatischen porcinen Enzymquellen

Die Inkubationsansätze mit den extrahepatischen mitochondrialen Fraktionen waren wie folgt zusammengesetzt: 0,01-0,1 mg mitochondriale Fraktion (0,01 mg Schilddrüse; 0,05 mg Leber, Niere, Herz, Lunge, Pankreas; 0,1 mg Hirn, Dünndarm), 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat *N*-Hydroxy-AMP wurde in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

5.2.4.5.3. Inkubation mit rekombinanten humanen Enzymquellen

Die Inkubationsansätze mit den rekombinanten humanen Enzymen waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC1 oder mARC2, 76,2 pmol Cytochrom b_5 , 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Proteine wurden nach ihrem Cofaktorgehalt eingesetzt. Das Substrat *N*-Hydroxy-AMP wurde in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurde eine Zeitabhängigkeit mit dem humanen mARC1 durchgeführt, dazu wurde die Inkubationszeit von 5 bis 120 Minuten variiert.

Zur Charakterisierung der Reduktion wurden nacheinander die einzelnen Komponenten des Inkubationsansatzes durch äquivalente Mengen an Puffer ersetzt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} wurde eine Substratabhängigkeit durchgeführt. Dazu wurde die Substratkonzentration von 0,1 bis 9 mM variiert. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über SigmaPlot.

5.2.4.5.4. Inkubation mit rekombinanten prokaryotischen Enzymquellen

Die Inkubationsansätze mit dem rekombinanten prokaryotischen MOSC-Protein YcbX waren wie folgt zusammengesetzt: 20 μ g YcbX, 5 μ g CysJ, 1 mM NADPH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat *N*-Hydroxy-AMP wurde in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die Inkubationsansätze mit dem rekombinanten prokaryotischen MOSC-Protein YiiM waren wie folgt zusammengesetzt: 20 μ g YiiM, 5 μ g Fre, 1 mM NADH, 0,5 mM FAD in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). Das Substrat *N*-Hydroxy-AMP wurde in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

5.3. ERGEBNISSE

5.3.1. Charakterisierung der Enzymquellen

Die Charakterisierung der hepatischen und extrahepatischen sowie der rekombinanten Enzymquellen wurde bereits in Kapitel 2.3.1 und 4.3.1 beschrieben, da in der gesamten Arbeit jeweils nur eine Enzymcharge verwendet wurde.

5.3.2. *In vitro* Biotransformationsstudien von *N*-Hydroxy-AMP

5.3.2.1. Repräsentatives HPLC-Chromatogramm

Die Trennung von *N*-Hydroxy-AMP und AMP erfolgte mit einer neu entwickelten HPLC-Methode. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 5.3.1 dargestellt. Die Trennung von Substrat und Metabolit gelang mit einer guten Auflösung ($R > 5$) und innerhalb kurzer Retentionszeiten (< 10 Minuten). Auch die Trennung vom Cofaktor NADH/NAD⁺ war gegeben.

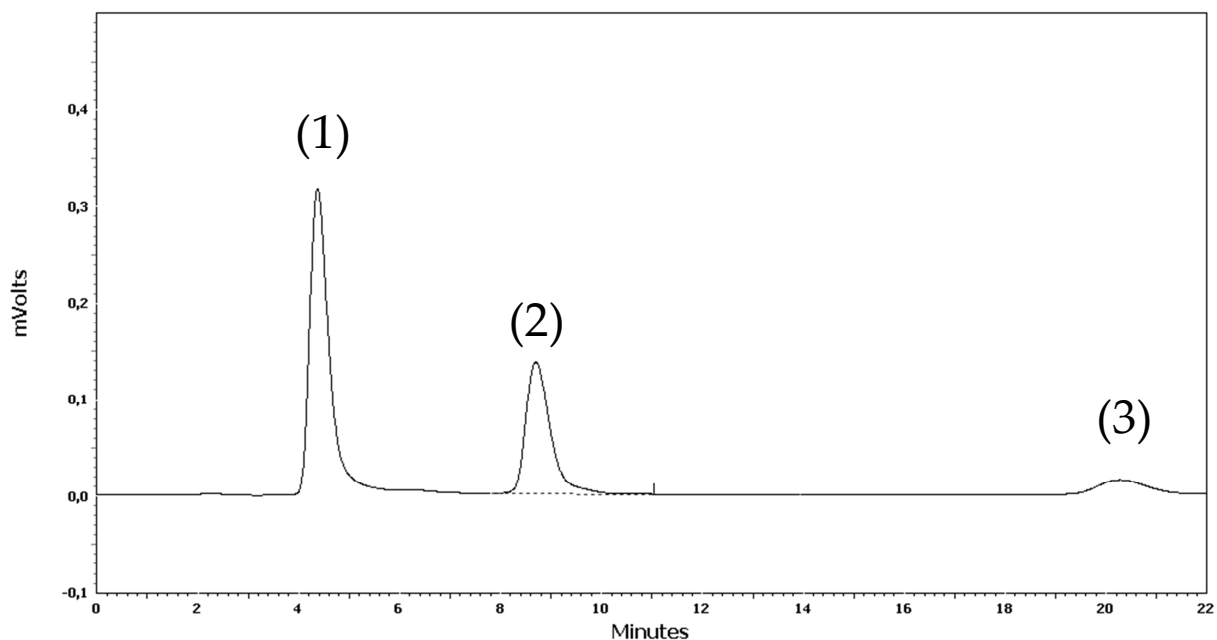


Abb. 5.3.1 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von *N*-Hydroxy-AMP und AMP

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien, 3 mM *N*-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH und 500 μ M AMP in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0). (1) *N*-Hydroxy-AMP; (2) AMP; (3) NADH/NAD⁺

5.3.2.2. Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade war im Konzentrationsbereich von 1-500 μM linear ($R^2 = 1,0000$). Die Richtigkeit für den ermittelten Bestimmungsbereich (1-500 μM) betrug $105 \pm 6\%$.

Die mithilfe der Kalibriergeraden ermittelte Wiederfindung betrug im Konzentrationsbereich von 1-500 μM $189 \pm 119\%$. Dies könnte auf eine leichte Verunreinigung im NADH zurückzuführen sein, welche den Peak des zu quantifizierenden Metaboliten AMP stört. Um diese Verunreinigung bei künftigen Inkubationsansätzen zu berücksichtigen, wurde zur Quantifizierung der enzymatisch gebildeten Metabolitenkonzentration die Wiederfindungsgerade herangezogen.

Dadurch ergab sich im Bestimmungsbereich von 3-500 μM eine durchschnittliche Richtigkeit von $102 \pm 7\%$, wobei an der Bestimmungsgrenze (3 μM) die Richtigkeit 108% betrug.

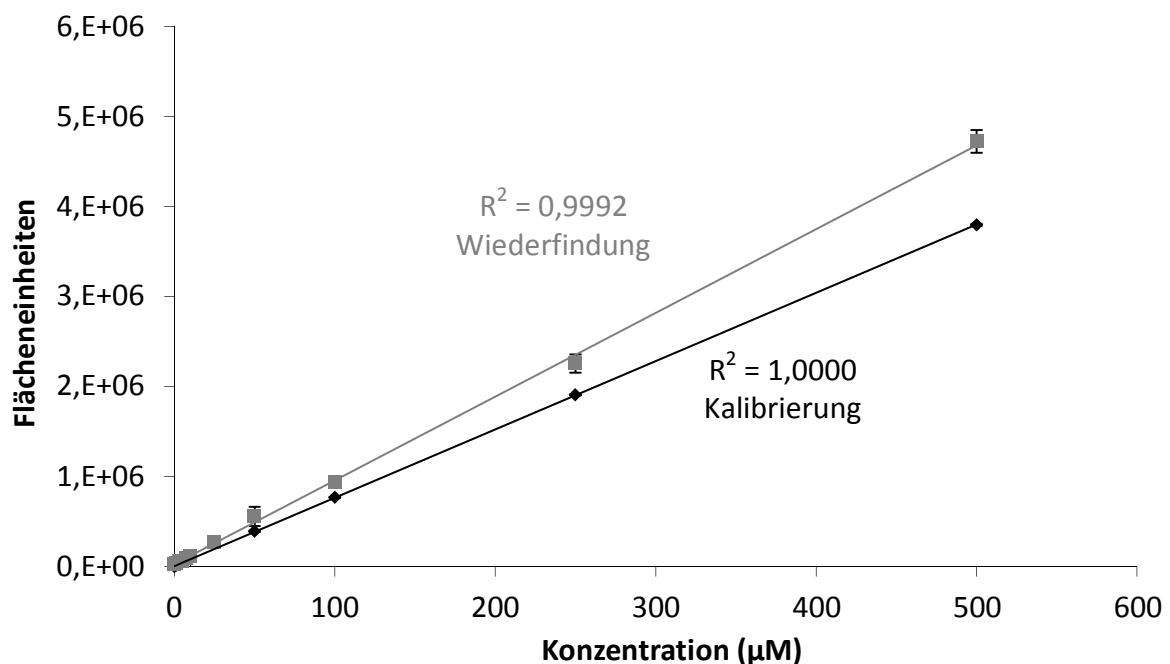


Abb. 5.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung von AMP

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Durchführung sind in Kapitel 5.2.4.3 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

5.3.2.3. Stabilität

Die Bestimmung der Stabilität zeigte, dass sowohl der Metabolit AMP als auch das Substrat *N*-Hydroxy-AMP über mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler stabil sind (Abb. 5.3.3). Nach 24 Stunden waren noch 103% AMP und 113 ± 1% *N*-Hydroxy-AMP nachweisbar. Es konnten allerdings geringe Mengen des Metaboliten AMP im Substrat *N*-Hydroxy-AMP detektiert werden. Diese Verunreinigung lag bis 48 Stunden unter dem Quantifizierungslimit von 1 µM und wurde daher vernachlässigt.

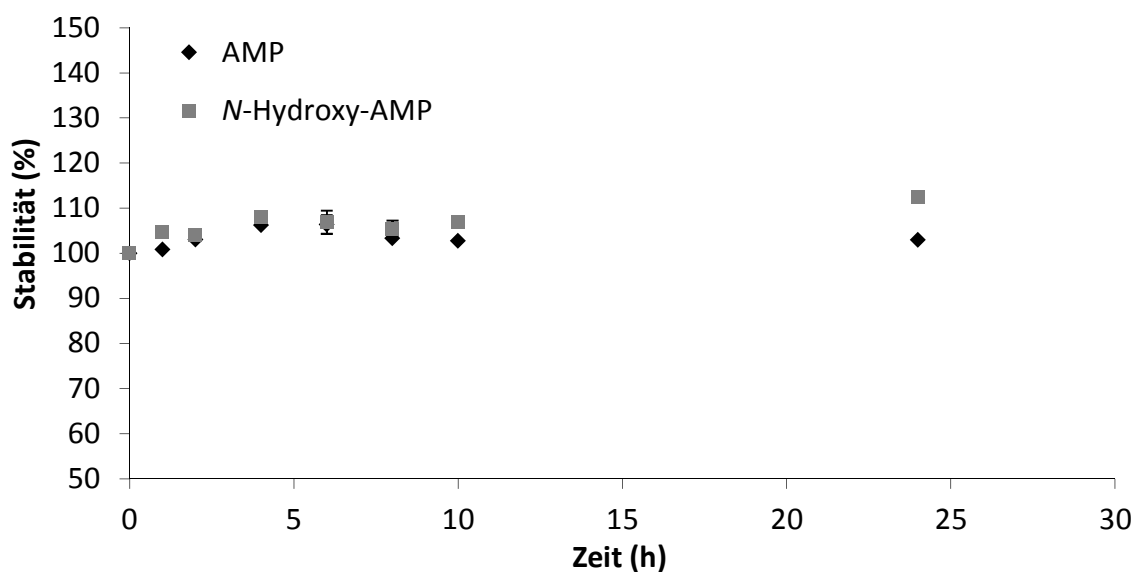


Abb. 5.3.3 Stabilität von AMP und *N*-Hydroxy-AMP in Puffer/Methanol bei Raumtemperatur

*Die Konzentration des Substrats *N*-Hydroxy-AMP betrug 1,5 mM und die des Metaboliten Adenosin 100 µM. Die Durchführung ist in Kapitel 5.2.4.4 beschrieben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei verschiedenen Ansätzen.*

5.3.2.4. Reduktion mit porcinen Enzymquellen

5.3.2.4.1. Subzelluläre hepatische Fraktionen

Die Umsetzung von *N*-Hydroxy-AMP wurde mit verschiedenen subzellulären Fraktionen getestet. Dabei konnte eine Reduktion zum korrespondierenden Nucleotid AMP festgestellt werden, welches mit der beschriebenen HPLC-Analytik quantifiziert wurde. Die höchste Umsetzungsrate konnte in den Mitochondrien detektiert werden (Anreicherungsfaktor 3), wobei die relative Umsetzungsrate (bezogen auf die Nucleobase Adenin) 0,5 betrug. In den Mikrosomen und im Cytosol konnten keine Umsetzungen beobachtet werden (Abb. 5.3.4). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung vom Cofaktor NADH abhängig ist (Daten nicht gezeigt).

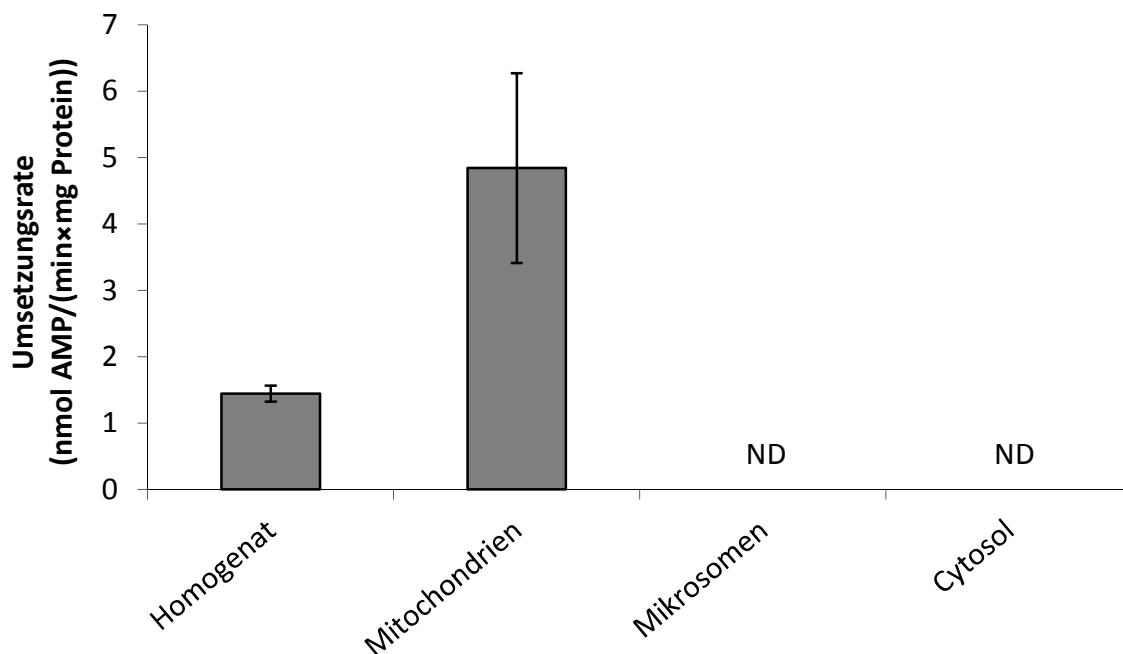


Abb. 5.3.4 Reduktion von *N*-Hydroxy-AMP durch hepatische subzelluläre Fraktionen

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg subzelluläre Fraktion, 1,5 mM *N*-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 1 nmol AMP/(min×mg Protein).

(ND = nicht detektierbar)

5.3.2.4.2. Bestimmung der kinetischen Parameter der mitochondrialen hepatischen Fraktion

Da gezeigt werden konnte, dass die *N*-reduktive Aktivität in den Mitochondrien angereichert ist, wurden die kinetischen Parameter K_m und v_{max} der Umsetzung von *N*-Hydroxy-AMP mit porcinen Lebermitochondrien bestimmt. Die Reaktion folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 5.3.5). Allerdings wurde die *N*-reduktive Aktivität durch Substratkonzentrationen über 1,5 mM gehemmt, so dass für die Berechnung der kinetischen Parameter nur der lineare Bereich (0,1-1,5 mM) des Lineweaver-Burk-Diagramms herangezogen wurde. Daraus ergaben sich die folgenden Werte: $K_m = 0,38 \pm 0,11$ mM und $v_{max} = 6,0 \pm 0,6$ nmol AMP/(min×mg Protein). Damit beträgt die relative maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) des *N*-Hydroxy-AMP 0,3 bezogen auf die Nucleobase Adenin.

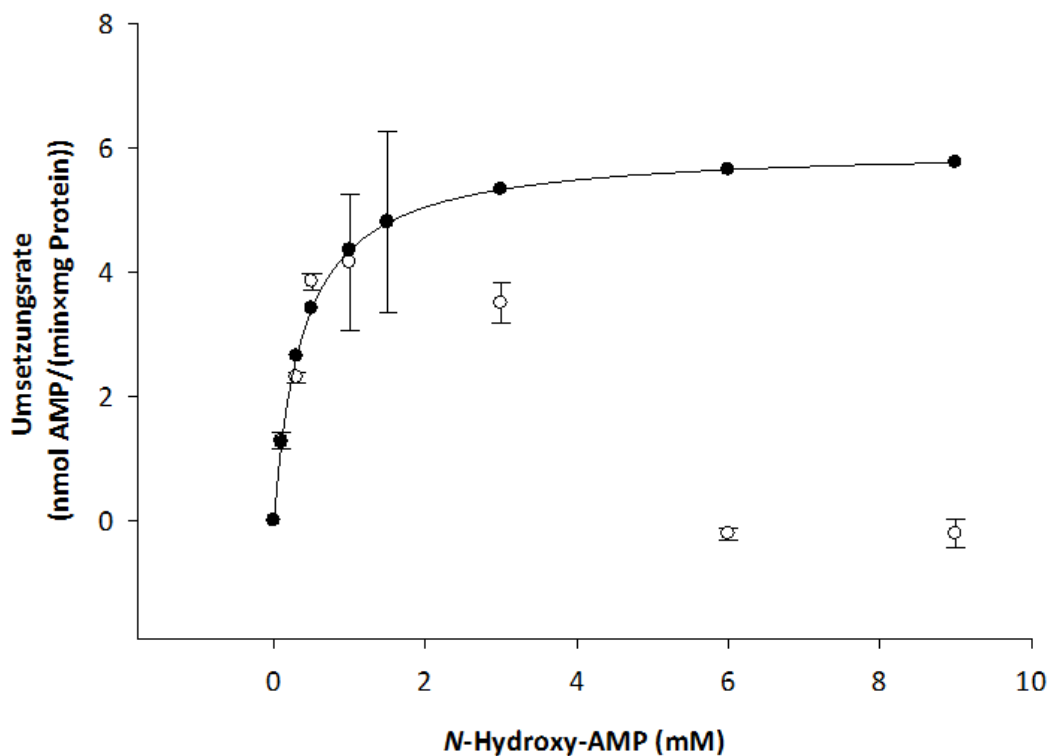


Abb. 5.3.5 Michaelis-Menten-Kinetik von *N*-Hydroxy-AMP mit porcinen hepatischen Mitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Mitochondrien, 0,1-9 mM *N*-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Dargestellt sind die gemessenen (\circ) und die kalkulierten (\bullet) Werte.

Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

5.3.2.4.3. Hepatische und extrahepatische Mitochondrien

Des Weiteren sollte die *N*-reduktive Aktivität extrahepatischer Mitochondrien bestimmt und mit der Aktivität hepatischer Mitochondrien verglichen werden. Dabei konnte in allen getesteten extrahepatischen Geweben eine *N*-reduktive Aktivität gezeigt werden, mit den höchsten Umsetzungsraten in den mitochondriellen Fraktionen von Schilddrüse, Niere, Pankreas und Leber (Abb. 5.3.6). Die relative Umsetzungsrate (bezogen auf die Nucleobase Adenin) lag bei diesen Organen zwischen 40-60%.

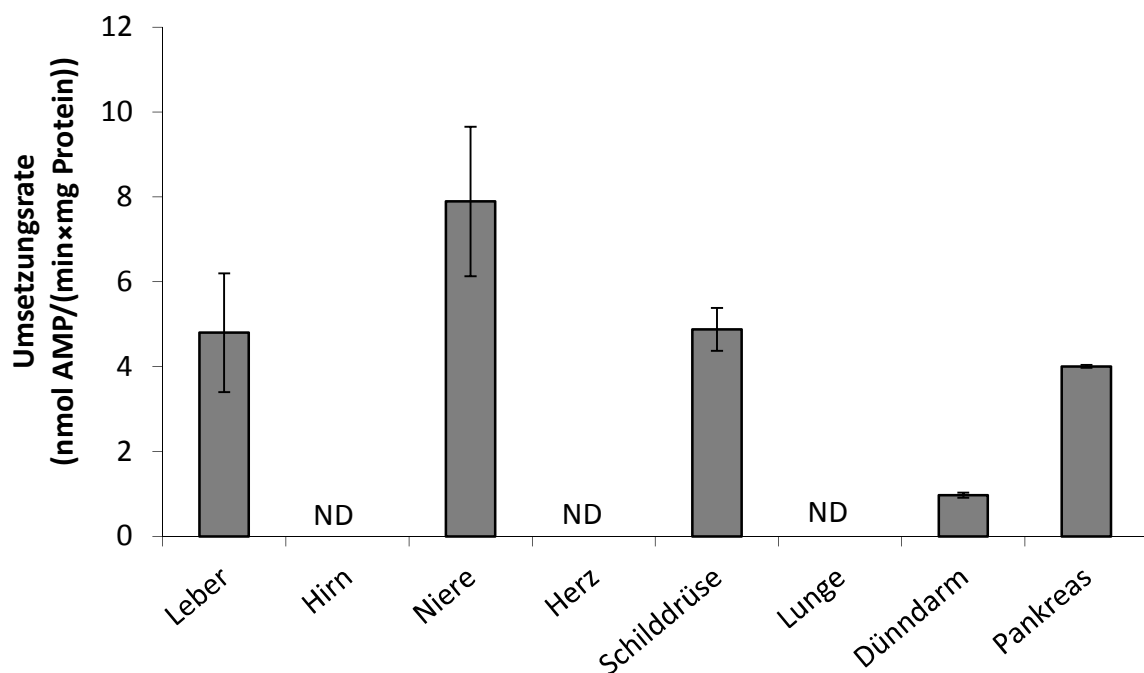


Abb. 5.3.6 Reduktion von *N*-Hydroxy-AMP durch hepatische und extrahepatische Mitochondrien

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,01-0,1 mg Mitochondrien, 1,5 mM *N*-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 1 nmol AMP/(min x mg Protein).

(ND = nicht detektierbar)

5.3.2.5. Rekonstituiertes System mit rekombinanten humanen mARC-Homologen

5.3.2.5.1. Einfluss der Inkubationszeit

Die Reduktion von *N*-Hydroxy-AMP durch das rekombinante Enzymsystem verlief über einen Zeitraum von etwa 20 Minuten linear. Danach nahm die Umsetzungsgeschwindigkeit leicht ab (Abb. 5.3.7). Daher wurde für künftige Inkubationen eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt.

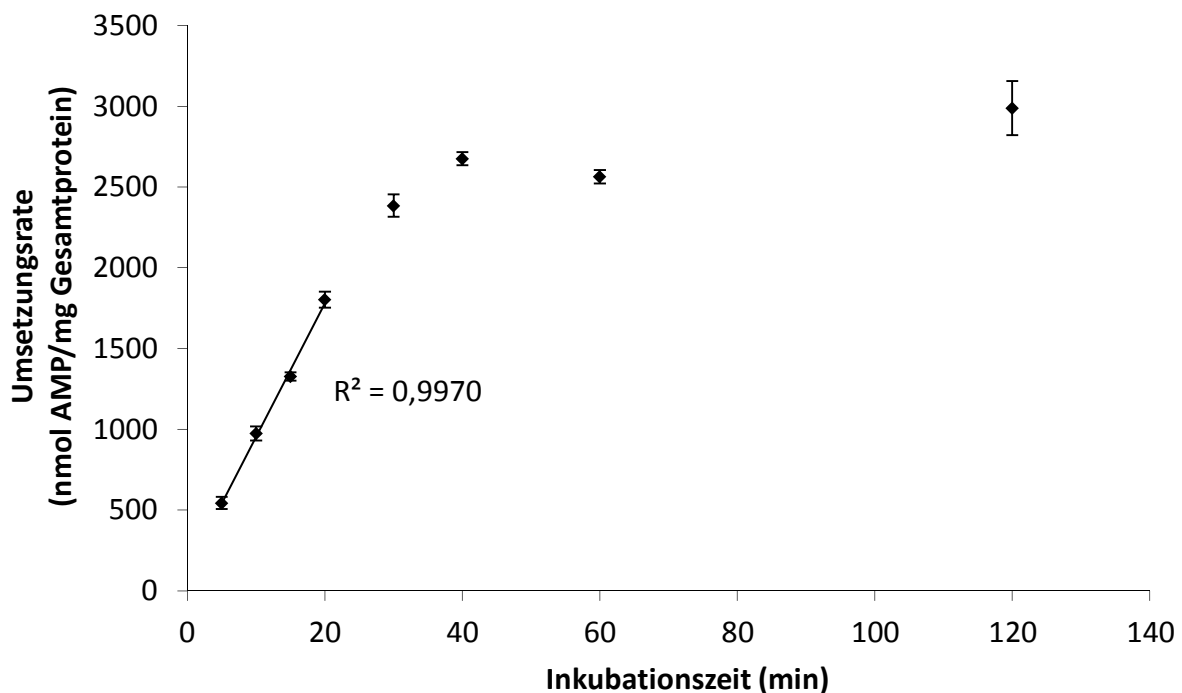


Abb. 5.3.7 Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von *N*-Hydroxy-AMP durch das rekombinante Enzymsystem

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC1, 76,2 pmol Cytochrom *b*₅, 7,6 pmol Cytochrom *b*₅ Reduktase, 1 mM NADH, 3 mM *N*-Hydroxy-AMP in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0). Die Inkubationszeit wurde zwischen 5 und 120 Minuten variiert.

Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

5.3.2.5.2. Bestimmung der kinetischen Parameter

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von *N*-Hydroxy-AMP durch das rekombinante humane Enzymsystem getestet. Die Reaktion folgte bei beiden mARC-Homologen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Allerdings wird die *N*-reduktive Aktivität bei beiden mARC-Homologen durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt, so dass für die Berechnung der enzymkinetischen Parameter nur der lineare Bereich (0,1-1,0 mM mARC1 bzw. 0,1-3,0 mM mARC2) des Lineweaver-Burk-Diagramms herangezogen wurde.

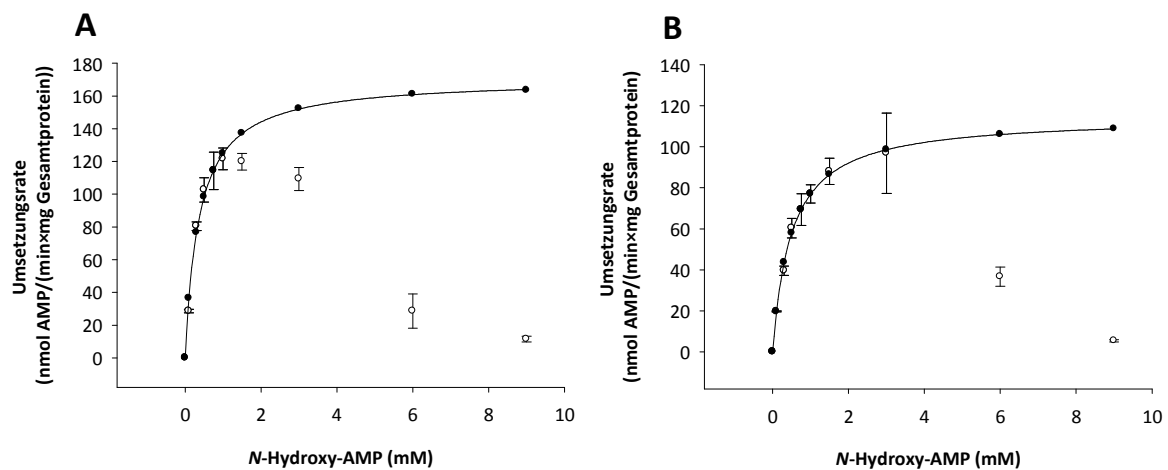


Abb. 5.3.8 Michaelis-Menten-Kinetik von *N*-Hydroxy-AMP mit rekombinatem humanen mARC1 (A) und mARC2 (B)

Zusammensetzung der Inkubationsansätze siehe Tab. 5.3.1. Dargestellt sind die gemessenen (○) und die kalkulierten (●) Werte.

Daraus ergaben sich die in Tab. 5.3.1 dargestellten K_m und v_{max} -Werte. Es konnte gezeigt werden, dass *N*-Hydroxy-AMP durch jeweils beide mARC-Homologe zum korrespondierenden Nucleotid AMP reduziert wird. Allerdings weisen die Umsetzungen mit mARC1 etwas höhere v_{max} -Werte und kleinere K_m -Werte als die Umsetzungen mit mARC2 auf, was für eine höhere Affinität von mARC1 zu dem getesteten Substrat spricht. Dieses lässt sich auch anhand der höheren katalytischen Effizienz für mARC1 erkennen.

Tab. 5.3.1 Kinetische Parameter der Reduktion von N-Hydroxy-AMP durch das rekombinante humane Enzymsystem

mARC Isoform	K_m (mM)	v_{max} (nmol/(min×mg))	katalytische Effizienz ($M^{-1} \times s^{-1}$)
mARC1	0,37* ± 0,08	171,0* ± 13,6	2900
mARC2	0,49* ± 0,04	114,6* ± 3,0	1400

* = Zur Berechnung wurde nur der lineare Bereich des Lineweaver-Burk-Diagramms verwendet (siehe Text)

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b_5 , 7,6 pmol Cytochrom b_5 Reduktase, 0,1-9 mM N-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 μ l). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsatzungsrate sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden über SigmaPlot berechnet.

5.3.2.5.3. Charakterisierung der Reduktion

Zur Bestimmung der Umsatzungsrate und Charakterisierung der Reduktion des N-hydroxylierten Nucleotids N-Hydroxy-AMP wurden Inkubationen mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase und unter Austausch einzelner Komponenten durch äquivalente Mengen an Puffer durchgeführt. Dabei wurden die Substratkonzentrationen so gewählt, dass diese im gesättigten Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik lagen. Wie man in Tab. 5.3.2 erkennen kann, konnte eine Reduktion zum korrespondierenden Nucleotid AMP nur mit dem kompletten Enzymsystem detektiert werden. Das Fehlen einer Komponente führte dagegen zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Die Reaktion ist abhängig vom Cofaktor NADH. Die relative Umsatzungsrate (= Umsatzungsrate N-Hydroxy-AMP/Umsatzungsrate Adenin) liegt bei 80% bzw 60% der Umsatzungsrate der Nucleobase.

Tab. 5.3.2 Umsetzung von N-Hydroxy-AMP durch das rekombinante humane Enzymsystem

Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol AMP/(min×mg Gesamtprotein))	
	mARC1	mARC2
komplett	141,3 ± 9,7	85,1 ± 2,7
- NADH	ND	ND
- Cytochrom b ₅	ND	ND
- Cytochrom b ₅ Reduktase	ND	ND
- mARC	ND	ND
- Protein	-	-
- Substrat	ND	ND

ND = nicht detektierbar

Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 76,2 pmol mARC, 76,2 pmol Cytochrom b₅, 7,6 pmol Cytochrom b₅ Reduktase, 1,5 mM N-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 2 nmol AMP/(min×mg Gesamtprotein). Umsetzungsrate, die nicht detektiert werden bzw. unterhalb dieser Bestimmungsgrenze liegen, konnten nicht quantifiziert werden (ND).

5.3.2.6. Rekonstituiertes System mit rekombinanten prokaryotischen Enzymquellen

Inkubationen des N-hydroxylierten Nucleotids N-Hydroxy-AMP mit dem rekombinanten prokaryotischen Enzymsystem bestehend aus YcbX und CysJ bzw. YiiM und Fre führte ebenfalls zur Bildung des korrespondierenden Nucleotids AMP. Dabei konnten die höchsten Umsetzungsrate nur mit dem kompletten Enzymsystem detektiert werden, während das Fehlen einer Komponente zu einem nahezu vollständigen Verlust der Aktivität führte. Die Reaktion ist abhängig vom Cosubstrat NADPH bzw. NADH. Die relative Umsetzungsrate entspricht mit 100 bzw. 120% in etwa der Adenin-Umsetzung.

Tab. 5.3.3 Umsetzung von N-Hydroxy-AMP durch das rekombinante prokaryotische Enzymsystem

Isoform	Umsetzungsrate (nmol AMP/(min×mg Gesamtprotein))	
	YcbX ^a	YiiM ^b
Komplettansatz	153,4 ± 20,6	183,2 ± 25,0
- Cosubstrat	ND	3,8 ± 0,3
- Molybdoenzym	ND	5,0 ± 1,1
- Elektronentransportprotein	ND	4,4 ± 0,6
- Substrat	ND	3,5 ± 0,1

ND = nicht detektierbar

^aDie Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YcbX, 5 µg CysJ, 1,5 mM N-Hydroxy-AMP, 1 mM NADPH in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

^bDie Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 20 µg YiiM, 5 µg Fre, 0,5 mM FAD, 1,5 mM N-Hydroxy-AMP, 1 mM NADH in 20 mM Phosphat-Puffer (pH 6,0) (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 2 nmol AMP/(min×mg Gesamtprotein). Umsetzungsdaten, die nicht detektiert werden bzw. unterhalb dieser Bestimmungsgrenze liegen, konnten nicht quantifiziert werden (ND).

5.4. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass mARC an der Detoxifizierung von toxischen und mutagenen *N*-hydroxylierten Nucleobasen sowie Nucleosiden beteiligt ist.

In diesem Kapitel konnte nun auch zum ersten Mal die Reduktion des *N*-hydroxylierten Purinmononucleotids *N*-Hydroxy-AMP zum korrespondierenden Mononucleotid AMP durch das mARC-abhängige Enzymsystem gezeigt werden.

Dazu wurde zuerst das *N*-Hydroxy-AMP ausgehend vom 6-Chlorpurinribosid durch Phosphorylierung der Ribose in Position 5 und anschließender Substitution des Chlors durch Hydroxylamin erfolgreich in zwei Schritten synthetisiert.

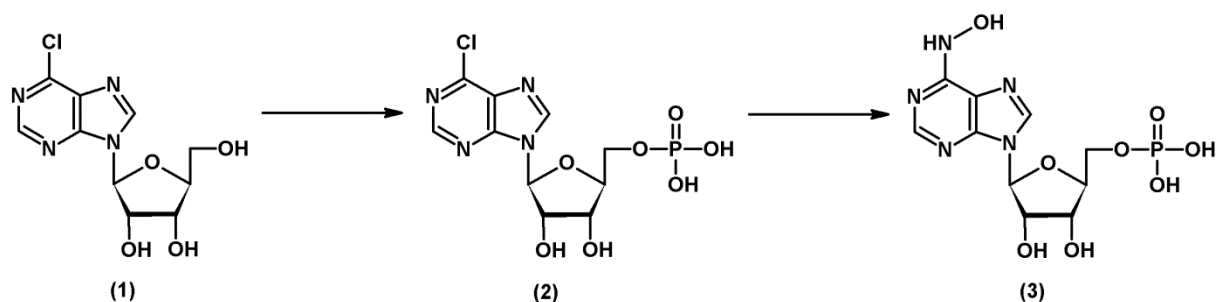


Abb. 5.4.1 Synthese des *N*-Hydroxy-AMP (3) ausgehend vom 6-Chlorpurinribosid (1) über das entsprechende Monophosphat (2)

Mit diesem *N*-hydroxylierten Mononucleotid wurden *in vitro* Biotransformationsstudien mit den gereinigten hepatischen Subfraktionen sowie den rekombinant hergestellten eukaryotischen und prokaryotischen Enzymquellen durchgeführt.

Die Umsetzung des *N*-hydroxylierten Nucleotids *N*-Hydroxy-AMP war dabei in der mitochondrialen Fraktion angereichert. Es konnte eine Reduktion zum korrespondierenden Nucleotid AMP detektiert werden. Die Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in der mitochondrialen Fraktion, die auch für alle *N*-hydroxylierten Basenanaloga genauso wie für das Modellsubstrat Benzamidoxim gezeigt werden konnte, ist ein Indiz dafür, dass diese Reduktionen durch das gleiche Enzymsystem auf eine ähnliche Art und Weise stattfinden. Die Umsetzungsraten des

N-hydroxylierten Nucleotids *N*-Hydroxy-AMP sind allerdings etwa um den Faktor 0,5 niedriger als die mit der Nucleobase Adenin und dem Nucleosid Adenosin ermittelten.

Neben der hepatischen Reduktion von *N*-Hydroxy-AMP konnte außerdem gezeigt werden, dass auch in extrahepatischen Geweben eine Detoxifizierung zum entsprechenden Nucleotid stattfindet.

Die jeweils höchsten Umsetzungsraten wurden, wie auch zuvor schon mit den *N*-hydroxylierten Nucleobasen und Nucleosiden sowie dem Modellsubstrat Benzamidoxim, in den Mitochondrien von Leber, Niere, Pankreas und Schilddrüse detektiert. Auch hier verlief die Umsetzung etwa um den Faktor 0,5 schlechter.

Die Beteiligung von mARC an der Detoxifizierung des *N*-hydroxylierten Nucleotids konnte durch die Verwendung des rekombinanten humanen Dreikomponenten-Enzymsystems, bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, bestätigt werden. Dabei war jeweils das komplette Enzymsystem in der Lage das *N*-hydroxylierte Nucleotid *N*-Hydroxy-AMP zu reduzieren, wobei das Fehlen einer Komponente zum vollständigen Verlust der Aktivität führte. Auch hier wurde die *N*-hydroxylierte Nucleobase *N*-Hydroxyadenin, wie auch schon bei den Mitochondrien, etwa zweimal besser umgesetzt, wobei allerdings auch hier die Aktivität des rekombinanten Enzymsystems etwa 20mal höher war als die der Mitochondrien.

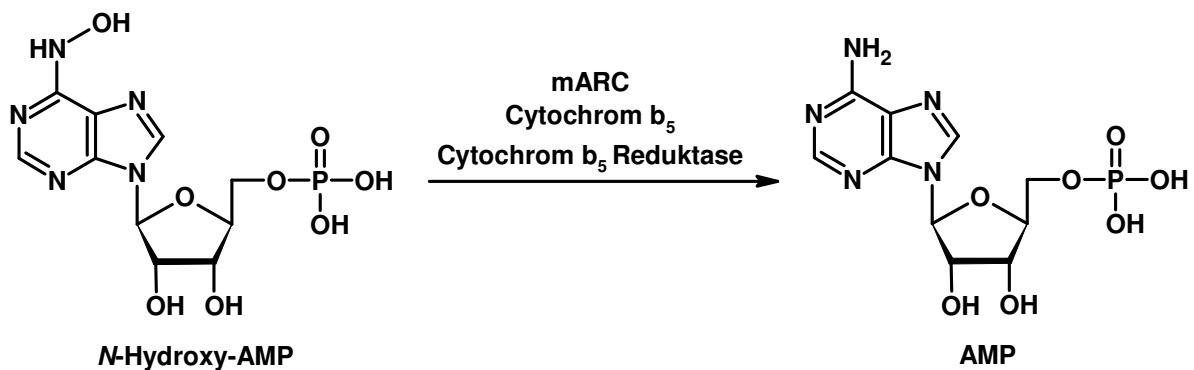


Abb. 5.4.2 Detoxifizierung des *N*-hydroxylierten Nucleotids *N*-Hydroxy-AMP durch das mARC-abhängige Enzymsystem

Die durchgeführten kinetischen Studien mit den porcinen Lebermitochondrien und den rekombinanten Enzymsystemen zeigen, dass auch das *N*-hydroxylierte Mononucleotid *N*-Hydroxy-AMP für das mARC-haltige Enzymsystem ein sehr gutes Substrat darstellt.

Es fällt auf, dass bei der Reduktion des *N*-Hydroxy-AMP mit mARC1 und mARC2 etwa gleiche maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{\max}) und gleiche Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) bestimmt wurden und damit etwa ähnliche katalytische Effizienzen erhalten werden. Dies spricht für eine ähnliche Affinität beider mARC-Homologen zum Substrat *N*-Hydroxy-AMP. Im Gegensatz dazu weisen die Reduktionen der *N*-hydroxylierten Nucleobase *N*-Hydroxyadenin und des *N*-hydroxylierten Nucleosids *N*-Hydroxyadenosin mit mARC1 höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{\max}) und kleinere Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) auf als mit mARC2, was für eine höhere Affinität von mARC1 zu den getesteten Substraten spricht.

Aus den ermittelten maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{\max}) der *N*-hydroxylierten Nucleobase *N*-Hydroxyadenin, des Nucleosids *N*-Hydroxyadenosin und des Nucleotids *N*-Hydroxy-AMP wurden die relativen Umsetzungsraten berechnet, indem die Reaktionsgeschwindigkeiten auf die Umsetzung der *N*-hydroxylierten Nucleobase *N*-Hydroxyadenin als Referenz normiert wurden.

Tab. 5.4.1 Relative Reaktionsgeschwindigkeiten der *N*-hydroxylierten Basenanaloga (bezogen auf *N*-Hydroxyadenin)

Enzymquelle	relative Reaktionsgeschwindigkeit		
	<i>N</i> -Hydroxyadenin	<i>N</i> -Hydroxyadenosin	<i>N</i> -Hydroxy-AMP
Mitochondrien	100	81	27
mARC1	100	75	46
mARC2	100	176	95

* relative Reaktionsgeschwindigkeit = v_{\max} *N*-Hydroxyadenosin bzw. *N*-Hydroxy-AMP/ v_{\max} *N*-Hydroxyadenin (in Prozent)

Für alle Versuchsreihen wurde stets dieselbe Enzymcharge verwendet

Wie man in der Tabelle erkennen kann, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl mit den porcinen hepatischen Mitochondrien als auch mit mARC1 von der Nucleobase über das Nucleosid zum Nucleotid hin ab. Diese Gemeinsamkeit stellt vielleicht wieder einen Hinweis darauf dar, dass in den Mitochondrien ein mARC-Homolog von größerer Bedeutung ist.

Im Gegensatz dazu setzt mARC2 die Nucleobase *N*-Hydroxyadenin und das Nucleotid *N*-Hydroxy-AMP mit der gleichen Reaktionsgeschwindigkeit um, während diese beim Nucleosid etwa doppelt so hoch ist.

Interessant ist außerdem, dass bei *N*-Hydroxy-AMP Substratkonzentrationen über 1,5 mM bei der Umsetzung mit Mitochondrien sowie über 1,0 mM mit mARC1 zu einer Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität führen. Dies konnte bereits bei der *N*-hydroxylierten Nucleobase *N*-Hydroxyadenin beobachtet werden. Allerdings konnte diesmal auch mit mARC2 bei Substratkonzentrationen über 3,0 mM eine Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität beobachtet werden.

Da diese Hemmung allerdings bei allen Enzymquellen erst bei Substratkonzentrationen auftritt, die etwa 50-fach über den physiologischen Konzentrationen an natürlich vorkommendem AMP liegen, werden die Konzentrationen des toxischen und mutagenen *N*-Hydroxy-AMPs weit unter denen der Hemmkonzentrationen liegen. Daher kann eine Relevanz dieser Hemmung *in vivo* ausgeschlossen werden.

Neben der Reduktion durch die eukaryotischen mARC-Proteine konnten in dieser Arbeit auch *in vitro* Biotransformationsstudien mit den erstmalig rekombinant hergestellten prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM mit ihren entsprechenden Elektronentransportproteinen CysJ und Fre gemacht werden.

Dabei konnte nicht nur die Reduktion der Nucleobasen *N*-Hydroxyadenin und *N*-Hydroxycytosin sowie deren Nucleoside durch beide MOSC-Proteine zu den korrespondierenden Nucleobasen bzw. Nucleosiden gezeigt werden (siehe Kapitel 4), sondern auch die Reduktion des *N*-hydroxylierten Nucleotids *N*-Hydroxy-AMP.

Dies lässt den Schluss zu, dass die von Kozmin *et al.* (2008) beschriebenen Proteine YcbX und YiiM an der Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga beteiligt sind. Dabei werden *N*-hydroxylierte Nucleobasen, Nucleoside und Nucleotide etwa in gleichem Maße umgesetzt.

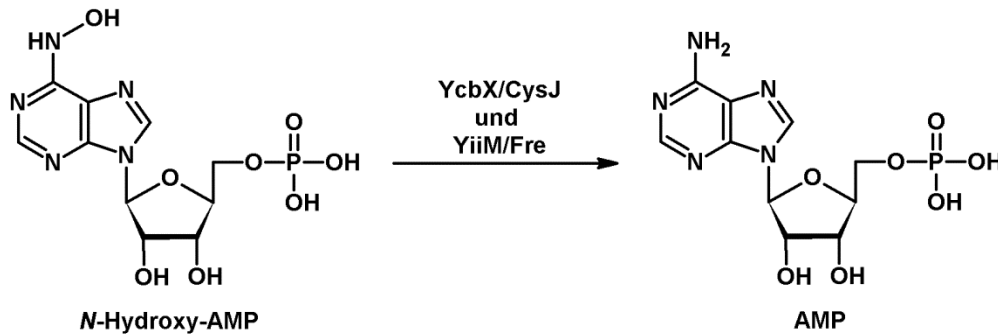


Abb. 5.4.3 Detoxifizierung des *N*-hydroxylierten Nucleotids *N*-Hydroxy-AMP durch das prokaryotische molybdänhaltige Enzymsystem

Obwohl die Reduktion von *N*-Hydroxy-AMP etwas schlechter als die der korrespondierenden Nucleobase *N*-Hydroxyadenin und des korrespondierenden Nucleosids *N*-Hydroxyadenosin abläuft, könnte sie eventuell eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von toxischen und mutagenen *N*-hydroxylierten Basenanaloga spielen. Neben der Reduktion der *N*-hydroxylierten Basenanaloga konnte eine Detoxifizierung von Desoxy-*N*-Hydroxyadenosintriphosphat durch das Enzym Inosintriphosphat-Pyrophosphatase (ITPA) beschrieben werden (Waisertraiger *et al.*, 2010).

Die Beteiligung dieser Pyrophosphatase an der Detoxifizierung toxischer und mutagener *N*-hydroxylierter Basenanaloga wurde schon vor längerer Zeit in Hefen und Bakterien beschrieben und konnte vor kurzem auch in einer humanen Zelllinie gezeigt werden (Noskov *et al.*, 1996; Burgis *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2012). Diese hydrolysiert sowohl (Desoxy-)Inosintriphosphat als auch (Desoxy-)Xanthintriphosphat zu den entsprechenden Monophosphaten (Lin *et al.*, 2001). Aber auch das *N*-hydroxylierte Basenanalogon Desoxy-*N*-Hydroxyadenosintriphosphat wird von ITPA zum korrespondierenden Monophosphat hydrolysiert.

Von dort an könnte dann das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem die weitere Detoxifizierung übernehmen und das *N*-hydroxylierte Mononucleotid zum korrespondierenden natürlich vorkommenden Mononucleotid reduzieren.

Daher stellt die Reduktion von *N*-hydroxylierten Nucleotiden neben der Hydrolyse der Desoxytrinucleotide in die entsprechenden Mononucleotide einen Detoxifizierungsmechanismus dar, der die Zellen gegen die mutagenen und toxischen Effekte der *N*-hydroxylierten Basenanaloga schützt. Dadurch wird der Einbau der modifizierten Nucleotide in die DNA oder RNA verhindert.

Allerdings ist noch unklar auf welcher Stufe des Purinmetabolismus die Detoxifizierung durch das mARC-haltige Enzymsystem stattfindet. Im Moment scheint es so, dass die Reduktion auf der Stufe der Nucleobasen, der Nucleoside und der Monophosphate stattfindet. Es werden aber noch weitere Versuche, unter anderem mit den Di- und Triphosphaten aber auch mit den entsprechenden Desoxyverbindungen notwendig sein, um ein Gesamtbild zu erhalten. Aber auch Zellkulturstudien könnten weitere Hinweise auf die Relevanz der mARC-abhängigen Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga *in vivo* geben.

5.5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal mit der Reduktion von toxischen und mutagenen *N*-hydroxylierten Basenanaloga zu ihren entsprechenden Nucleobasen bzw. Nucleosiden eine mögliche physiologische Funktion des mARC-abhängigen Enzymsystems beschrieben werden.

Darüberhinaus wurde nun gezeigt, dass das Dreikomponenten-Enzymsystem bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase auch das *N*-hydroxylierte Nucleotid *N*-Hydroxy-AMP reduziert. Dazu wurde das *N*-Hydroxy-AMP zuerst erfolgreich in 2 Schritten synthetisiert.

Die höchste *N*-reduktive Aktivität konnte wie auch bei den *N*-hydroxylierten Nucleobasen und Nucleosiden in den Mitochondrien der Leber, Niere, Schilddrüse und des Pankreas detektiert werden. Dabei war die ermittelte Umsetzungsrate allerdings nur halb so hoch wie mit der Nucleobase *N*-Hydroxyadenin.

In vitro Biotransformationsstudien mit dem rekombinanten humanen Dreikomponenten-Enzymsystem haben gezeigt, dass das *N*-hydroxylierte Nucleotid *N*-Hydroxy-AMP ebenfalls durch beide mARC-Isoformen reduziert wird. Dabei wird *N*-Hydroxy-AMP durch mARC1 und mARC2 jeweils mit der gleichen Effizienz umgesetzt. Die relative Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf die Nucleobase *N*-Hydroxyadenin nimmt dagegen bei mARC1 von der Nucleobase über das Nucleosid zum Nucleotid hin ab.

Auch mit den von Kozmin *et al.* (2008) beschriebenen prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM konnte die Reduktion des *N*-hydroxylierten Nucleotids zum AMP gezeigt werden.

Es werden allerdings noch weitere Versuche sowohl mit den Di- und Triphosphaten als auch mit den entsprechenden Desoxyverbindungen notwendig sein, um ein Gesamtbild der mARC-abhängigen Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga zu erhalten.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den vor kurzem neu entdeckten eukaryotischen und prokaryotischen MOSC-Proteinen mARC (mitochondrial Amidoxime Reducing Component), YcbX und YiiM.

Dabei wurde nicht nur ein weiteres potentiell Substrat als Prodrug für das mARC-abhängige Dreikomponenten-Enzymsystem getestet, sondern auch Untersuchungen durchgeführt, die unter anderem einen Hinweis auf eine mögliche physiologische Funktion des *N*-reduktiven Enzymsystems geben sollen. Außerdem wurden die prokaryotischen Enzyme YcbX und YiiM sowie deren Redoxpartner hinsichtlich ihrer prosthetischen Gruppen und ihrer *N*-reduktiven Aktivität charakterisiert.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass das Dreikomponenten-Enzymsystem bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase an der Aktivierung verschiedener *N*-hydroxylierter Prodrugs beteiligt ist. Allerdings wurde diese Reduktion in allen bisherigen Studien nur an aromatischen Amidoximen untersucht.

In dieser Arbeit wurde nun auch erstmalig an einem Modells substrat für ein aliphatisches Amidoxim die Beteiligung des mARC-haltigen Dreikomponenten-Enzymsystems an der Reduktion zum entsprechenden Amidin in *in vitro* Biotransformationsstudien gezeigt.

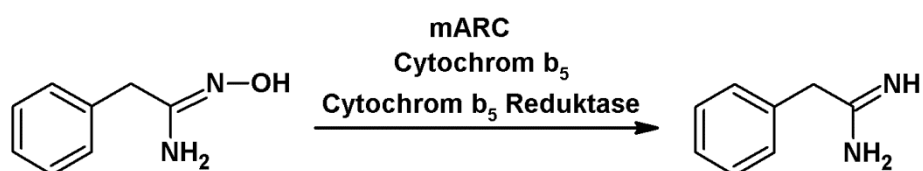


Abb. 5.5.1 *In vitro* Reduktion von Benzylamidoxim zu Benzylamidin durch das mARC-abhängige Enzymsystem

Die Effizienz der Umsetzung war in etwa vergleichbar mit dem etablierten Modellsubstrat Benzamidoxim, wobei mARC2 das Substrat Benzylamidoxim gegenüber dem Benzamidoxim etwas effizienter umsetzte. Daher ist anzunehmen, dass auch aliphatische Amidoxime als Prodrugs *in vivo* eingesetzt werden können, da eine Aktivierung durch das mARC-haltige Enzymsystem stattfindet.

Für die eukaryotischen Proteine YcbX und YiiM, die per Datenbankanalyse ebenso wie die mARC-Enzyme der Domänen-Superfamilie der MOSC-Proteine zugeordnet werden, war vor kurzem die Reduktion von *N*-hydroxylierten Basenanaloga in *E. coli* beschrieben worden (Kozmin *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit konnte mit den rekombinanten prokaryotischen MOSC-Proteinen zum ersten Mal in *in vitro* Biotransformationsstudien die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen anhand der Umsetzung des Modellsubstrats Benzamidoxim gezeigt werden.

Dabei waren die Umsetzungen nicht nur von den Cosubstraten NADPH bzw. NADH und FAD sowie den jeweiligen Redoxpartnern CysJ und Fre abhängig, sondern auch vom Vorhandensein der prosthetischen Gruppen der MOSC-Proteine. Außerdem wurde anhand der prokaryotischen Elektronentransportproteine CysJ und Fre getestet, ob für das eukaryotische mARC-haltige Enzymsystem in *in vitro* Biotransformationsstudien andere Redoxpartner als Elektronenüberträger in Frage kommen. Dabei konnte allerdings eine mögliche Beteiligung von anderen prosthetischen Gruppen an der Weiterleitung der Elektronen bei der Reduktion durch das eukaryotische mARC-Enzym weder bestätigt noch vollständig ausgeschlossen werden.

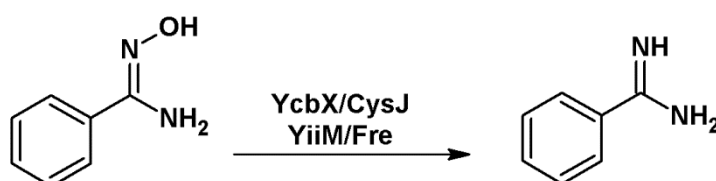


Abb. 5.5.2 Reduktion des Modellsubstrats durch die prokaryotischen MOSC-Proteine

Der Austausch des für die MOSC-Superfamilie typischen konservierten Cysteins durch ein Serin führte sowohl bei den prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM als auch bei den eukaryotischen MOSC-Proteinen (mARC) zu einem Verlust der *N*-reduktiven Aktivität. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass diese Proteine neue Mitglieder der Sulfitoxidase-Familie, bei denen der Molybdäncofaktor über einen proteineigenen hochkonservierten Cysteinschwefel gebunden wird, darstellen.

Da die prokaryotischen Proteine YcbX und YiiM den für die Funktion von MOSC-Proteinen charakteristischen hochkonservierten Cystein-Schwefel aufweisen und wie die eukaryotischen MOSC-Proteine den Molybdäncofaktor binden, der für die Funktion essentiell ist, konnte gezeigt werden, dass es sich dabei, wie per Datenbankanalyse vorausgesagt (Anantharaman und Aravind, 2002) tatsächlich um MOSC-Proteine handelt.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine mögliche physiologische Funktion des mARC-abhängigen Enzymsystems beschrieben werden. Es wurde gezeigt, dass das Dreikomponenten-Enzymsystem, bestehend aus mARC, Cytochrom *b*₅ und Cytochrom *b*₅ Reduktase, toxische und mutagene *N*-hydroxylierte Basenanaloga zu ihren entsprechenden Nucleobasen bzw. Nucleosiden reduziert.

Dabei wurden sowohl die *N*-hydroxylierten Nucleobasen *N*-Hydroxycytosin und *N*-Hydroxyadenin als auch die *N*-hydroxylierten Nucleoside *N*-Hydroxycytidin und *N*-Hydroxyadenosin durch mitochondriale subzelluläre Fraktionen umgesetzt. Hohe Umsetzungsraten wurden dabei in der Leber, aber auch in der Niere, der Schilddrüse und des Pankreas detektiert.

In vitro Biotransformationsstudien mit dem rekombinanten humanen und pflanzlichen Dreikomponenten-Enzymsystem haben gezeigt, dass alle getesteten *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch beide mARC-Isoformen reduziert werden. Allerdings stellen das humane mARC1 und das pflanzliche mARC2 jeweils die

effizientere Isoform dar. Auch mit den prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM konnte die Reduktion der *N*-hydroxylierten Basenanaloga gezeigt werden.

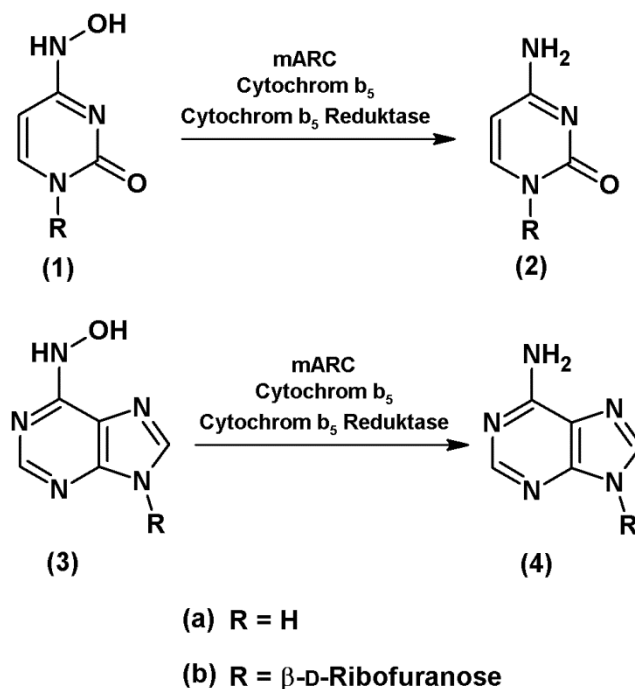


Abb. 5.5.3 Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Nucleobasen und Nucleoside durch das mARC-abhängige Enzymsystem

Reduktion von *N*-Hydroxycytosin (1a) zu Cytosin (2a), von *N*-Hydroxycytidin (1b) zu Cytidin (2b), von *N*-Hydroxyadenin (3a) zu Adenin (4a) und von *N*-Hydroxyadenosin (3b) zu Adenosin (4b)

Um die Frage zu beantworten, auf welchen Stufen des Purinmetabolismus eine Detoxifizierung der *N*-hydroxylierten Basenanaloga durch das mARC-haltige Dreikomponenten-Enzymsystem möglich ist, wurden die *in vitro* Biotransformationsstudien um das *N*-hydroxylierte Nucleotid *N*-Hydroxy-AMP erweitert.

Nachdem diese Verbindung zuerst erfolgreich in 2 Schritten synthetisiert worden war, konnte sowohl mit den porcinen Subfraktionen als auch mit den rekombinanten humanen Enzymquellen eine Reduktion zum korrespondierenden AMP gezeigt werden. Dabei zeigten beide mARC-Isoformen etwa die gleiche *N*-reduktive Aktivität. Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm dagegen bei mARC1 von der Nucleobase über das Nucleosid zum Nucleotid hin ab, während mARC2 die *N*-hydroxylierte

Nucleobase und das Nucleotid jeweils mit der gleichen Effizienz umsetzte. Auch mit den prokaryotischen MOSC-Proteinen YcbX und YiiM konnte die Reduktion des *N*-hydroxylierten Nucleotids zum AMP gezeigt werden.

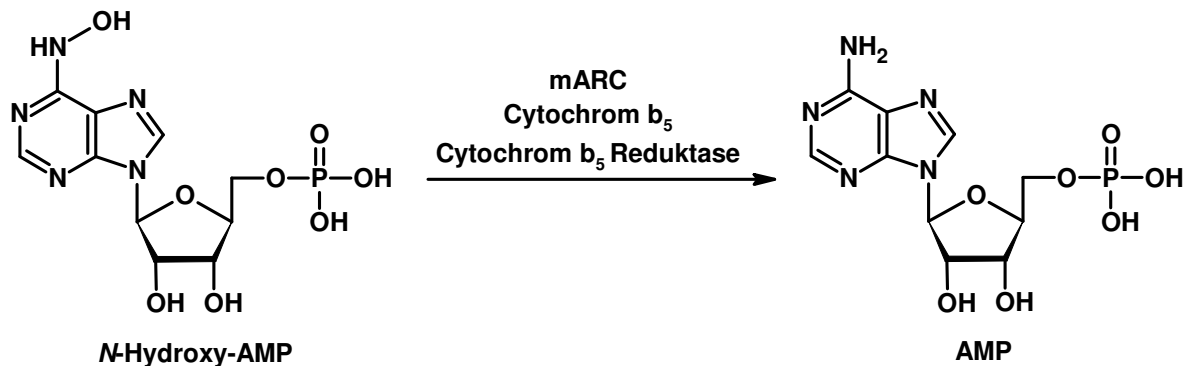


Abb. 5.5.4 Detoxifizierung des *N*-hydroxylierten Nucleotids *N*-Hydroxy-AMP durch das mARC-abhängige Enzymsystem

Ob das Fehlen von einem oder beiden mARC-Proteinen Auswirkungen auf die Entstehung von Krebs durch die mutagenen Effekte der *N*-hydroxylierten Basenanaloga hat, kann zur Zeit noch nicht beurteilt werden, da weder ein isolierter mARC-Mangel noch das Auftreten relevanter Polymorphismen bekannt ist (Ott, Dissertation in Vorbereitung).

Allerdings wurde eine down-Regulation von mARC auf mRNA-Ebene bei Colon-Karzinomen in humanen Gewebeproben beschrieben (Mikula *et al.*, 2010). Daher scheint es möglich, dass die physiologische Funktion von mARC darin besteht, die Zelle vor der Akkumulation von mutagenen Substanzen zu schützen.

Es werden allerdings noch weitere Versuche sowohl mit den Di- und Triphosphaten aber auch mit den entsprechenden Desoxyverbindungen notwendig sein, um die mARC-abhängige Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Basenanaloga als Ganzes beurteilen zu können.

Neben der Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basenanaloga wird von anderen Arbeitskreisen eine Beteiligung von mARC am Energiestoffwechsel als physiologische Funktion postuliert.

Neve *et al.* (2012) beschrieben unter anderem eine Erhöhung der *N*-reduktiven Aktivität sowie der mARC2-Level bei der Differenzierung von Fettvorläuferzellen in Adipozyten. Außerdem wurde eine Hochregulation von mARC2 auf mRNA-Ebene in Nierenzellen von diabetischen Ratten beschrieben (Malik *et al.*, 2007).

Ob mARC eventuell eine Rolle bei der Lipogenese spielt (Neve *et al.*, 2012) oder ob es sich um ein antioxidatives Protein handelt, welches bei der Regulierung von oxidativem Stress bei erhöhten Glucosekonzentrationen beteiligt ist (Malik *et al.*, 2007), wird zurzeit in weiteren Studien untersucht (Jakobs, Dissertation in Vorbereitung).

7. MATERIALIEN UND GERÄTE

7.1. SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN

Wenn nicht anders angegeben, stammten die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim. Alle Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen.

Substanz	Hersteller
6-Chloropurinribosid	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Acrylamid (Rotiphorese [®] 30 (37,5:1))	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Albumin Standard (2 mg/ml)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ammoniak	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ammoniumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Benzylamidin	Beta Pharma Inc., Branford, USA
Benzylamidoxim	Chempur GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Cytidin	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
DTT	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Eisessig	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe

Substanz	Hersteller
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
MES	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
NADH	Merck KGaA, Darmstadt
NADPH	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumoctylsulfonat	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
N-Hydroxyadenin	MP Biomedicals, Solon, USA
N-Hydroxycytosin	R.I. Chemicals, Orange, USA
ortho-Phosphorsäure, 85%	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphorylchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Plastibrand UV-Küvette mikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml/2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Salzsäure, 36%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
SDS	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
<i>tert.</i> Butylmethylether	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Tris-Base	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
TWEEN	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Whatman-Paper	Whatman GmbH, Dassel
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt

7.2. GERÄTE

Gerät	Hersteller
Cary 50 Scan UV-Visible Microplate Reader	Varian GmbH, München
Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer	Varian GmbH, München
Cary Win UV Software Version 2.0	Varian GmbH, München
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA10	Beckman Coulter, Krefeld
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf
Messer-Homogenisator	Eigenbau der Universität Austin, Texas
Millipore Schlauchpumpe für Organperfusion Model XX8200230	Millipore GmbH, Schwalbach
pH-Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Pipetten Reference® Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill	B. Braun Biotech International, Melsungen
Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
SDS-PAGE Mini Protean® Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Ultraschallbad, Sonorex, Super RK 510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti	Beckman Coulter, Krefeld

Gerät	Hersteller
Vortex Genie® 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Vortexer IKA-Vibrax-VXR	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage Sartorius CP 225D	Sartorius AG, Göttingen
Waage Sartorius L 2200P	Sartorius AG, Göttingen

8. LITERATURVERZEICHNIS

ABDUL-MASIH, M.T.; BESSMAN, M.J. (1986) Biochemical studies on the mutagen, 6-*N*-hydroxylaminopurine. Synthesis of the deoxynucleoside triphosphate and its incorporation into DNA in vitro. *J Biol Chem* 261, 2020–2026.

ADAMS, D.J.; SEILMAN, S.; AMELIZAD, Z.; OESCH, F.; WOLF, C.R. (1985) Identification of human cytochromes P-450 analogous to forms induced by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in the rat. *Biochem J* 232, 869–876.

AGUILAR, M.; KALAKOUTSKII, K.; CÁRDENAS, J.; FERNÁNDEZ, E. (1992) Direct transfer of molybdopterin cofactor to aponitrate reductase from a carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS letters* 307, 162–163.

ALIVERTI, A.; CURTI, B.; VANONI, M.A. (1999) Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins. *Methods Mol Biol* 131, 9–23.

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. (2002) MOSC domains: ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS Microbiol Lett* 207, 55–61.

ANDERSSON, S.; HOFMANN, Y.; NORDLING, A.; LI, X.Q.; NIVELIUS, S.; ANDERSSON, T.B.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; 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.

BEEDHAM, C. (1997) The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharm World Sci* 19, 255–263.

- BERGER, F.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, M.H.; ZIEGLER, M.** (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* 29, 111–118.
- BERNHEIM, M.L.; HOCHSTEIN, P.** (1968) Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 124, 436–442.
- BERNHEIM, M.L.** (1969) The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 134, 408–413.
- BITTNER, F.; OREB, M.; MENDEL, R.R.** (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.
- BORGESE, N.; D'ARRIGO, A.; SILVESTRIS, M. DE; PIETRINI, G.** (1993) NADH-cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS letters* 325, 70–75.
- BUDOWSKY, E.I.; SVERDLOV, E.D.; SHIBAEVA, R.P.; MONASTYRSKAYA, G.S.; KOCHETKOV, N.K.** (1971) Mechanism of the mutagenic action of hydroxylamine. 3. Reaction of hydroxylamine and O-methylhydroxylamine with the cytosine nucleus. *Biochim Biophys Acta* 246, 300–319.
- BUDOWSKY, E.I.; SVERDLOV, E.D.; MONASTYRSKAYA, G.S.** (1971) Mechanism of the mutagenic action of hydroxylamine. IV. Reaction of hydroxylamine and O-methylhydroxylamine with the adenine nucleus. *Biochim Biophys Acta* 246, 320–328.
- BURGIS, N.E.; BRUCKER, J.J.; CUNNINGHAM, R.P.** (2003) Repair system for noncanonical purines in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185, 3101–3110.

- CAMPBELL, W.H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 277–303.
- CHAMIZO-AMPUDIA, A.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E.; LLAMAS, A. (2011) The *Chlamydomonas reinhardtii* Molybdenum Cofactor Enzyme crARC Has a Zn-Dependent Activity and Protein Partners Similar to Those of Its Human Homologue. *Eukaryotic Cell* 10, 1270–1282.
- CLEMENT, B.; RAETHER, W. (1985) Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittel-Forsch* 35, 1009–1014.
- CLEMENT, B.; KUNZE, T. (1990) Hepatic-Microsomal *N*-Hydroxylation of Adenine to 6-*N*-Hydroxylaminopurine. *Biochem Pharmacol* 39, 925–933.
- CLEMENT, B.; KUNZE, T. (1992) The reduction of 6-*N*-hydroxylaminopurine to adenine by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 44, 1501–1509.
- CLEMENT, B.; LOMB, R.; 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.; 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.; MAU, S.; DETERS, S.; HAVEMEYER, A. (2005) 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.

- COVÈS, J.; NIVIÈRE, V.; ESCHENBRENNER, M.; FONTECAVE, M. (1993) NADPH-sulfite reductase from *Escherichia coli*. A flavin reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 268, 18604–18609.
- DAMBROVA, M.; UHLÉN, S.; WELCH, C.J.; WIKBERG, J.E. (1998) Identification of an *N*-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur J Biochem* 257, 178–184.
- DEGARDIN, M.; WEIN, S.; DURAND, T.; ESCALE, R.; VIAL, H.; VO-HOANG, Y. (2009) *N*-substituted bis-*C*-alkyloxadiazolones as dual effectors: efficient intermediates to amidoximes or amidines and prodrug candidates of potent antimalarials. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 5233–5236.
- DIX, T.A.; AIKENS, J. (1993) Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* 6, 2–18.
- DUDZINSKA, W.; HLYNCZAK, A.J. (2004) Purine nucleotides and their metabolites in erythrocytes of streptozotocin diabetic rats. *Diabetes & metabolism* 30, 557–567.
- EFREMOV, R.G.; BARADARAN, R.; SAZANOV, L.A. (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465, 441–445.
- EILERS, T.; SCHWARZ, G.; BRINKMANN, H.; WITT, C.; RICHTER, T.; NIEDER, J.; KOCH, B.; HILLE, R.; HÄNSCH, R.; MENDEL, R.R. (2001) Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J Biol Chem* 276, 46989–46994.
- ELION, G.B. (1993) Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J Med Virol* 1, 2–6.

- ELLIS, K.J.; MORRISON, J.F. (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Meth Enzymol* 87, 405–426.
- EL-TAYEB, A.; IQBAL, J.; BEHRENSWERTH, A.; ROMIO, M.; SCHNEIDER, M.; ZIMMERMANN, H.; SCHRADER, J.; MÜLLER, C.E. (2009) Nucleoside-5'-monophosphates as prodrugs of adenosine A2A receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase. *J Med Chem* 52, 7669–7677.
- ERECIŃSKA, M.; WILSON, D.F. (1982) Regulation of cellular energy metabolism. *J Membr Biol* 70, 1–14.
- ESCHENBRENNER, M.; COVÈS, J.; FONTECAVE, M. (1995) The flavin reductase activity of the flavoprotein component of sulfite reductase from *Escherichia coli*. A new model for the protein structure. *J Biol Chem* 270, 20550–20555.
- ESTABROOK, R.W.; WERRINGLOER, J. (1978) The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* 52, 212–220.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G.L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. (2004) Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* 47, 2393–2404.
- FERRARO, P.; NICOLOSI, L.; BERNARDI, P.; REICHARD, P.; BIANCHI, V. (2006) Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18586–18591.
- FREESE, E. (1959) The Difference between Spontaneous and Base-Analogue Induced Mutations of Phage T4. *Proc Natl Acad Sci USA* 45, 622–633.
- FREESE, E.; BAUTZ, E.; FREESE, E.B. (1961) The chemical and mutagenic specificity of hydroxylamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 47, 845–855.

- GARATTINI, E.; FRATELLI, M.; TERAQ, M.** (2008) Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cell Mol Life Sci* 65, 1019–1048.
- GEE, P.; MARON, D.M.; AMES, B.N.** (1994) Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11606–11610.
- GRUENEWALD, S.; WAHL, B.; BITTNER, F.; HUNGELING, H.; KANZOW, S.; KOTTHAUS, J.; SCHWERING, U.; MENDEL, R.R.; CLEMENT, B.** (2008) The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *J Med Chem* 51, 8173–8177.
- GRUNE, T.; SIEMS, W.; GERBER, G.; TIKHONOV, Y.V.; PIMENOV, A.M.; TOGUZOV, R.T.** (1991) Changes of nucleotide patterns in liver, muscle and blood during the growth of Ehrlich ascites cells: application of the reversed-phase and ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with radial compression column. *J Chromatogr* 563, 53–61.
- HAUBER, W.** (2002) Adenosin: ein Purinnukleosid mit neuromodulatorischen Wirkungen. *Neuroforum* 3, 228-234.
- HAUPTMANN, J.** (2002) Pharmacokinetics of an emerging new class of anticoagulant/antithrombotic drugs. A review of small-molecule thrombin inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 57, 751–758.
- HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.; KUNZE, T.; 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.

- HAVEMEYER, A.** (2006) Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung des Molybdäncofaktorabhängigen Enzymsystems. *Dissertation*, Kiel.
- HAVEMEYER, A.; GRUNEWALD, S.; WAHL, B.; BITTNER, F.; MENDEL, R.; ERDELYI, P.; FISCHER, J.; CLEMENT, B.** (2010) Reduction of *N*-hydroxy-sulfonamides, including *N*-hydroxy-valdecoxib, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metab Dispos* 38, 1917–1921.
- HAVEMEYER, A.; LANG, J.; CLEMENT, B.** (2011) The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab Rev* 43, 524–539.
- HEIDENREICH, T.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.R.; BITTNER, F.** (2005) Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem* 280, 4213–4218.
- HERNANDEZ-SANTIAGO, B.I.; BELTRAN, T.; STUYVER, L.; CHU, C.K.; SCHINAZI, R.F.** (2004) Metabolism of the anti-hepatitis C virus nucleoside beta-D-N4-hydroxycytidine in different liver cells. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4636–4642.
- HILLE, R.; NISHINO, T.** (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 9, 995–1003.
- HILLE, R.** (1996) The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev* 96, 2757–2816.
- HILLE, R.** (2002) Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem Sci* 27, 360–367.
- HILLE, R.; NISHINO, T.; BITTNER, F.** (2011) Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination chemistry reviews* 255, 1179–1205.
- HUANG, C.Y.** (1982) Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: the Job plot. *Meth Enzymol* 87, 509–525.

- JANION, C.; GLICKMAN, B.W. (1980) N4-hydroxycytidine: a mutagen specific for AT to GC transitions. *Mutat Res* 72, 43–47.
- JARASCH, E.D.; GRUND, C.; BRUDER, G.; HEID, H.W.; KEENAN, T.W.; FRANKE, W.W. (1981) Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 25, 67–82.
- JOHNSON, J.L.; HAINLINE, B.E.; RAJAGOPALAN, K.V. (1980) Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine, oxidase, and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component. *J Biol Chem* 255, 1783–1786.
- KADLUBAR, F.F.; MCKEE, E.M.; ZIEGLER, D.M. (1973) Reduced pyridine nucleotide-dependent N-hydroxy amine oxidase and reductase activities of hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys* 156, 46–57.
- KADLUBAR, F.F.; ZIEGLER, D.M. (1974) Properties of a NADH-dependent N-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 162, 83–92.
- KAISER, W.M.; HUBER, S.C. (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot* 52, 1981–1989.
- KARRAN, P. (2006) Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Br Med Bull* 79-80, 153–170.
- KHROMOV-BORISOV, N.N. (1997) Naming the mutagenic nucleic acid base analogs: the Galatea syndrome. *Mutat Res* 379, 95–103.

- KIMURA, S.; KAWAMURA, M.; IYANAGI, T.** (2003) Role of Thr(66) in porcine NADH-cytochrome b₅ reductase in catalysis and control of the rate-limiting step in electron transfer. *J Biol Chem* 278, 3580–3589.
- KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; REES, D.C.** (1997) Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annu Rev Biochem* 66, 233–267.
- KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; PACHECO, A.; WEHBI, W.A.; GARRETT, R.M.; RAJAGOPALAN, K.V.; ENEMARK, J.H.; REES, D.C.** (1997) Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 91, 973–983.
- KITAMURA, S.; SUGIHARA, K.; OHTA, S.** (2006) Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases. *Drug Metab Pharmacokinet* 21, 83–98.
- KOTTHAUS, J.; WAHL, B.; HAVEMEYER, A.; SCHADE, D.; GARBE-SCHONBERG, D.; MENDEL, R.; BITTNER, F.; CLEMENT, B.** (2011) Reduction of *N*(omega)-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem J* 433, 383–391.
- KOZIOL, J.** (1971) Fluorometric analyses of riboflavin and its coenzymes. *Methods in Enzymology*.
- KOZMIN, S.G.; SCHAAPER, R.M.; SHCHERBAKOVA, P.V.; KULIKOV, V.N.; NOSKOV, V.N.; GUETSOVA, M.L.; ALENIN, V.V.; ROGOZIN, I.B.; MAKAROVA, K.S.; PAVLOV, Y.I.** (1998) Multiple antimutagenesis mechanisms affect mutagenic activity and specificity of the base analog 6-*N*-hydroxylaminopurine in bacteria and yeast. *Mutat Res* 402, 41–50.
- KOZMIN, S.G.; PAVLOV, Y.I.; DUNN, R.L.; SCHAAPER, R.M.** (2000) Hypersensitivity of *Escherichia coli* Delta(*uvrB*-bio) mutants to 6-hydroxylaminopurine and other base

- analogs is due to a defect in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Bacteriol* 182, 3361–3367.
- KOZMIN, S.G.; SCHAAPER, R.M.** (2007) Molybdenum cofactor-dependent resistance to *N*-hydroxylated base analogs in *Escherichia coli* is independent of MobA function. *Mutat Res* 619, 9–15.
- KOZMIN, S.G.; LEROY, P.; PAVLOV, Y.I.; SCHAAPER, R.M.** (2008) YcbX and yjiM, two novel determinants for resistance of *Escherichia coli* to *N*-hydroxylated base analogues. *Mol Microbiol* 68, 51–65.
- KOZMIN, S.G.; WANG, J.; SCHAAPER, R.M.** (2010) Role for CysJ flavin reductase in molybdenum cofactor-dependent resistance of *Escherichia coli* to 6-*N*-hydroxylaminopurine. *J Bacteriol* 192, 2026–2033.
- KRISCHKOWSKI, C.** (2010) mARC-Expression und *N*-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen Organen. *Diplomarbeit*, Kiel.
- KROMPHOLZ, N.; KRISCHKOWSKI, C.; REICHMANN, D.; GARBE-SCHÖNBERG, D.; MENDEL, R.-R.; BITTNER, F.; CLEMENT, B.; HAVEMEYER, A.** (2012) The Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) Is Involved in Detoxification of *N*-Hydroxylated Base Analogues. *Chem Res Toxicol* 25, 2443–2450.
- KROON, A.I. DE; KOORENGEVEL, M.C.; GOERDAYAL, S.S.; MULDER, P.C.; JANSSEN, M.J.; KRUIJFF, B.** (1999) Isolation and characterization of highly purified mitochondrial outer membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (method). *Mol Membr Biol* 16, 205–211.
- KRUSE, T.; GEHL, C.; GEISLER, M.; LEHRKE, M.; RINGEL, P.; HALLIER, S.; HÄNSCH, R.; MENDEL, R.R.** (2010) Identification and biochemical characterization of molyb-

- denum cofactor-binding proteins from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 285, 6623–6635.
- KUPER, J.; LLAMAS, A.; HECHT, H.-J.; MENDEL, R.R.; SCHWARZ, G.** (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* 430, 803–806.
- KURIAN, J.R.; BAJAD, S.U.; MILLER, J.L.; CHIN, N.A.; TREPANIER, L.A.** (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.
- KURIAN, J.R.; CHIN, N.A.; LONGLAIS, B.J.; HAYES, K.L.; TREPANIER, L.A.** (2006) Reductive detoxification of arylhydroxylamine carcinogens by human NADH cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅. *Chem Res Toxicol* 19, 1366–1373.
- LAEMMLI, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- LAM, S.P.; DEVINSKY, F.; GORROD, J.W.** (1987) Biological N-oxidation of adenine and 9-alkyl derivatives. *Eur J Drug Metab Ph* 12, 239–243.
- LIN, S.; MCLENNAN, A.G.; YING, K.; WANG, Z.; GU, S.; JIN, H.; WU, C.; LIU, W.; YUAN, Y.; TANG, R.; XIE, Y.; MAO, Y.** (2001) Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *J Biol Chem* 276, 18695–18701.
- LÖFFLER, G.; PETRIDES, P.E.** (2002) Biochemie und Pathobiochemie. 7. Aufl. *Springer*, Berlin.

- LÖFFLER, G. (2005) Basiswissen Biochemie. Mit Pathobiochemie. 7. Aufl. Springer, Berlin.
- MALIK, A.N.; ROSSIOS, C.; AL-KAJAJI, G.; SHAH, A.; PAGE, R.A. (2007) Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 237–244.
- MALTHOUSE, J.P.; BRAY, R.C. (1980) The nature of the sulphur atom liberated from xanthine oxidase by cyanide. Evidence from e.p.r. spectroscopy after 35S substitution. *Biochem J* 191, 265–267.
- MASSEY, V.; EDMONDSON, D. (1970) On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J Biol Chem* 245, 6595–6598.
- MCCARTNEY, M.; MCCOY, E.C.; ROSENKRANZ, H.S.; GINER-SOROLLA, A. (1985) Carcinogenic *N*-hydroxylaminopurine derivatives do not act as base analog mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 144, 231–237.
- MENDEL, R.R.; BITTNER, F. (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta* 1763, 621–635.
- MENDEL, R.R. (2011) Cell biology of molybdenum in plants. *Plant cell reports* 30, 1787–1797.
- MENDEL, R.R.; KRUSE, T. (2012) Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1568–1579.
- MENEZES, M.R.; WAISERTREIGER, I.S.-R.; LOPEZ-BERTONI, H.; LUO, X.; PAVLOV, Y.I. (2012) Pivotal role of inosine triphosphate pyrophosphatase in maintaining genome stability and the prevention of apoptosis in human cells. *PloS One* 7, e32313.

- MIKULA, M.; RUBEL, T.; KARZMARSKI, J.; GORYCA, K.; DADLEZ, M.; OSTROWSKI, J.** (2010) Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Funct Integr Genomics*.
- MOFFATT, B.A.; ASHIHARA, H.** (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis book* 1, e0018.
- MURRAY, V.** (1987) Transversion-specific purine analogue mutagens and the mechanism of hydroxylaminopurine mutagenesis. *Mutat Res* 177, 189–199.
- NASON, A.; LEE, K.Y.; PAN, S.S.; KETCHUM, P.A.; LAMBERTI, A.; 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 USA* 68, 3242–3246.
- NAVARRO, A.; BÁNDEZ, M.J.; GÓMEZ, C.; REPETTO, M.G.; BOVERIS, A.** (2010) Effects of rotenone and pyridaben on complex I electron transfer and on mitochondrial nitric oxide synthase functional activity. *J Bioenerg Biomembr* 42, 405–412.
- NEVE, E.P.; NORDLING, A.; ANDERSSON, T.B.; HELLMAN, U.; DICZFALUSY, U.; JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M.** (2012) Amidoxime Reductase System Containing Cytochrome b₅ Type B (CYB5B) and MOSC2 Is of Importance for Lipid Synthesis in Adipocyte Mitochondria. *J Biol Chem* 287, 6307–6317.
- NICHOLS, J.; RAJAGOPALAN, K.V.** (2002) *Escherichia coli* MoeA and MogA. Function in metal incorporation step of molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem* 277, 24995–25000.
- NOSKOV, V.N.; STAAK, K.; SHCHERBAKOVA, P.V.; KOZMIN, S.G.; NEGISHI, K.; ONO, B.C.; HAYATSU, H.; PAVLOV, Y.I.** (1996) HAM1, the gene controlling 6-N-

- hydroxylaminopurine sensitivity and mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 17–29.
- NYHAN, W.L. (2005) Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol Genet Metab* 86, 25–33.
- OHNO, M.; MIURA, T.; FURUICHI, M.; TOMINAGA, Y.; TSUCHIMOTO, D.; SAKUMI, K.; NAKABEPPU, Y. (2006) A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res* 16, 567–575.
- OMURA, T. (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J biochem* 147, 297–306.
- OSTROWSKI, J.; BARBER, M.J.; RUEGER, D.C.; MILLER, B.E.; SIEGEL, L.M.; KREDICH, N.M. (1989) Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* 264, 15796–15808.
- OUATTARA, M.; WEIN, S.; CALAS, M.; HOANG, Y.V.; VIAL, H.; ESCALE, R. (2007) Synthesis and antimalarial activity of new 1,12-bis(*N,N'*-acetamidinyl)dodecane derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 593–596.
- OZOLS, J. (1989) Structure of cytochrome b_5 and its topology in the microsomal membrane. *Biochim Biophys Acta* 997, 121–130.
- PALMER, T.; SANTINI, C.L.; IOBBI-NIVOL, C.; EAVES, D.J.; BOXER, D.H.; GIORDANO, G. (1996) Involvement of the *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the

- biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 20, 875–884.
- PATEMAN, J.A.; COVE, D.J.; REVER, B.M.; ROBERTS, D.B.** (1964) A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* 201, 58–60.
- PAVLOV, Y.I.; NOSKOV, V.N.; LANGE, E.K.; MOISEEVA, E.V.; PSHENICHNOV, M.R.; KHROMOV-BORISOV, N.N.** (1991) The genetic activity of N6-hydroxyadenine and 2-amino-N6-hydroxyadenine in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 253, 33–46.
- PAVLOV, Y.I.; SUSLOV, V.V.; SHCHERBAKOVA, P.V.; KUNKEL, T.A.; ONO, A.; MATSUDA, A.; SCHAAPER, R.M.** (1996) Base analog N6-hydroxylaminopurine mutagenesis in *Escherichia coli*: genetic control and molecular specificity. *Mutat Res* 357, 1–15.
- PETERLIN-MASIC, L.; CESAR, J.; ZEGA, A.** (2006) Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* 12, 73–91.
- PLITZKO, B.** (2010) Optimierung der *in-vitro* Rekonstitution des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems. *Diplomarbeit*, Kiel.
- PONTARIN, G.; GALLINARO, L.; FERRARO, P.; REICHARD, P.; BIANCHI, V.** (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12159–12164.
- RAJAGOPALAN, K.V.** (1988) Molybdenum: an essential trace element in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 8, 401–427.
- RAJAGOPALAN, K.V.; JOHNSON, J.L.** (1992) The pterin molybdenum cofactors. *J Biol Chem* 267, 10199–10202.

- RAJAGOPALAN KV** (1996) Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Washington, DC.
- RASHIDI, M.-R.; BEEDHAM, C.; SMITH, J.S.; DAVARAN, S.** (2007) *In vitro* study of 6-mercaptopurine oxidation catalysed by aldehyde oxidase and xanthine oxidase. *Drug Metab Pharmacokinet* 22, 299–306.
- REICHARD, P.** (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 57, 349–374.
- REISS, J.** (2000) Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum Genet* 106, 157–163.
- REISS, J.; COHEN, N.; DORCHE, C.; MANDEL, H.; MENDEL, R.R.; STALLMEYER, B.; ZABOT, M.T.; DIERKS, T.** (1998) Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat Genet* 20, 51–53.
- REISS, J.; HAHNEWALD, R.** (2011) Molybdenum cofactor deficiency: Mutations in GPHN, MOCS1, and MOCS2. *Hum Mutat* 32, 10–18.
- RIVERS, S.L.; MCNAIRN, E.; BLASCO, F.; GIORDANO, G.; BOXER, D.H.** (1993) Molecular genetic analysis of the moa operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol Microbiol* 8, 1071–1081.
- RODRÍGUEZ-TRELLES, F.; TARRÍO, R.; AYALA, F.J.** (2003) Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13413–13417.
- SANDALIO, L.M.; FERNÁNDEZ, V.M.; RUPÉREZ, F.L.; DEL RÍO, L.A.** (1988) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant physiology* 87, 1–4.
- SAULTER, J.Y.; KURIAN, J.R.; TREPANIER, L.A.; TIDWELL, R.R.; BRIDGES, A.S.; BOYKIN, D.W.; STEPHENS, C.E.; ANBAZHAGAN, M.; HALL, J.E.** (2005) Unusual dehydroxyla-

- tion of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b₅ and NADH cytochrome b₅ reductase. *Drug Metab Dispos* 33, 1886–1893.
- SCHWARZ, G.** (2005) Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci* 62, 2792–2810.
- SCHWARZ, G.; MENDEL, R.R.** (2006) Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annual review of plant biology* 57, 623–647.
- SCHWARZ, G.; MENDEL, R.R.; RIBBE, M.W.** (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 460, 839–847.
- SERRES, F.J. DE; BROCKMAN, H.E.** (1993) Comparison of the spectra of genetic damage in N⁴-hydroxycytidine-induced ad-3 mutations between nucleotide excision repair-proficient and -deficient heterokaryons of *Neurospora crassa*. *Mutat Res* 285, 145–163.
- SHIRAKAWA, F.; YAMASHITA, U.; CHEDID, M.; MIZEL, S.B.** (1988) Cyclic AMP--an intracellular second messenger for interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85, 8201–8205.
- SIMANDAN, T.; SUN, J.; DIX, T.A.** (1998) Oxidation of DNA bases, deoxyribonucleosides and homopolymers by peroxy radicals. *Biochem J* 335, 233–240.
- SIROVER, M.A.** (2012) Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation. *J Cell Biochem* 113, 2193–2200.
- SLEDZIEWSKA, E.; JANION, C.** (1980) Mutagenic specificity of N⁴-hydroxycytidine. *Mutat Res* 70, 11–16.

- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76–85.
- SONG, S.; PURSELL, Z.F.; COPELAND, W.C.; LONGLEY, M.J.; KUNKEL, T.A.; MATHEWS, C.K. (2005) DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4990–4995.
- SPYROU, G.; HAGGÅRD-LJUNGQUIST, E.; KROOK, M.; JÖRNVALL, H.; NILSSON, E.; REICHARD, P. (1991) Characterization of the flavin reductase gene (*fre*) of *Escherichia coli* and construction of a plasmid for overproduction of the enzyme. *J Bacteriol* 173, 3673–3679.
- STEVENSON, C.E.; SARGENT, F.; BUCHANAN, G.; PALMER, T.; LAWSON, D.M. (2000) Crystal structure of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MobA from *Escherichia coli* at near-atomic resolution. *Structure* 8, 1115–1125.
- STICHT, H.; RÖSCH, P. (1998) The structure of iron-sulfur proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 70, 95–136.
- STOCCHI, V.; CUCCHIARINI, L.; MAGNANI, M.; CHIARANTINI, L.; PALMA, P.; CRESCENTINI, G. (1985) Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem* 146, 118–124.
- SU, A.I.; WILTSHIRE, T.; BATALOV, S.; LAPP, H.; CHING, K.A.; BLOCK, D.; ZHANG, J.; SODEN, R.; HAYAKAWA, M.; KREIMAN, G.; COOKE, M.P.; WALKER, J.R.; HOGENESCH, J.B. (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6062–6067.

- TATSUMI, K.; ISHIGAI, M. (1987) Oxime-metabolizing activity of liver aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys* 253, 413–418.
- TESCHNER, J.; LACHMANN, N.; SCHULZE, J.; GEISLER, M.; SELBACH, K.; SANTAMARIA-ARAÚJO, J.; BALK, J.; MENDEL, R.R.; BITTNER, F. (2010) A novel role for *Arabidopsis* mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *The Plant cell* 22, 468–480.
- TESTA, B.; MAYER, J.M. (1998) Design of intramolecularly activated prodrugs. *Drug Metab Rev* 30, 787–807.
- TOO, K.; BROWN, D.M.; BONGARD, E.; YARDLEY, V.; VIVAS, L.; LOAKES, D. (2007) Antimalarial activity of N6-modified purine analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 5551–5562.
- VASSILAKOS, A.; COHEN-DOYLE, M.F.; PETERSON, P.A.; JACKSON, M.R.; WILLIAMS, D.B. (1996) The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J* 15, 1495–1506.
- VELDMAN, A.; SANTAMARIA-ARAÚJO, J.A.; SOLLAZZO, S.; PITT, J.; GIANELLO, R.; YAPLITO-LEE, J.; WONG, F.; RAMSDEN, C.A.; REISS, J.; COOK, I.; FAIRWEATHER, J.; SCHWARZ, G. (2010) Successful treatment of molybdenum cofactor deficiency type A with cPMP. *Pediatrics* 125, e1249-54.
- WAHL, R.C.; RAJAGOPALAN, K.V. (1982) Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J Biol Chem* 257, 1354–1359.
- WAHL, B.; REICHMANN, D.; NIKS, D.; KROMPHOLZ, N.; HAVEMEYER, A.; CLEMENT, B.; MESSERSCHMIDT, T.; ROTHKEGEL, M.; BIESTER, H.; HILLE, R.; MENDEL, R.R.; BITTNER, F. (2010) Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 sug-

- gests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J Biol Chem* 285, 37847–37859.
- WAHL, B.** (2010) Grundlegende Charakterisierung des neuen Molybdo-Enzyms 'Mitochondrial Amidoxime Reducing Component' mARC in *Homo sapiens* und *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation*, Braunschweig.
- WAISERTREIGER, I.S.; MENEZES, M.R.; RANDAZZO, J.; PAVLOV, Y.I.** (2010) Elevated Levels of DNA Strand Breaks Induced by a Base Analog in the Human Cell Line with the P32T ITPA Variant. *J Nucleic Acids*.
- WHITBY, L.G.** (1953) A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem J* 54, 437–442.
- WHITE, R.H.** (2010) The twists and turns of enzyme function. *J Bacteriol* 192, 2023–2025.
- WOLLERS, S.; HEIDENREICH, T.; ZAREPOUR, M.; ZACHMANN, D.; KRAFT, C.; ZHAO, Y.; MENDEL, R.R.; BITTNER, F.** (2008) Binding of sulfurated molybdenum cofactor to the C-terminal domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem* 283, 9642–9650.
- WUEBBENS, M.M.; RAJAGOPALAN, K.V.** (1995) Investigation of the early steps of molybdopterin biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of *in vivo* labeling studies. *J Biol Chem* 270, 1082–1087.
- YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 468, 89–92.

ZALK, R.; ISRAELSON, A.; GARTY, E.S.; AZOULAY-ZOHAR, H.; SHOSHAN-BARMATZ, V.

(2005) Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 386, 73–83.

ZÖLLNER, N. (1982) Purine and pyrimidine metabolism. *P Nutr Soc* 41, 329–342.

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, 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.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze danke ich für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen wertvollen Ratschläge.

Frau Dr. Antje Havemeyer danke ich für ihre engagierte Unterstützung, hilfreichen Anregungen und unermüdliche Betreuung sowie für die Bereitstellung des nativen mARC Proteins.

Für die hervorragende Zusammenarbeit, die Bereitstellung der rekombinanten Proteine sowie die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge möchte ich mich bei Debora Reichmann und Dr. Florian Bittner (TU Braunschweig) bedanken.

Für die Möglichkeit und die Hilfe bei der ICP-MS-Messung am Institut für Geowissenschaften der CAU Kiel bedanke ich mich bei Dr. Dieter Garbe-Schönberg und Dipl.-Ing. Ulrike Westernstör.

Bei Sven Wichmann möchte ich mich herzlich für die Einarbeitung und die Wartung der HPLC-Anlagen bedanken. Petra Köster danke ich für die gute technische Assistenz sowie die unterhaltsame Zeit beim Spinning.

DANKSAGUNG

Carmen Krischkowski danke ich für die zur Verfügung gestellten subzellulären Fraktionen der Leber sowie den entsprechenden mARC1-, mARC2- und GAPDH-Blot.

Bei Antje, Heyka, Karin und Zsolt bedanke ich mich für das kritische und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die unkomplizierte und gute Zusammenarbeit bei der Semesterbetreuung möchte ich mich bei Eva, Karin, Birte, Antje und Thomas sowie bei allen Assistenten des zweiten Semesters bedanken.

Danilo danke ich für die tolle Zusammenarbeit sowie die nette, lustige und angenehme Bürogemeinschaft während der letzten vier Jahre.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Arbeitskreis und insbesondere der „mARC-Gruppe“ für das nette Arbeitsklima und die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Zsolt bedanken, der immer für mich da ist, stets an mich glaubt, mich in allem unterstützt und damit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen Dank für das unermüdliche Korrekturlesen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich immer in allem unterstützt haben. Vielen Dank dafür, ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Familienname	Nina Krompholz
Geburtsdatum	12. August 1983
Geburtsort	Brunsbüttel
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSSBILDUNG

1990 - 1994	Grundschule, Meldorf
1994 - 2003	Meldorfer Gelehrtenschule

STUDIUM

2003- 2007	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dezember 2007 – Mai 2008	Pharmaziepraktikum in der Alten Rats Apotheke, Kiel
Juli 2008 – Dezember 2008	Pharmaziepraktikum bei Mundipharma Research GmbH & Co KG, Limburg
Februar 2009	Erteilung der Approbation

PROMOTION

seit März 2009	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik
----------------	--

Der Inhalt dieser Arbeit wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

PUBLIKATIONEN

KROMPHOLZ, N.; KRISCHKOWSKI, C.; REICHMANN, D.; GARBE-SCHÖNBERG, D.; MENDEL, R.-R.; BITTNER, F.; CLEMENT, B.; HAVEMEYER, A. (2012) The Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) Is Involved in Detoxification of *N*-Hydroxylated Base Analogues. *Chem Res Toxicol* 25, 2443–2450.

WAHL, B.; REICHMANN, D.; NIKS, D.; KROMPHOLZ, N.; HAVEMEYER, A.; CLEMENT, B.; MESSERSCHMIDT, T.; ROTHKEGEL, M.; BIESTER, H.; HILLE, R.; MENDEL, R.R.; BITTNER, F. (2010) Biochemical and Spectroscopic Characterization of the Human Mitochondrial Amidoxime Reducing Components hmARC-1 and hmARC-2 Suggests the Existence of a New Molybdenum Enzyme Family in Eukaryotes. *J Biol Chem* 285, 37847–37859.

TAGUNGSBEITRÄGE

KROMPHOLZ, N.; HAVEMEYER A.; WAHL B.; BITTNER F.; MENDEL R.R.; CLEMENT B. (2010) The newly discovered molybdenum enzyme mARC is involved in the reduction of *N*-hydroxylated DNA bases. *DPhG Jahrestagung*, Braunschweig.

KROMPHOLZ, N.; JAKOBS H.; REICHMANN D.; BITTNER F.; MENDEL R.R.; CLEMENT B.; HAVEMEYER A. (2011) Role of the mammalian molybdoenzyme mARC in xenobiotic metabolism. *Molybdenum and Tungsten Enzyme Meeting*, Edmonton.

KROMPHOLZ, N.; REICHMANN, D.; BITTNER, F.; MENDEL R.R.; CLEMENT B.; HAVEMEYER A. (2012) Detoxification of N-hydroxylated base analogues by the mARC-containing enzyme system. *MDO and European Regional ISSX Meeting*, Noordwijk aan Zee.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Januar 2013

Nina Krompholz

Beide Isoformen des kürzlich entdeckten vierten humanen Molybdoenzym mARC (mitochondrial Amidoxime Reducing Component), welches zu der neuen Domänen-Superfamilie der MOSC-Proteine zählt, sind zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b₅ und dessen Reduktase an der Reduktion verschiedener N-hydroxylierter Verbindungen beteiligt.

In dieser Arbeit konnte die Reduktion des aliphatischen Benzylamidoxims zum entsprechenden Amidin in *in vitro* Biotransformationsstudien mit porcinen Lebermitochondrien und rekombinanten Enzymquellen gezeigt werden. Die Umsetzungsraten waren dabei vergleichbar mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim.

Die Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen durch die rekombinanten prokaryotischen MOSC-Proteine YcbX und YiiM konnte in *in vitro* Studien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim sowie mit N-hydroxylierten Basenanaloga nachgewiesen werden. Durch den Verlust der N-reduktiven Aktivität beim Austausch des für die MOSC-Proteine typischen hochkonservierten Cysteins durch ein Serin kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die MOSC-Proteine YcbX und YiiM als auch die eukaryotischen mARC-Proteine zur Sulfitoxidase-Familie gehören.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine mögliche physiologische Funktion des mARC-abhängigen Dreikomponenten-Enzymsystems beschrieben. Dabei konnte nicht nur die Reduktion der mutagenen und toxischen N-hydroxylierten Nucleobasen N-Hydroxycytosin und N-Hydroxyadenin sowie der Nucleoside N-Hydroxycytidin und N-Hydroxyadenosin sondern auch des Nucleotids N-Hydroxy-AMP zu den entsprechenden physiologischen Verbindungen gezeigt werden. Die N-reduktive Aktivität war in den Mitochondrien angereichert, wobei mit Enzymquellen aus Leber, Niere, Schilddrüse und Pankreas jeweils die höchsten Umsetzungen erzielt wurden. Mit beiden rekombinanten mARC-Isoformen konnte eine Umsetzung gezeigt werden, wobei das humane mARC1 die effizientere Isoform darstellte. Die Umsetzungsrate nahm dabei von der Nucleobase über das Nucleosid zum Nucleotid hin ab.

The two newly discovered isoforms of the mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC), which belong to the MOSC domain superfamily, are the fourth human molybdenum enzymes and catalyse together with their electron transport proteins cytochrome b_5 and NADH cytochrome b_5 reductase the reduction of different *N*-hydroxylated compounds.

The reduction of the aliphatic benzylamidoxime to the corresponding amidine was demonstrated in *in vitro* studies with porcine liver mitochondria and the recombinant three component enzyme system. The reduction rate was comparable with the model substrate benzamidoxime.

The reduction of *N*-hydroxylated compounds by the recombinant prokaryotic MOSC-proteins YcbX and YiiM was demonstrated in *in vitro* studies with the model substrate benzamidoxime and *N*-hydroxylated base analogues. Due to a loss of activity by substituting the absolutely conserved cysteine for a serine, it can be assumed that the MOSC-proteins YcbX and YiiM but also the eukaryotic mARC proteins belong to the sulfite oxidase family.

In this study a possible physiological function of the mARC-containing enzyme system was described. The reductive detoxification of the toxic and mutagenic *N*-hydroxylated nucleobases *N*-hydroxycytosine and *N*-hydroxyadenine and the nucleosides *N*-hydroxycytidine and *N*-hydroxyadenosine as well as the nucleotide *N*-hydroxy-AMP to their corresponding endogenous compounds by the mARC-containing enzyme system was demonstrated. The *N*-reductive activity was most pronounced in enriched mitochondrial fractions with the highest conversion rates being detectable by enzyme sources of liver, kidney, thyroid, and pancreas. *In vitro* assays with the respective recombinant three component enzyme system showed that both mARC enzymes are able to reduce *N*-hydroxylated base analogues with the human mARC1 representing the more efficient isoform. The reduction rate decreased from the nucleobase over the nucleoside to the nucleotide.