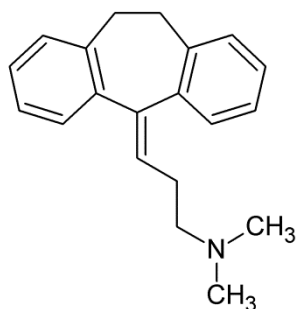
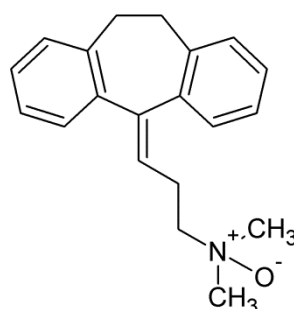


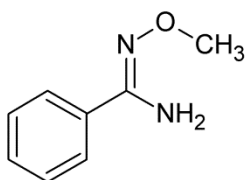
STRUKTURFORMELVERZEICHNIS



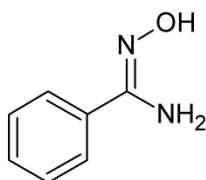
Amitriptylin



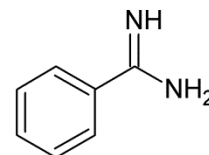
Amitriptylin-N-oxid



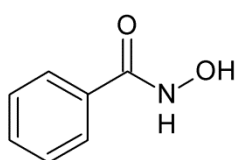
O-Methylbenzamidoxim



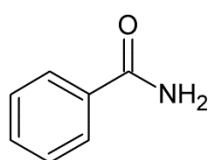
Benzamidoxim



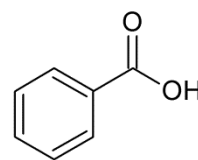
Benzamidin



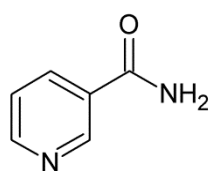
Benzhydroxamsäure



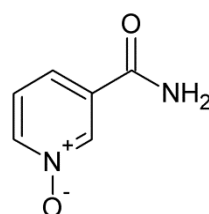
Benzamid



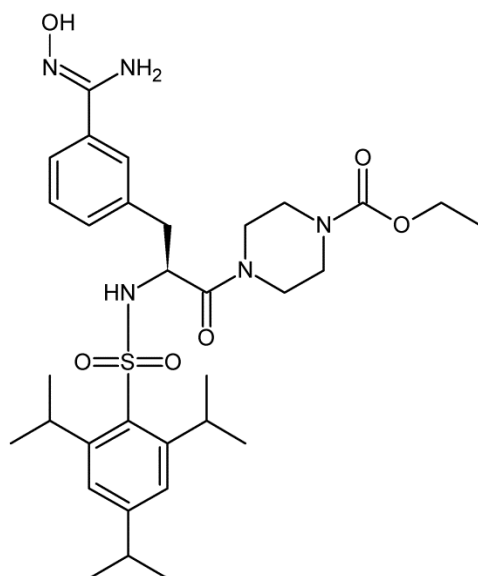
Benzoessäure



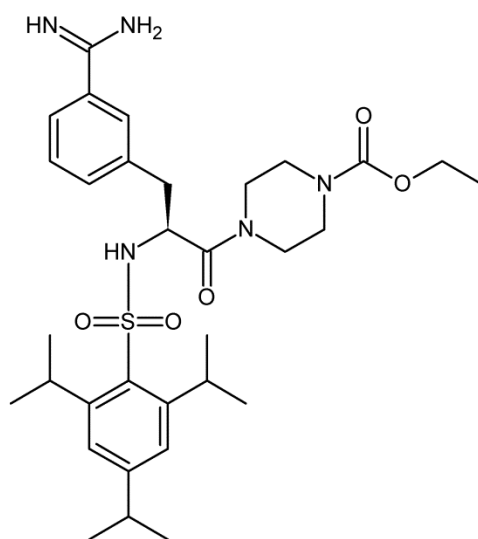
Nicotinamid



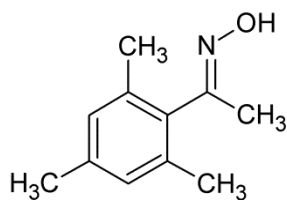
Nicotinamid-N-oxid



N- α -(2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl)-3-hydroxyamidino-(L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid (Upamostat)

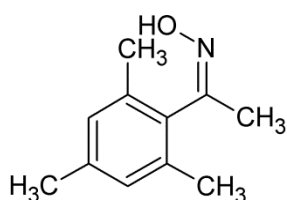


N- α -(2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl)-3-amidino-(L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid (WX-UK1)



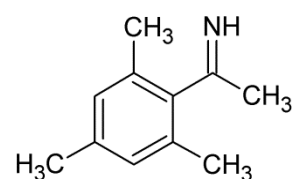
(E)

2,4,6-Trimethylacetophenoxim



(Z)

2,4,6-Trimethylacetophenimin



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG	1
1.1. FREMDSTOFFMETABOLISMUS	1
1.1.1. Biotransformation.....	1
1.1.2. Reduktion <i>N</i> -oxygenierter Verbindungen.....	4
1.2. DAS MARC-HALTIGE ENZYMSYSTEM	9
1.2.1. Molybdoenzyme	9
1.2.1.1. Enzyme der Xanthinoxidase-Familie	14
1.2.1.2. Enzyme der Sulfitoxidase-Familie.....	15
1.2.1.3. Die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (<i>mARC</i>)	16
1.2.2. Cytochrom <i>b</i> ₅	21
1.2.3. Cytochrom <i>b</i> ₅ Reduktase	21
1.2.4. <i>In vitro</i> Biotransformationsstudien	22
1.3. THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	25
2. N-REDUKTIVE AKTIVIERUNG DES PRODRUGS UPAMOSTAT DURCH MARC	27
2.1. EINLEITUNG.....	27
2.2. ZIELSETZUNG	30
2.3. METHODEN	31
2.3.1. Materialien und Geräte.....	31
2.3.2. Gewinnung und Charakterisierung der Proteinquellen.....	31
2.3.2.1. Rekombinante Enzyme des <i>mARC</i> -haltigen Enzymsystems	31
2.3.2.2. Molybdänbestimmung der <i>mARC</i> -Enzyme durch ICP-MS.....	31

2.3.2.3. Häm-Gehaltsbestimmung von Cytochrom <i>b</i> ₅	32
2.3.2.4. FAD-Gehaltsbestimmung der Cytochrom <i>b</i> ₅ Reduktase	32
2.3.2.5. Gewinnung der porcinen subzellulären Fraktionen.....	33
2.3.2.6. Isolierung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion	35
2.3.2.7. Proteingehaltsbestimmung.....	36
2.3.2.8. SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse	36
2.3.3. HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Upamostat und WX-UK1	41
2.3.4. HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Benzamidoxim und Benzamidin.....	43
2.3.5. Löslichkeit und Stabilität von Upamostat in Abhängigkeit vom pH-Wert	44
2.3.6. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die N-Reduktion	45
2.3.7. Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Biotransformationsansätze.....	46
2.3.7.1. Einfluss des Puffersystems auf die N-Reduktion	47
2.3.7.2. Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Reduktion	48
2.3.7.3. Bestimmung der Zeitabhängigkeit	48
2.3.7.4. Bestimmung der Substratabhängigkeit	49
2.4. ERGEBNISSE	50
2.4.1. Quantifizierung von WX-UK1 durch HPLC	50
2.4.2. Löslichkeit und Stabilität von Upamostat in Abhängigkeit vom pH-Wert	52
2.4.3. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die N-Reduktion	53
2.4.4. Einfluss des Puffersystems auf die N-Reduktion	55
2.4.5. Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Reduktion	57

2.4.6. Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Reduktion	58
2.4.7. Bestimmung und Vergleich der Anreicherung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität in isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen mit Upamostat und Benzamidoxim.....	60
2.4.8. Reduktion von Upamostat durch porcine subzelluläre Leberfraktionen - Ermittlung des Cosubstrat-Einflusses.....	63
2.4.9. Vergleich der <i>N</i> -reduktiven Aktivität in porcinen hepatischen und extrahepatischen Mitochondrienfraktionen	65
2.4.10. Reduktionsstudien mit dem rekombinanten humanen Dreikomponentenzymssystem mARC	66
2.4.11. Bestimmung der Substratabhängigkeit.....	68
2.5. DISKUSSION	69
3. ZELLKULTURSTUDIEN MIT HUMANEN KREBSZELLINIEN ZUR BESTIMMUNG DER <i>N</i>-REDUKTIVEN AKTIVITÄT DURCH MARC.....	73
3.1. EINLEITUNG.....	73
3.2. ZIELSETZUNG	74
3.3. METHODEN	76
3.3.1. Materialien und Geräte.....	76
3.3.2. HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Benzamidoxim und Benzamidin.....	76
3.3.3. Kultivierung humaner Zelllinien	77
3.3.4. Metabolismusstudien humaner Zelllinien – Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität	78
3.3.5. SDS-PAGE und Immunblot-Analyse	79

3.4.	ERGEBNISSE	80
3.4.1.	Quantifizierung von Benzamidin per HPLC.....	80
3.4.2.	Amidoximreduktion durch humane Zelllinien	81
3.4.3.	Immunblotanalyse zur Identifizierung von mARC	84
3.5.	DISKUSSION	85
4.	BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN VON OXIMEN	87
4.1.	EINLEITUNG.....	87
4.2.	ZIELSETZUNG	93
4.3.	METHODEN	95
4.3.1.	Materialien und Geräte.....	95
4.3.2.	Proteinquellen	95
4.3.3.	HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von (E)- und (Z)- 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim und dessen Imin.....	96
4.3.4.	Löslichkeit und Stabilität von 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim	97
4.3.5.	Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Biotransformationsansätze.....	98
4.3.5.1.	<i>Bestimmung der Zeitabhängigkeit</i>	99
4.3.5.2.	<i>Bestimmung der Substratabhängigkeit</i>	99
4.4.	ERGEBNISSE	100
4.4.1.	Kalibrierung und Wiederfindung.....	100
4.4.2.	N-Reduktion durch isolierte porcine subzelluläre Fraktionen.....	102
4.4.2.1.	<i>Bestimmung der Substratlöslichkeit und -stabilität</i>	102
4.4.2.2.	<i>Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Reduktion</i>	103
4.4.2.3.	<i>Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen</i>	104

4.4.2.4. Bestimmung der Substratabhängigkeit	106
4.4.2.5. Vergleich der N-reduktiven Aktivität in isolierten hepatischen und extrahepatischen porcinen subzellulären Organfraktionen.....	107
4.4.3. Reduktionsstudien mit dem rekombinanten humanen Dreikomponentenzymssystem mARC	109
4.4.3.1. Bestimmung der Substratabhängigkeit	109
4.4.3.2. Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit humanem mARC-1 und mARC-2	111
4.5. DISKUSSION	113
5. N-REDUKTION ALIPHATISCHER UND AROMATISCHER N-OXIDE	117
5.1. EINLEITUNG.....	117
5.1.1. Chemische Eigenschaften von N-Oxiden.....	117
5.1.2. Bedeutung von N-Oxiden als Arzneistoffe.....	117
5.1.3. Enzymatische und nichtenzymatische Reduktion von N-Oxiden	119
5.1.3.1. Das aliphatische N-Oxid des Amitriptylins.....	120
5.1.3.2. Das aromatische, heterocyclische N-Oxid des Nicotinamids	123
5.2. THEMA UND ZIELSETZUNG.....	126
5.3. METHODEN	127
5.3.1. Materialien und Geräte.....	127
5.3.2. Proteinquellen	127
5.3.3. HPLC-Analytik	128
5.3.3.1. Trennung von Amitriptylin-N-oxid und Amitriptylin	128
5.3.3.2. Trennung von Nicotinamid-N-oxid und Nicotinamid	129
5.3.4. Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Biotransformationsansätze.....	131

5.4.	ERGEBNISSE	133
5.4.1.	HPLC – Quantifizierung von Amitriptylin und Nicotinamid.....	133
5.4.1.1.	<i>Kalibrierung und Wiederfindung von Amitriptylin.....</i>	133
5.4.1.2.	<i>Kalibrierung und Wiederfindung von Nicotinamid</i>	135
5.4.2.	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien von Amitriptylin- <i>N</i> -oxid.....	136
5.4.2.1.	<i>N</i> -Reduktion durch porcine subzelluläre Fraktionen	137
5.4.2.2.	<i>N</i> -Reduktion durch das rekombinante humane Enzymsystem	139
5.4.2.2.1.	Bestimmung der Zeitabhängigkeit	139
5.4.2.2.2.	Charakterisierung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch Inkubation mit mARC-1 und mARC-2.....	140
5.4.2.2.3.	Bestimmung der Substratabhängigkeit.....	142
5.4.3.	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien von Nicotinamid- <i>N</i> -oxid.....	143
5.4.3.1.	<i>N</i> -Reduktion durch porcine subzelluläre Fraktionen	143
5.4.3.2.	<i>N</i> -Reduktion durch das rekombinante humane Enzymsystem	145
5.4.3.2.1.	Bestimmung der Zeitabhängigkeit	145
5.4.3.2.2.	Charakterisierung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch Inkubation mit mARC-1 und mARC-2.....	146
5.4.3.2.3.	Bestimmung der Substratabhängigkeit.....	148
5.5.	DISKUSSION	150
6.	BIOTRANSFORMATION VON HYDROXAMSÄUREN.....	155
6.1.	EINLEITUNG.....	155
6.2.	ZIELSETZUNG	160
6.3.	METHODEN	161
6.3.1.	Materialien und Geräte	161
6.3.2.	Proteinquellen	161

6.3.3. HPLC-Analytik zur Trennung von Benzhydroxamsäure, Benzamid und Benzoessäure.....	161
6.3.4. Zusammensetzung der Inkubationsansätze.....	163
6.3.4.1. Inkubation mit porcinen subzellulären Fraktionen.....	163
6.3.4.2. Inkubation mit dem rekombinanten Enzymsystem.....	164
6.3.4.3. Bestimmung der Zeitabhängigkeit	164
6.3.4.4. Bestimmung der Substratabhängigkeit	164
6.4. ERGEBNISSE	165
6.4.1. HPLC - Quantifizierung von Benzamid und Benzoessäure	165
6.4.2. N-Reduktion durch isolierte porcine subzelluläre Fraktionen.....	167
6.4.2.1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit	167
6.4.2.2. Bestimmung der Substratabhängigkeit	169
6.4.2.3. Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit porcinen subzellulären Fraktionen.....	171
6.4.3. N-Reduktion durch das rekombinante mARC-haltige Enzymsystem	174
6.4.3.1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit	174
6.4.3.2. Bestimmung der Substratabhängigkeit	175
6.4.3.3. Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit humanem mARC-1 und mARC-2	178
6.5. DISKUSSION	179
7. BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN O-ALKYLIERTER AMIDOXIME.....	183
7.1. EINLEITUNG.....	183
7.2. ZIELSETZUNG	186
7.3. METHODEN	188
7.3.1. Materialien und Geräte.....	188

7.3.2. Synthese von <i>O</i> -Methylbenzamidoxim.....	188
7.3.3. Proteinquellen.....	189
7.3.4. HPLC-Analytik.....	189
7.3.5. Zusammensetzung der Inkubationsansätze.....	190
7.4. ERGEBNISSE.....	192
7.4.1. Quantifizierung von Benzamidoxim und Benzamidin.....	192
7.4.2. <i>In vitro</i> Biotransformation von <i>O</i> -Methylbenzamidoxim im isolierten porcinen und humanen rekombinanten Enzymsystem.....	193
7.5. DISKUSSION.....	196
8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	199
9. MATERIALIEN UND GERÄTE.....	205
9.1. SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN.....	205
9.2. GERÄTE.....	208
10. LITERATURVERZEICHNIS.....	211

1. EINFÜHRUNG

1.1. FREMDSTOFFMETABOLISMUS

1.1.1. Biotransformation

Biotransformation beschreibt die Umwandlung von körperfremden Substanzen. Die dadurch entstandenen Produkte werden auch als Metabolite bezeichnet (Mutschler *et al.*, 2008). Zu den körperfremden Stoffen (Xenobiotika) gehören beispielsweise Arzneistoffe, Konservierungs- und Geschmacksmittel sowie Pflanzeninhaltsstoffe und eine Vielzahl synthetischer organischer Verbindungen, die zum Teil als Abfallprodukte in die Umwelt gelangen (Löffler und Petrides, 1998). Die Umwandlungsprozesse erfolgen vor allem in der Leber, finden aber in untergeordneter Form auch in anderen Organen, wie z.B. im Darm, in der Niere, der Lunge, der Milz, der Muskulatur, der Haut oder im Blut, statt (Mutschler *et al.*, 2008). Sie haben zum Ziel lipophile Verbindungen in hydrophile Metabolite zu überführen, die anschließend renal oder biliär ausgeschieden werden können. Die Geschwindigkeit der Arzneistoffmetabolisierung bestimmt im Wesentlichen die Wirkdauer des Pharmakons (Steinhilber *et al.*, 2005).

Neben der Inaktivierung und Ausscheidung körperfremder Metabolite können durch Biotransformationsprozesse Verbindungen mit biologischer Wirkung entstehen. Dieser Effekt kann bei Arzneistoffen (den sogenannten Prodrugs) erwünscht sein, kann aber auch abhängig von der Verbindung zu toxischen und oft cancerogenen Verbindungen führen. Derartige reaktive Metabolite können auf jeder Stufe der Biotransformation entstehen (Löffler und Petrides, 1998).

Biotransformationsprozesse werden in Reaktionen der Phase I und Phase II eingeteilt (siehe Abb. 1.1.1). In neueren Veröffentlichungen werden aktive transmembranäre

Transportprozesse auch als Phase III-Reaktionen bezeichnet. Diese dienen der Elimination von Stoffen aus der Zelle (Mutschler *et al.*, 2008).

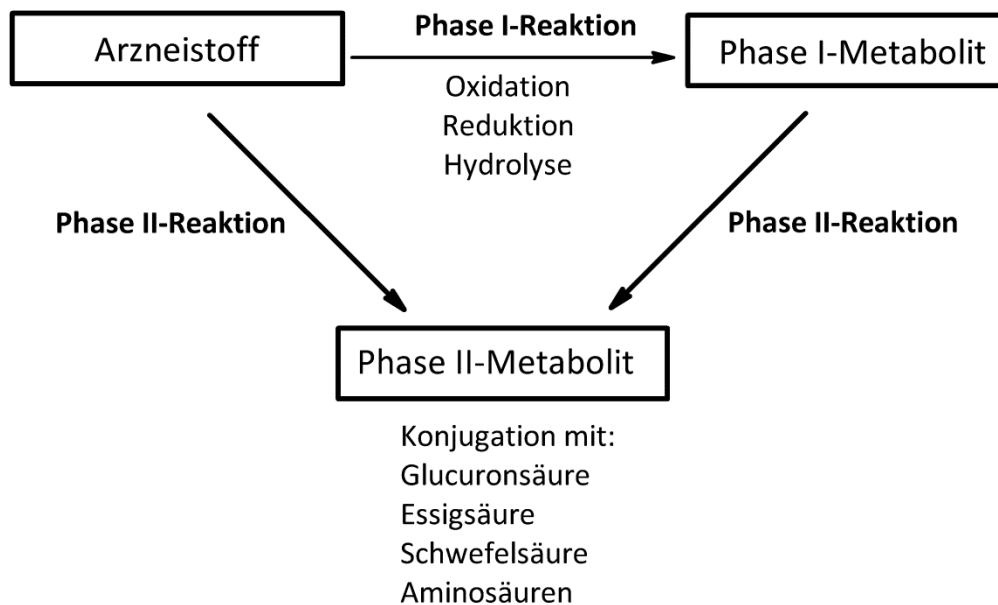


Abb. 1.1.1: Phasen der Metabolisierung von Xenobiotika (nach Steinhilber *et al.*, 2005)

Zur Phase I zählen oxidative, reduktive und hydrolytische Metabolisierungsreaktionen (Steinhilber *et al.*, 2005). Durch die Einführung funktioneller Gruppen in das Arzneistoffmolekül kommt es in den meisten Fällen zu einer Verstärkung der Polarität und damit zu einer verbesserten Eliminierung. Die entstandenen Metabolite der Phase I bilden häufig die Substrate für Phase II-Reaktionen (Testai, 2001). Phase II-Reaktionen werden auch als Konjugationsreaktionen bezeichnet. Dabei werden oft Hydroxyl- oder Aminogruppen, die bereits im Molekül vorhanden sind oder durch Phase I-Reaktionen in das Molekül eingefügt wurden, für Konjugationen genutzt. Diese erfolgen katalytisch durch Transferasen. Zu den Konjugationsreaktionen gehören Glucuronidierungen, Sulfatierungen, Konjugationen mit Gluthation, Glycinierungen, Acetylierungen sowie N- und O-Methylierungen (Steinhilber *et al.*, 2005).

Die Enzyme des Phase I-Metabolismus sind vor allem an bzw. in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert (z.B. die Cytochrom P450 (CYP 450)-Monooxygenasen). Sie können auch membrangebunden in Mitochondrien (z.B. die NADH-Cytochrom b₅ Reduktase) oder löslich im Cytosol (z.B. die Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen und die Xanthinoxidase) vorkommen (Löffler und Petrides, 1998).

Zu den bedeutendsten Reaktionen der Phase I gehören die Oxidationsreaktionen. Es gibt eine Vielzahl von körpereigenen und -fremden Substanzen, die durch beteiligte Enzyme, wie z.B. Oxidasen, Monooxygenasen, Dioxygenasen oder auch Peroxidasen, verstoffwechselt werden (Steinhilber *et al.*, 2005). Monooxygenasen, wie CYP450 und FMO, bauen ein Sauerstoffatom des Moleküls O₂ in den Fremdstoff ein, wobei das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Durch Dioxygenasen (z.B. im Aminosäurestoffwechsel die Homogentisatdioxygenase) werden beide Atome des Sauerstoffs in das Molekül eingefügt (Löffler und Petrides, 1998). Einige der wichtigsten Oxidationsreaktionen sind die Oxidation von Alkoholen, Aldehyden und aliphatischen Ketten, die oxidative N- und O-Desalkylierung sowie die Desaminierung. Oxidationen können auch am Stickstoff- und Schwefelatom stattfinden. Weitere Reaktionen sind Desulfurierung, Epoxidierung und die Hydroxylierung von Aromaten (Mutschler *et al.*, 2008).

Eine Vielzahl dieser Reaktionen können durch die Enzyme der CYP 450-Familie katalysiert werden. CYP 450-Enzyme sind hämproteinhaltige Monooxygenasen. Die verschiedenen Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität, Enzymaktivität und der Gewebeverteilung und unterliegen dem genetischen Polymorphismus (Steinhilber *et al.*, 2005).

Eine weitere Gruppe der Phase I-Reaktionen bilden die Hydrolysen (Mutschler *et al.*, 2008). Enzyme dieser Reaktionen kommen sowohl intra- als auch extrazellulär, mikrosomal gebunden oder in gelöster Form vor. Wichtige Reaktionen sind die

Spaltung von Estern und Amiden zu Säuren und Alkoholen bzw. Aminen durch Esterasen, die Umwandlung von Epoxiden zu vicinalen Diolen durch Epoxid-hydrolasen, die Hydrolyse von Acetalen (Glykosiden) durch Glykosidasen sowie die Hydrolyse von Glucuroniden durch Glucuronidasen (Mutschler *et al.*, 2008).

1.1.2. Reduktion *N*-oxygenierter Verbindungen

Reduktionen sind im Gegensatz zu den Oxidationsreaktionen bisher weniger umfassend erforscht. Enzyme, die Carbonylverbindungen reduzieren können, sind die Alkohol-Dehydrogenase oder die cytoplasmatische Aldo-Keto-Reduktase. Azoverbindungen werden zu primären Aminen über eine Hydrazo-Zwischenstufe reduziert. Das daran beteiligte Enzym ist vermutlich u.a. die NADPH-CYP 450 Reduktase (Mutschler *et al.*, 2008). Nitroverbindungen können unter anderem durch Cytochrom P450-Enzyme (Guengerich, 2001) und die Molybdoenzyme Xanthinoxidoreduktase (Ueda *et al.*, 2005) und Aldehydoxidase (Dick *et al.*, 2006) reduziert werden. Für die Aldehydoxidase und Xanthinoxidoreduktase konnte unter anderem eine Beteiligung an der enzymatischen Reduktion von Hydroxamsäuren (Sugihara und Tatsumi, 1986), *N*-Oxiden (Takekawa *et al.*, 2001b) und Oximen (u.a. Acetophenonoxim, Salicylaldoxim und *D*-Camphoroxim) (Tatsumi und Ishigai, 1987) beschrieben werden. Außerdem postulierten Dambrova *et al.* (1998) die durch Xanthinoxidase katalysierte Reduktion von Guanoxabenz, einem *N*-Hydroxyguanidin, und Clement und Kunze (1992) die Reduktion des Hydroxylamins 6-*N*-Hydroxyaminopurin. Die Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen zu den korrespondierenden funktionellen Gruppen ist in der Regel leicht möglich und zudem teilweise ein wichtiger Detoxifizierungsschritt im Fremdstoffmetabolismus. Die durch Oxidation von primären aromatischen Aminen entstandenen Hydroxylamine besitzen ein hohes toxisches Potential. Durch weitere Phase-II-Konjugations-

reaktionen der Hydroxylamine zu verschiedenen Estern können instabile Konjugate entstehen, die zu Arylnitreniumionen mit hohem DNA-Bindungspotential zerfallen (Clement, 1998).

In bisherigen Publikationen wurde eine Reihe von Enzymsystemen postuliert, denen eine Beteiligung an Reduktionen zugesprochen wird. Allerdings fanden die *in vitro* Biotransformationsstudien meist unter anaeroben Bedingungen statt. Dies lässt eine physiologische Relevanz fraglich erscheinen, da in der Leber durch sauerstoffreichen Blutstrom eher aerobe Bedingungen vorherrschen.

Erste Untersuchungen von Bernheim und Hochstein (1968) postulierten die sauerstoffunabhängige Reduktion von Hydroxylamin durch Rattenlebermitochondrien und beschrieben eine NADH-abhängige Reduktase, die membranengebunden in Mitochondrien lokalisiert ist (Bernheim, 1969). In weiteren Studien konnte die Reduktion von Hydroxylamin unter aeroben Bedingungen durch ein mikrosomales Enzymsystem bestehend aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und einer dritten unbekanntenen Komponente charakterisiert werden, welche die Reaktion abhängig vom NADH im schwach sauren pH-Bereich katalysiert (Kadlubar und Ziegler, 1974). Diese Zusammensetzung der Enzymkomponenten des *N*-reduktiven Systems konnte durch Inhibitorstudien bestätigt werden (Andersson *et al.*, 2005, Kurian *et al.*, 2004, Saulter *et al.*, 2005). Clement *et al.* (1997) postulierten ebenfalls ein aus Schweinelebermikrosomen isoliertes Enzymsystem, das verschiedene *N*-hydroxylierte Verbindungen, aber auch Amidoxime, *N*-Hydroxyguanidine, *N*-Hydroxyamidinohydrazone und *N*-Methylhydroxylamin reduzierte und ebenfalls aus den beiden Komponenten Cyt b_5 , NADH Cyt b_5 R und einer dritten Komponente, vermutlich einem porcinen CYP 450 Enzym der 2D-Familie, bestand (Clement *et al.*, 1997). Versuche im rekonstituierten Enzymsystem mit humanen rekombinanten CYP 450 Proteinen bestätigten die Annahme, dass es sich bei der dritten Komponente um ein CYP 450 handelt, nicht (Andersson *et al.*, 2005, Clement und Lopian, 2003). Andere Studien berichteten, dass

die *N*-Reduktion auch ohne ein drittes Protein, allein durch Cyt *b*₅ und deren Reduktase stattfindet (Kurian *et al.*, 2004, Kurian *et al.*, 2006). Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen bevorzugt, gegenüber Mikrosomen, in Mitochondrien abläuft (Andersson *et al.*, 2005, Clement und Lopian, 2003, Clement *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Erkenntnisse konnte 2006 von Havemeyer *et al.* die dritte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems in der äußeren mitochondrialen Membran isoliert und als molybdänhaltiges Enzym identifiziert werden (siehe Kapitel 1.2.1.3) (Havemeyer *et al.*, 2006).

Eine wichtige pharmakologische Bedeutung in der klinischen Entwicklung von Arzneistoffen haben *N*-hydroxylierte Amidine (Amidoxime) (Peterlin-Masic *et al.*, 2006). Sie werden häufig als Prodrugs mit verbesserter oraler Bioverfügbarkeit eingesetzt. Prodrugs werden unter anderem zur Überwindung von pharmazeutischen, pharmakokinetischen oder pharmakodynamischen Barrieren wie unzureichende chemische Stabilität, schlechte Löslichkeit, inakzeptabler Geschmack oder Geruch sowie bei unzureichender Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit entwickelt (Ettmayer *et al.*, 2004). Durch die schnelle enzymatische Reduktion der Amidoxim-Prodrugs entstehen deren pharmakologisch aktive Amidine, die durch Protonierung zu mesomeriestabilisierenden Kationen leicht mit negativ geladenen Carboxylgruppen der Ziel-Moleküle interagieren können (Clement, 2002). Deren schlechte orale Bioverfügbarkeit resultiert aus ihrer hohen Basizität. Amidine liegen unter physiologischen Bedingungen am doppelgebundenen Stickstoffatom protoniert vor und können somit nicht durch Diffusion vom Gastrointestinaltrakt absorbiert werden. Durch die *N*-Hydroxylierung wird die Basizität dieser Verbindungen drastisch gesenkt (Clement, 2002).

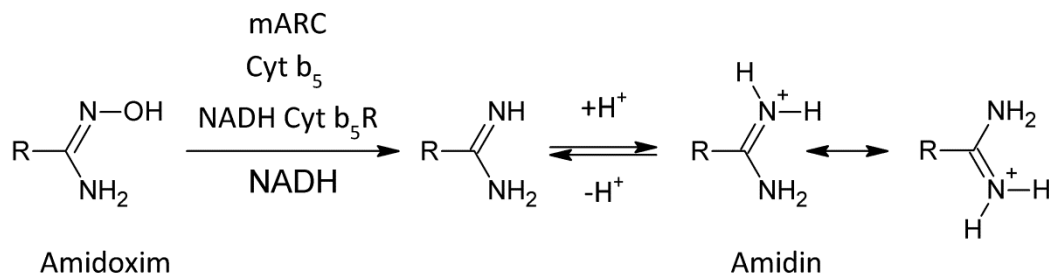


Abb. 1.1.2: Prodrug-Prinzip am Beispiel der N-Reduktion von Amidoximen durch mARC (nach Havemeyer *et al.*, 2011)

Das Amidoxim-Prodrugprinzip wurde erstmals von Clement und Raether (1985) für das Antiprotozoenmittel Pentamidin entwickelt. Das aromatische Diamidin ist ein alter Wirkstoff, der zur Behandlung der Leishmaniose und des Frühstadiums der Westafrikanischen Trypanosomiasis sowie bei Infektionen mit *Pneumocystis jirovecii* angewendet wird (Clement und Jung, 1994). Durch die Hydroxylierung der beiden Amidingruppen konnte eine signifikante Aktivität bei oraler Applikation gezeigt werden (Hall *et al.*, 1998). Aktuell befinden sich zahlreiche Arzneistoffe, auf die das Prodrugprinzip „Amidoxime anstelle von Amidinen“ angewendet werden, in der klinischen Entwicklung, u.a. im Gebiet der antithrombotischen Therapie (Peterlin-Masic *et al.*, 2006). Der erste zugelassene Wirkstoff dieser Klasse war der oral verfügbare direkte Thrombininhibitor Ximelagatran der Firma Astra Zeneca, ein doppeltes Prodrug, dessen Carboxylgruppe verestert und die Amidinfunktion durch Amidoxim ersetzt wurde (Gustafsson und Elg, 2003). Die Bioaktivierung von Ximelagatran zum aktiven Metaboliten Melagatran wird katalysiert durch Esterasen und dem N-reduktiven mARC-haltigen Enzymsystem (siehe Kapitel 1.2) (Havemeyer *et al.*, 2011). Weitere Prodrugs zur antikoagulativen Therapie in der klinischen Entwicklung ist die Substanz AZD0837, dessen Amidinfunktion durch ein O-alkyliertes Amidoxim ausgetauscht wurde (Matsson *et al.*, 2010) sowie Amidoxim-Prodrugs von 3-Amidinophenylsulfonamid-Derivaten, oral bioverfügbare Faktor Xa-Inhibitoren (Uchida *et al.*, 2008). AZD0837 wird als Nachfolgepräparat des

Ximelagatrans, das aufgrund von Berichten über Hepatotoxizität vom Markt zurück gerufen wurde, erforscht (Duner *et al.*, 2012, Keisu und Andersson, 2010). Die Lebertoxizität beruht nicht auf dem Prodrugprinzip sondern auf einer genetischen Variabilität im HLA-System (Kindmark *et al.*, 2008)

Upamostat, das Amidoxim-Prodrug der Wirkform WX-UK1 ist ein Urokinase-Inhibitor in der klinischen Entwicklung zur Behandlung von Pankreas- und Brustkrebs (Meyer *et al.*, 2008). Dessen enzymatische Aktivierung ist Gegenstand der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit in Kapitel 2 beschrieben wurden.

1.2. DAS MARC-HALTIGE ENZYMSYSTEM

1.2.1. Molybdoenzyme

Das Übergangsmetall Molybdän (Mo) ist als Spurenelement für die meisten lebenden Organismen essentiell (Schwarz *et al.*, 2009). Als Bestandteil von Metalloenzymen in Bakterien, Pilzen, Algen, Pflanzen und Tieren bildet Mo einen Teil des aktiven Zentrums der Enzyme (Mendel und Kruse, 2012). Es sind jedoch auch Organismen bekannt, in denen keine molybdänabhängigen Enzyme vorkommen. Eine dieser Ausnahmen stellt dabei die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dar.

Molybdän wird als Molybdat (MoO_4^{2-}) von den Zellen aufgenommen. Für Bakterien wurde die Molybdataufnahme über hochaffine Membranproteine (ABC-Transporter) detailliert beschrieben (Schwarz *et al.*, 2009). In höheren Organismen wie Pflanzen und Algen konnten kürzlich zwei Proteine (Mot 1 und Mot 2), die zu der großen Familie der Sulfat-Transporter zuzuordnen sind, identifiziert werden (Tomatsu *et al.*, 2007). Sie transportieren sehr spezifisch Molybdat durch zelluläre Membranen. In neusten Veröffentlichungen wird auch ein Molybdattransporter diskutiert, der unter anderem in humanen Zellen vorkommt. Deren Lokalisation ist allerdings noch ungeklärt.

Enzyme, die Molybdän zur Katalyse nutzen, sind beteiligt an einer Vielzahl von Redoxreaktionen. Bis auf eine Ausnahme ist es für die biologische Aktivität der Enzyme erforderlich, dass Molybdän kovalent an den Dithiolenrest eines tricyclischen Pyranopterins gebunden wird (Schwarz und Mendel, 2006). Die gebildete prosthetische Gruppe wird Molybdän-Cofaktor (Moco) genannt. Moco ist einer von zwei in der Natur vorkommenden Mo-haltigen Cofaktoren. Ein mit dem Moco strukturell nicht verwandter Eisen-Molybdän-Cofaktor findet sich ausschließlich in dem Enzymkomplex der bakteriellen Nitrogenase. Dieser Cofaktor bindet das Molybdän in Form eines Eisen-Schwefel-Clusters (Schwarz *et al.*, 2009). Das Nitro-

genasesystem katalysiert unter anderem die Reduktion von Stickstoff (N_2) zu Ammoniak sowie die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff (H_2) (Yang *et al.*, 2011). Es gibt eine Vielzahl von bekannten Molybdoenzymen, wobei die meisten in Bakterien vorkommen. In Eukaryoten wurden bisher lediglich die Xanthindehydrogenase, Aldehydoxidase, Sulfitoxidase und vor einigen Jahren auch die molybdänhaltige mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC) identifiziert. Zusätzlich konnten ausschließlich in *Drosophila melanogaster* bzw. *Aspergillus nidulans* die Pyridoxaloxidase und die Nicotinathydrolase beschrieben werden (Mendel und Bittner, 2006). Autotrophe Organismen besitzen ein weiteres Molybdoenzym - die Nitratreduktase. Sie wird zur Nitratassimilation benötigt. Eukaryotische Molybdoenzyme werden aufgrund der unterschiedlichen Koordination des Molybdänatoms mit der Pterinstruktur des Molybdäncofaktors in zwei Familien eingeteilt. Die Sulfitoxidase-Familie, zu der z.B. die Enzyme Sulfitoxidase, Nitratreduktase und wie jüngste Untersuchungen bestätigten auch mARC zuzuordnen sind, komplexiert das Molybdän durch Bindung an den Endithiolatrest des Pyranopterins sowie einen proteineigenen hoch konservierten Cysteinrest und zwei Oxogruppen. Im Gegensatz dazu koordinieren die Enzyme der Xanthinoxidase-Familie, wie z.B. die Xanthindehydrogenase und Aldehydoxidase, das Molybdänatom nicht über eine Aminosäure. Bei diesen Enzymen wird Mo letztlich durch den Dithiolenrest, eine Hydroxy- und Oxogruppe sowie einem Schwefelliganden komplexiert (siehe Abb. 1.2.1). Charakteristisch für diese Enzymfamilie ist die im Anschluss an die Moco-Biosynthese und dem folgenden Einbau des Cofaktors in das aktive Zentrum notwendige biologische Aktivierung durch Hinzufügen eines sogenannten terminalen Schwefelliganden zum Molybdän-Zentrum. Dieser finale Schritt der Enzymaktivierung wird durch Moco-Sulfurase katalysiert (Schwarz *et al.*, 2009).

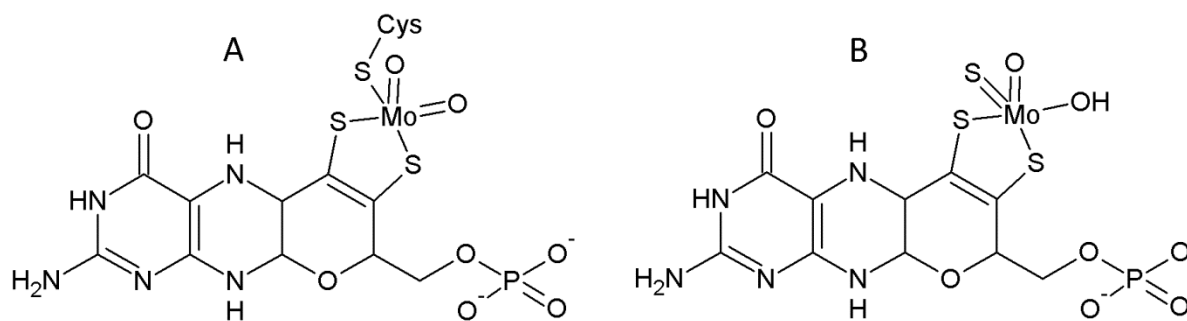


Abb. 1.2.1: Molybdäncofaktor der Sulfitoxidase-Familie (A) und Xanthinoxidase-Familie (B) (nach Schwarz und Mendel, 2006)

Die Biosynthese des Molybdäncofaktors erfolgt in vier Schritten (siehe Abb. 1.2.2) und verläuft in Pflanzen und Tieren aufgrund eines hochkonservierten Biosynthesewegs sehr ähnlich (Mendel und Kruse, 2012). Im ersten Schritt wird ein Guanosintriphosphat (GTP) zum cyclischen Pyranopterinmonophosphat (cPMP), einem schwefelfreien Tetrahydropyranopterin, umgesetzt. Anschließend erfolgt die Synthese des Molybdopterin (MPT) durch Einfügen der Dithiolen-Funktion in das cPMP. Diese Reaktion wird durch das Enzym MPT-Synthase katalysiert (Schwarz *et al.*, 2009). Kupfer fungiert dabei als intermediärer Ligand des MPT-Dithiolatschwefels und schützt die funktionelle Gruppe vor Oxidation. Das gebildete MTP wird im dritten Schritt des Moco-Biosyntheseweges Mg^{2+} - und ATP-abhängig zum MTP-AMP adenyliert. Erst durch den Einbau des Molybdäns in das Molybdopterin erhält der Moco seine physiologische Aktivität. Diese Reaktion verläuft im finalen Schritt durch einen enzymatischen Einbau des Molybdäns in die Dithiolen-gruppe des MPT unter gleichzeitiger Mg^{2+} -abhängiger Hydrolyse des MTP-AMP unter Adenosinmonophosphatabspaltung (Mendel und Kruse, 2012). Das Kupferatom, das vermutlich eine geeignete Abgangsgruppe bildet, wird durch Molybdän ausgetauscht.

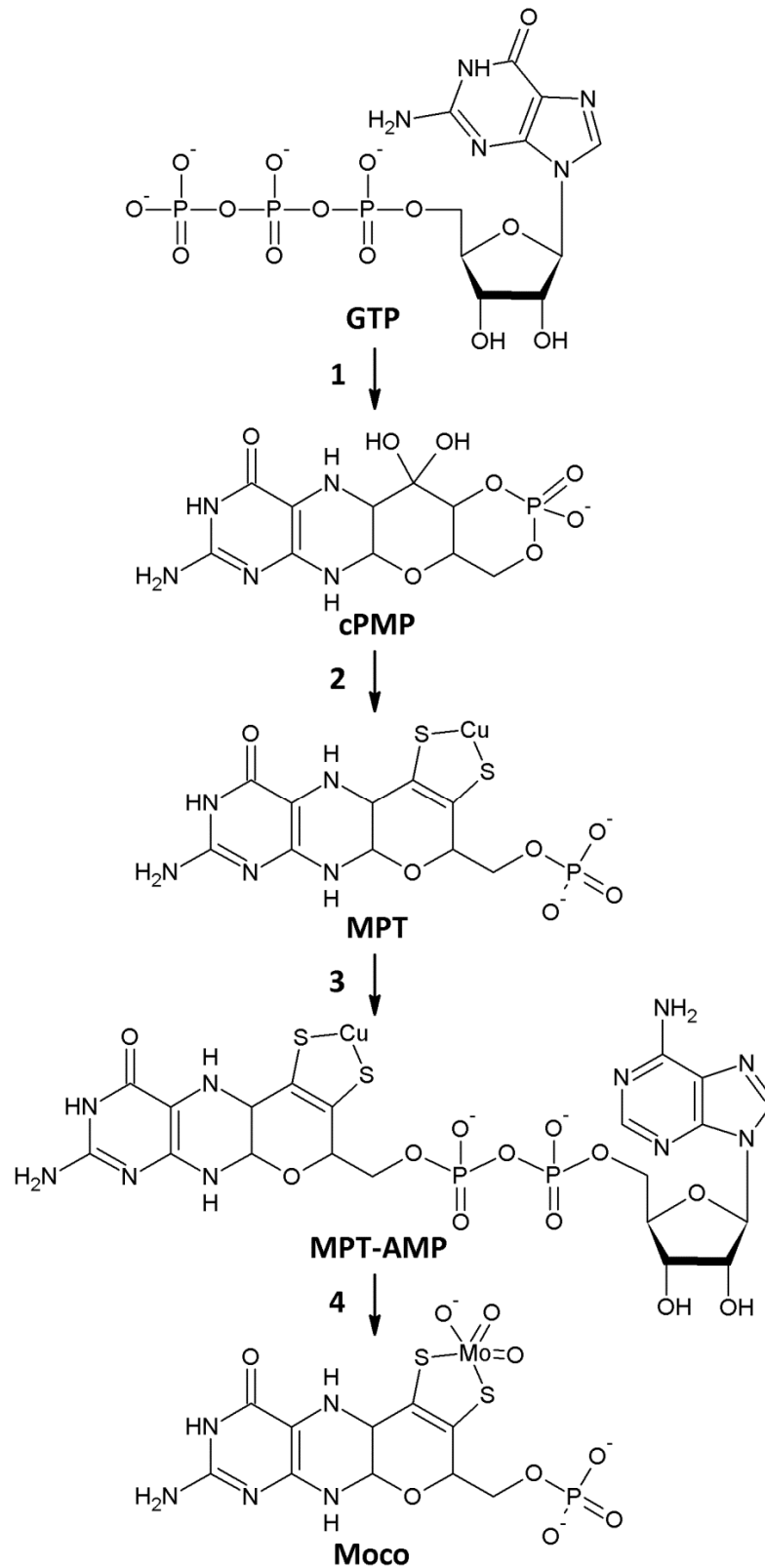


Abb. 1.2.2: Biosyntheseweg des eukaryotischen Molybdän-Cofaktors (nach Mendel und Kruse, 2012)

Die Moco-Synthese findet mit Ausnahme des ersten Schrittes im Cytosol statt. Das cPMP wird durch Proteine der Matrix-Fraktion in Mitochondrien gebildet und anschließend durch spezifische Proteintransporter in das Cytosol exportiert. Der Moco ist sehr instabil und empfindlich gegenüber Oxidation (Mendel und Kruse, 2012), sodass dieser nach erfolgter Biosynthese nicht frei in der Zelle vorliegt, sondern sofort an das Apo-Mo-Enzym oder an Carrier-Proteine gebunden wird (Mendel und Bittner, 2006).

Ein Moco-Mangel äußert sich im Menschen dahingehend, dass es zum vollständigen Verlust der Sulfit-, Xanthin- und Aldehydoxidase-Aktivität kommt (Schwarz *et al.*, 2009). Ebenso konnte *in vitro* der Verlust der mARC-abhängige Reduktaseaktivität gezeigt werden, der durch das Fehlen des Moco resultiert (Wahl *et al.*, 2010). Diese seltene, rezessiv vererbte Krankheit führt ohne Therapie unmittelbar nach der Geburt zum Tod und hat als Ursache verschiedene Mutationen in den für die Moco-Biosynthese verantwortlichen Genen. Die Symptome zeigen sich bereits kurz nach der Geburt, sobald die Biotransformation des Säuglings aktiviert wird und sich toxische Metabolite im Körper anreichern können. Vor allem die inaktive Sulfitoxidase führt dazu, dass besonders im Gehirn das giftige Sulfit nicht mehr abgebaut werden kann und es so zu neurologischen Ausfällen kommt. Die hohen Sulfitkonzentrationen resultieren aus dem Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren und Lipide. Moco-defiziente Patienten, die unter einem Gendefekt leiden, der für die Umwandlung vom GTP zum cPMP verantwortlich ist, können mit gereinigtem cPMP aus *E. coli* therapiert werden, sodass sich die Aktivität der Molybdoenzyme normalisiert (Mendel und Kruse, 2012).

1.2.1.1. Enzyme der Xanthinoxidase-Familie

Xanthindehydrogenase und Aldehydoxidase gehören zu den molybdänhaltigen Enzymen der Xanthinoxidase-Familie (siehe Kapitel 1.2.1).

Die Xanthindehydrogenase ist beteiligt am Abbau von Purinen und katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin sowie von Xanthin zur Harnsäure. Es ist ein homodimeres Flavoenzym, das aus zwei identischen Untereinheiten (ca. 145 kDa) besteht. Jede Untereinheit enthält drei voneinander getrennte Domänen: eine N-terminale 20 kDa Domäne zur Bindung von zwei unterschiedlichen Eisen-Schwefel-Clustern (2Fe-2S), eine 40 kDa Domäne mit FAD-Bindungsstelle sowie eine C-terminale 85 kDa Moco-Bindungsdomäne (Zarepour *et al.*, 2010). Die Xanthinoxidoreduktase liegt in Säugetieren in zwei ineinander umwandelbaren Formen vor, der Xanthindehydrogenase- und Xanthinoxidase-Form, wobei es sich beim primär gebildeten Genprodukt um die Xanthindehydrogenase handelt. Diese kann sowohl reversibel durch Oxidation der Sulfhydrylgruppen der zwei konservierten Cysteine als auch irreversibel durch hydrolytische Spaltung in die Oxidase-Form umgewandelt werden (Zarepour *et al.*, 2010). Der funktionelle Unterschied zwischen beiden Formen liegt in der Präferenz für ihre Elektronenakzeptoren. Die Xanthindehydrogenase besitzt eine hohe Aktivität gegenüber dem Substrat NAD⁺ und nur geringe gegenüber molekularem Sauerstoff. Für die Oxidase-Form verhält es sich entgegengesetzt. Diese überträgt Elektronen exklusiv auf O₂ (Hille und Nishino, 1995, Zarepour *et al.*, 2010). Beide Formen der aus Säugetieren stammenden Enzyme produzieren Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen, wenn Sauerstoff als Elektronenakzeptor dient (Zarepour *et al.*, 2010).

Die Aldehydoxidase ist homolog zur Xanthindehydrogenase ein weiteres in Säugetieren vorkommendes Molybdoflavoprotein. Sowohl die Aldehydoxidase als auch die Xanthindehydrogenase sind ubiquitär im Cytosol von Wirbeltieren verbreitet und zeigen große Übereinstimmungen in ihrer Proteinstruktur und Aminosäure-

sequenz. Im Gegensatz zur Xanthindehydrogenase liegt die Aldehydoxidase nur in der Oxidase-Form vor und nutzt ausschließlich molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Die physiologische Funktion der Aldehydoxidase ist weitestgehend noch unbekannt. Beide Enzyme katalysieren die Oxidation bzw. Reduktion von zahlreichen Substraten, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Substrat- und Inhibitorspezifität voneinander. Verbindungen mit Aldehydfunktion, Nitro- und Nitrosogruppen, aber auch *N*-Heterocyclen sind beschriebene Substrate der Aldehydoxidase (Pryde *et al.*, 2010).

1.2.1.2. Enzyme der Sulfitoxidase-Familie

Die Sulfitoxidase sowie weitere Vertreter dieser Molybdoenzym-Familie unterscheiden sich wesentlich von denen der Xanthinoxidase-Familie (siehe Kapitel 1.2.1). Die tierische Sulfitoxidase ist ein Homodimer und besteht aus zwei Domänen, der *N*-terminalen Häm- (Cyt *b*₅⁻) bindenden und der *C*-terminalen Moco-bindenden Domäne (Mendel und Kruse, 2012). Die wichtigste Funktion ist die Entgiftung des Organismus von schwefelhaltigen Verbindungen, die bei körpereigenen Abbauprozessen anfallen. Dabei erfolgt die Oxidation des Sulfits zum Sulfat über eine Zwei-Elektronentransfer-Reaktion, bei der die Elektronen vom Sulfit das Molybdän im Moco reduzieren. Humane Sulfitoxidase nutzt Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor und ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Mendel und Kruse, 2012).

Die in autotrophen Organismen vorkommende Nitratreduktase katalysiert den ersten Schritt der Nitratassimilation durch Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Die eukaryotische Nitratreduktase ist aus drei Domänen, der *N*-terminalen Moco-bindenden, der Häm-bindenden Cytochrom *b*₅⁻ und der *C*-terminalen FAD-bindenden Domäne, aufgebaut. Es werden die in höheren Algen und Pflanzen vorkommenden NADH-spezifischen und die ausschließlich für Pilze beschriebenen,

NADPH- oder bispezifischen Formen der Nitratreduktase unterschieden (Schwarz und Mendel, 2006).

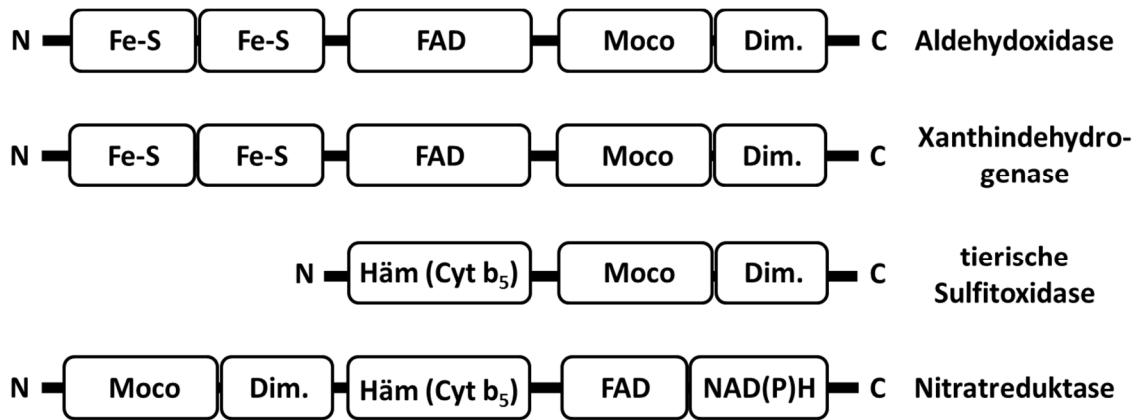


Abb. 1.2.3: Strukturen der eukaryotischen Molybdoenzyme (nach Mendel und Kruse, 2012, Havemeyer, 2006) Dim. = Dimerisierungsdomäne

1.2.1.3. Die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC)

Die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC), ein molybdänhaltiges Enzym, wurde erstmals von Havemeyer (2006) in Säugetieren beschrieben. Zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 (Cyt b_5) und der NADH-abhängigen Cytochrom b_5 Reduktase (Cyt b_5 R) katalysiert das humane mARC sauerstoffinsensitiv die Reduktion einer Vielzahl *N*-hydroxylierter Verbindungen (Grünwald *et al.*, 2008, Havemeyer *et al.*, 2011, Kotthaus *et al.*, 2011, Wahl *et al.*, 2010).

Die Entdeckung des neuen Enzyms basierte auf vorangegangenen Untersuchungen, in denen hohe *N*-reduktive Aktivitäten in gereinigten porcinen Mitochondrienfraktionen beobachtet wurden. Weitere Studien zeigten die höchsten Umsetzungsraten der Amidoximreduktion in der äußeren mitochondrialen Membran. Havemeyer konnte eine verbesserte Methode zur weiteren Aufreinigung der äußeren Mito-

chondrienmembranproteine mittels nicht denaturierender detergentienvermittelter Solubilisierung und anschließender Ionenaustauschchromatographie entwickeln. Die erhaltenen membrangebundenen Proteine der hoch gereinigten äußeren mitochondrialen Proteinfraction reduzierten im rekonstituierten System zusammen mit Cyt b₅ und deren Reduktase das Modellsubstrat Benzamidoxim. Eine durchgeführte SDS-PAGE mit der gereinigten Mitochondrienfraction zeigte zwei Hauptbanden im Gel bei ca. 35 und 66 kDa, die durch massenspektrometrische Analyse (Elektrosprayionisation/Tandem-Massenspektrometrie) identifiziert werden konnten. Die 66 kDa-Bande stammte von der Monoaminoxidase B, deren Beteiligung an der N-Reduktion experimentell ausgeschlossen werden konnte. Der Abgleich der analysierten Peptidfragmente der 35 kDa Fraction mit Datenbanken ergab eine vollständige Übereinstimmung mit dem putativen humanen Protein, der Moco Sulfurase C-terminalen Domäne 2 (MOSC2, NP_060368). Aufgrund der N-reduktiven Aktivität gegenüber Amidoximen und der Lokalisation in Mitochondrien wurde das neu beschriebene Enzym in mARC umbenannt (Havemeyer *et al.*, 2006, Havemeyer *et al.*, 2011).

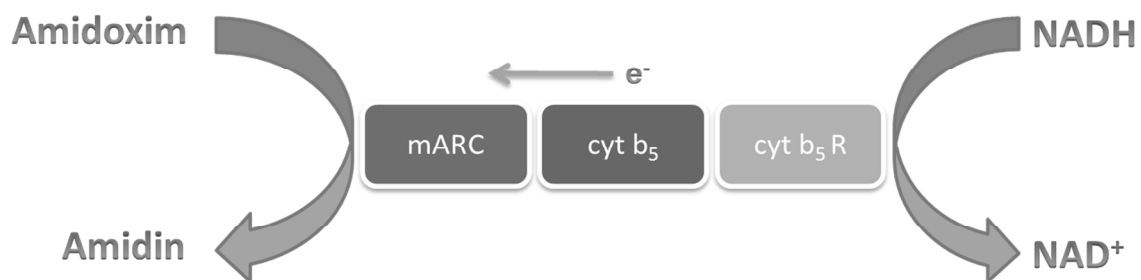


Abb. 1.2.4: Komponenten des N-reduktiven Enzymsystems und Mechanismus des Elektronentransfers im rekonstituierten System

Das humane Genom enthält zwei mARC-Gene, mARC-1 und mARC-2, die in Datenbanken auch als MOSC1 bzw. MOSC2 bezeichnet werden und eine große Ähnlichkeit in ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz aufweisen. Die humanen

Gene sind auf dem Chromosom 1 (Position 1q41) lokalisiert und kodieren mARC-1 mit 337 Aminosäuren und mARC-2 mit 335 Aminosäuren.

Studien zeigten, dass die mARC-Enzyme in den Mitochondrien lokalisiert sind. Dies bestätigten unter anderem die Isolierung von porcinem mARC-2 aus der äußeren mitochondrialen Membran der Leber (Havemeyer *et al.*, 2006), Immunfluoreszenzstudien mit murinen embryonalen Fibroblasten und Proteom-Analysen, die murines mARC an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten (Da Cruz *et al.*, 2003). Durch computerbasierte Analyse (MitoProtII) konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit eine N-terminale mitochondriale Targeting-Sequenz für humane und pflanzliche mARC-Proteine ermittelt werden (Havemeyer *et al.*, 2011, Wahl, 2010).

Des Weiteren wurden für die humanen mARC-Enzyme eine β -Barrel-Domäne und eine MOSC-Domäne in der Nähe des C-Terminus prognostiziert (Anantharaman und Aravind, 2002). Die MOSC-Domäne, die von Anantharaman und Aravind (2002) *in silico* sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Proteinen beschrieben wurde, zeichnet sich durch einen hoch konservierten Cysteinrest aus. MOSC-Proteine beziehen sich dem Namen nach auf die C-terminale Domäne der Moco-Sulfurase (Havemeyer *et al.*, 2011). Die Moco-Sulfurase ist für die posttranslationale Sulfurierung und Aktivierung der Molybdänbindungsstelle von Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase verantwortlich (Bittner *et al.*, 2001, Ichida *et al.*, 2001). Das Enzym ist aus einer N-terminalen Cystein-Desulfurase-Domäne, die L-Cystein unter Abspaltung von Schwefel zu L-Alanin Pyridoxalphosphat-abhängig umsetzt, und der C-terminalen Moco-bindenden Domäne aufgebaut (Bittner, 2012). Havemeyer *et al.* (2006) zeigte in Biotransformationsstudien mit der rekombinanten C-terminalen MOSC-haltigen Domäne der humanen Moco-Sulfurase, dass diese in der Lage war, Benzamidoxim zum korrespondierenden Amidin zu reduzieren. N-reduktive Aktivität konnte kürzlich auch in Zellexperimenten für Enzyme aus *E. coli* beschrieben werden. Zwei Proteine mit MOSC-Domäne (YcbX und YiiM)

wurden als neue prokaryotische Molybdoenzyme charakterisiert, die Moco-abhängig *N*-Hydroxyadenin zu Adenin umsetzen (Kozmin *et al.*, 2008, Kozmin *et al.*, 2010, Krompholz *et al.*, 2012). Obwohl die physiologische Funktion der mARC-Enzyme noch unbekannt ist, kann *in vitro* die Reduktion *N*-hydroxylierter Substrate als ein gemeinsames Merkmal der molybdänhaltigen MOSC-Proteine angesehen werden (Havemeyer *et al.*, 2011).

In zahlreichen aktuellen Untersuchungen werden mögliche physiologische Funktionen des identifizierten mARC-haltigen Enzymsystems kontrovers diskutiert. Studien zeigten, dass mARC die Reduktion von *N*-hydroxylierten DNA-Basenanaloga des Cytosins und Adenins sowie deren Nucleoside katalysiert (Grünewald, 2008, Krompholz *et al.*, 2012). *N*-Hydroxylierte Basen können leicht zum Desoxynucleosidtriphosphat umgewandelt und so in die replizierende DNA eingebaut werden, woraus Mutationen oder DNA-Strangbrüche resultieren (Abdul-Masih und Bessman, 1986, Kozmin *et al.*, 1998, Waisertreiger *et al.*, 2010). *In vitro* konnte die Entstehung dieser mutagenen Intermediate während zellulärer Stoffwechselforgänge durch die Beteiligung von CYP 450 Enzymen, chemisch durch Hydroxylamine und Peroxyradikalen beschrieben werden (Clement und Kunze, 1990, Krompholz *et al.*, 2012). Die mARC-abhängige Reduktion der mutagenen und toxischen *N*-hydroxylierten Basen kann somit als mögliche physiologische Funktion des molybdänhaltigen Enzymsystems angesehen werden, da bisher *in vivo* ein Nachweis dieser Verbindungen nicht erfolgte (Krompholz *et al.*, 2012).

Eine potentielle physiologische Funktion für mARC könnte die Beteiligung an der komplexen Regulation der Stickstoffmonoxid (NO)-Biosynthese sein. Kotthaus *et al.* (2011) zeigten die mARC-abhängige Reduktion des Substrats *N*^ω-Hydroxy-L-arginin zum L-Arginin. NO ist eine bioaktive Substanz, die zahlreiche physiologische Funktionen beeinflusst. Eine erhöhte NO-Verfügbarkeit kann zu Entzündungsreaktionen, neurodegenerativen Erkrankungen oder Migräne führen. Endogenes NO wird

in zwei oxidativen Schritten durch NO-Synthasen aus L-Arginin über das Intermediat N^{ω} -Hydroxy-L-arginin, das zum L-Citrullin reagiert, gebildet. mARC kann somit als ein möglicher Inhibitor der NO-Synthese fungieren (Kotthaus *et al.*, 2011).

Malik *et al.* (2007) konnten in Experimenten mit humanen mesangialen Zelllinien, die unter Hochglucose-Bedingungen kultiviert wurden, hohe mRNA-Expressionslevel für mARC-2 beobachten. Ebenso zeigte sich in der Niere von diabetischen Ratten eine Hochregulation der mARC-2-mRNA Spiegel. Es wird vermutet, dass mARC-2 an der Glucose-Regulation der Niere beteiligt ist und somit ein Zusammenhang von mARC-2 und *Diabetes mellitus* angenommen werden kann.

Die eukaryotischen Molybdoenzyme sind in die Sulfitoxidase- und Xanthinoxidase-Familie eingeteilt (siehe Kapitel 1.2.1). Untersuchungen mit mARC zeigten, dass Hemmstudien mit Cyanid-Zusätzen keinen Effekt auf die Enzymaktivität hatten. Die Zugehörigkeit zur Xanthinoxidase-Familie konnte demzufolge ausgeschlossen werden, da die Enzyme dieser Familie, aufgrund des Cyanid-bedingten Verlustes des katalytisch wichtigen Schwefels, inaktiviert werden (Havemeyer *et al.*, 2011). Elektronenspinresonanzspektroskopie der Molybdänliganden-Umgebung der mARC-Proteine zeigte ähnliche Signale wie die Enzyme der Sulfitoxidase-Familie, insbesondere wie die der Nitratreduktase (Havemeyer *et al.*, 2011). Ein Austausch des hoch konservierten Cysteins durch Alanin im mARC-Enzym der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* führte zum vollständigen Verlust der *N*-reduktiven Aktivität (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2011, Havemeyer *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass der Cystein-Schwefel für die Koordination des Molybdäncofaktors verantwortlich ist. Somit ist es wahrscheinlich, dass mARC den Enzymen der Sulfitoxidase-Familie zuzuordnen ist (Mendel und Kruse, 2012).

1.2.2. Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ (Cyt b₅) ist ein ubiquitär vorkommendes Häm-haltiges Elektronentransportprotein, das an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt ist. Es ist ein integrales Membranprotein mit cytosolisch aktiver Domäne und einem kurzen Membrananker, der posttranslational in die Zielmembranen eingefügt wird (Borgese *et al.*, 1993). Zwei homologe, membrangebundene Cyt b₅ Isoformen, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden, sind beschrieben. Die Typ A Isoform ist endständig am Endoplasmatischen Retikulum verankert. Durch alternatives Spleißen entsteht aus demselben primären RNA-Transkript die lösliche Form, die in Erythrozyten enthalten ist (Vergeres und Waskell, 1995). Die Cyt b₅ Isoform Typ B ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und enthält eine katalytisch aktive N-terminale hydrophile Domäne, die Häm nicht kovalent bindet und ins Cytosol gerichtet ist. Cyt b₅ kann Elektronen von Flavoproteinen wie der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase und der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase aufnehmen und diese anschließend an andere Elektronenakzeptorenzyme weitergeben (Hackett und Strittmatter, 1984).

1.2.3. Cytochrom b₅ Reduktase

Die NADH Cytochrom b₅ Reduktase (Cyt b₅R) ist eine Flavin-haltige Oxidoreduktase, die ähnlich wie Cyt b₅ als membrangebundene und lösliche Form intrazellulär lokalisiert ist (Borgese *et al.*, 1993). Sie überträgt dabei Elektronen vom Zwei-Elektronendonator NADH auf den Ein-Elektronenakzeptor Cyt b₅. Die membrangebundene Form, die sowohl in den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum, den Peroxisomen als auch in den Plasmamembranen identifiziert wurde, besteht ähnlich wie Cyt b₅ aus einer polaren und einer hydrophoben Domäne. Der hydrophile C-terminale Teil bindet FAD als

prothetische Gruppe und ist für die katalytische Funktion des Moleküls verantwortlich. Der hydrophobe N-terminale Teil des Enzyms dient der Membranverankerung. Zusammen mit der membrangebundenen Form des Cyt b₅ ist die Reduktase an einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen, wie der Desaturierung und Elongation von Fettsäuren, an spezifischen CYP 450-vermittelten Hydroxylierungen und der Cholesterol-Biosynthese beteiligt (Bewley *et al.*, 2001). Die löslichen Cyt b₅R ist dagegen am N-Terminus trunkiert, ihr fehlt der Myristyl-Membrananker. Zusammen mit Cyt b₅ katalysiert sie die Reduktion von Methämoglobin zu Hämoglobin in Erythrozyten (Mihara und Sato, 1978). Die Isoformen der Cyt b₅R von Säugern stammen von einem Gen ab und werden durch alternatives Spleißen in die jeweilige Form überführt.

1.2.4. *In vitro* Biotransformationsstudien

Die Charakterisierung der mARC-abhängigen N-Reduktion von Benzamidoxim wurde anhand von *in vitro* Biotransformationsstudien erstmals von Havemeyer (2006) im rekonstituierten Inkubationsansatz zusammen mit der aus der äußeren Mitochondrienmembran gereinigten porcinen mARC-Fraktion und rekombinantem humanen Cyt b₅ und Cyt b₅R beschrieben. Grünewald *et al.* (2008) konnte für das Modellsubstrat Benzamidoxim, die N-hydroxylierten Derivate des Pentamidins und Diminazins sowie für die Substrate N-Hydroxymelagatran, Guanoxabenz und N-Hydroxydebrisiquin die Reduktion durch rekombinant exprimiertes humanes mARC-1 im rekonstituierten System mit gereinigtem porcinen Cyt b₅ und Cyt b₅R zeigen. Aufgrund der beobachteten geringen Umsetzungsraten der eingesetzten Substrate war es erforderlich das *in vitro* Testsystem zu optimieren, um maximale Enzymaktivitäten zu erzielen. Dazu wurden die von Wahl (2010) mit voller Aminosäuresequenz exprimierten mARC-Proteine N-terminal trunkiert, um die Ausbeute

und Reinheit der erhaltenen Enzyme zu erhöhen. Aufgrund der vermuteten Lokalisation des Enzymsystems in den Mitochondrien handelt es sich bei dem entfernten Abschnitt wahrscheinlich um ein *N*-terminales mitochondriales Targeting-Signal, das nach dem Transport in oder an die mitochondriale Membran abgeschnitten wird bzw. das Protein mit der Membran verankert (Wahl, 2010). Durch diese hydrophobe Sequenz der in *E. coli* Stämmen exprimierten mARC-Proteine konnte die dreidimensionale Faltung der Enzyme und damit die Aktivität wahrscheinlich nicht korrekt ausgeführt werden (Wahl, 2010). Die löslichen *N*-terminal verkürzten und His₆-markierten humanen mARC-1 und mARC-2 Enzyme bildeten zusammen mit den ebenfalls um die Membrananker-Sequenz verkürzten mitochondrialen Isoformen des Cyt b₅ (Typ B) und deren Reduktase das aktive humane reduktive Enzymsystem (Grünwald, 2008, Wahl, 2010). Durch *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem erstmals vollständig aus einer Spezies bestehenden Enzymsystem konnte Grünwald (2008) die Reduktion von weiteren *N*-hydroxylierten Verbindungen wie *N*-Hydroxyguanidinen, Sulfhydroxamsäuren und aromatischen Hydroxylaminen, wie z.B. *N*-Hydroxy-Dapson und *N*-Hydroxy-Sulfamethoxazol sowie der hydroxylierten DNA-Base *N*-Hydroxy-Cytosin nachweisen. Allerdings zeigte sich auch, dass trotz akzeptabler Cofaktorsaturierung der rekombinanten Enzyme, die Umsetzungsraten gegenüber dem gereinigten, nativen Enzymsystem deutlich verringert waren. Weitere Studien zur Optimierung des rekonstituierten rekombinanten *in vitro* Enzymsystems von Plitzko (2010) konnten eine von der Ionenstärke des verwendeten Puffers abhängige Hemmung der Enzymaktivität zeigen. Durch Anpassung der Inkubationsbedingungen konnte ein optimiertes System für *N*-reduktive *in vitro* Metabolismusstudien etabliert werden, das aufgrund der löslichen Formen der eingesetzten rekombinanten Proteine ohne Zusätze wie Lipide auskommt. Inkubationen in 20 mM MES-Puffer bei pH 6,0 lieferten hohe spezifische Aktivitäten bei der Umsetzung *N*-hydroxylierter Substrate (Kotthaus *et al.*, 2011, Wahl *et al.*, 2010).

Das optimale stöchiometrische Verhältnis der eingesetzten Proteine konnte bereits von Kurian *et al.* (2004) in einem Verhältnis von 10:1 für das mikrosomale Enzymsystem aus Cyt b₅ und Cyt b₅R ohne mARC bestimmt werden. Plitzko konnte dieses *in vitro* Verhältnis für die Elektronendonatoren bestätigen und postulierte im Dreikomponentensystem mit mARC eine optimierte Zusammensetzung von 10:10:1 (mARC, Cyt b₅, Cyt b₅R).

1.3. THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Havemeyer *et al.* (2006) beschrieben erstmals das bisher unbekannte Molybdoenzym mARC, das aus der äußeren mitochondrialen Membran von Schweinelebern isoliert werden konnte und zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cyt b₅ und deren NADH-abhängiger Reduktase die *N*-Reduktion von Amidoximen katalysiert. Die *N*-reduktive Aktivität des identifizierten Enzymsystems wurde anhand des Modellsubstrats Benzamidoxim vollständig charakterisiert. Durch erfolgreiche Rekonstitution der Proteine im Inkubationsansatz und Optimierung der Inkubationsbedingungen konnte in vorangegangenen Untersuchungen die mARC-abhängige Reduktion weiterer *N*-hydroxylierter Verbindungen wie *N*-Hydroxyguanidine, Sulfhydroxamsäuren, aromatischen Hydroxylaminen sowie hydroxylierten DNA-Basen-Analoga gezeigt werden (Grünewald *et al.*, 2008, Havemeyer *et al.*, 2010, Kotthaus *et al.*, 2011, Krompholz *et al.*, 2012).

Die Testungen neuer Substrate zur Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität des molybdänhaltigen humanen Dreikomponentensystems bestehend aus Cyt b₅, der NADH Cyt b₅R und mARC standen im Vordergrund dieser Arbeit. Eine Vielzahl von Arzneistoffen mit *N*-oxygenierten funktionellen Gruppen befindet sich im Handel oder in der klinischen Entwicklung. Von großer Bedeutung ist dabei der Metabolismus dieser Verbindungen, der einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit haben kann. Im Falle der Amidoxim-Prodrugs (siehe Kapitel 1.1.2) ist eine schnelle Aktivierung zur Wirkform erwünscht, wohingegen bei Arzneistoffen mit *N*-hydroxylierten funktionellen Gruppen eher mit einer schnellen Inaktivierung und damit mit einem Wirkverlust gerechnet werden muss.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst für das neu entwickelte Amidoxim-Prodrug Upamostat die enzymatische Aktivierung zur Amidin-Wirkform WX-UK1 untersucht werden. Inwieweit die *N*-Reduktion des Serinprotease-Inhibitors verglichen

mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim durch mARC katalysiert wird, sollte dabei bestimmt werden.

Des Weiteren sollten Derivate verschiedener Stoffklassen *N*-oxygenierter Verbindungen wie Oxime, *N*-Oxide, Hydroxamsäuren und *O*-alkylierte Amidoxime als mögliche Substrate des *N*-reduktiven mARC-haltigen Enzymsystems getestet werden. Dazu wurden *in vitro* Biotransformationsstudien unter optimierten Bedingungen sowohl mit dem rekonstituierten rekombinanten humanen Dreikomponentenenzymssystem als auch mit isolierten porcinen hepatischen und extrahepatischen subzellulären Fraktionen durchgeführt und die *N*-reduktive Aktivität anhand von enzymkinetischen Parametern bestimmt. Außerdem sollten die ermittelten Umsetzungsraten der potentiellen Substrate mit denen des Modellsubstrats Benzamidoxim verglichen werden, um die Substratspezifität der funktionellen Gruppen für die homologen Enzyme mARC-1 und mARC-2 zu charakterisieren.

Außerdem wurde anhand von Zellkulturstudien humaner Krebszelllinien die mARC-abhängige Umsetzung von Amidoximen analysiert, um so Rückschlüsse auf die mARC-Expression und damit verbunden die *N*-reduktive Aktivität sowohl in hepatischen als auch extrahepatischen Geweben im Hinblick auf die Bioaktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs ziehen zu können.

2. N-REDUKTIVE AKTIVIERUNG DES PRODRUGS UPAMOSTAT DURCH MARC

2.1. EINLEITUNG

Die sich in klinischen Studien befindliche Substanz Upamostat (Mesupron®) ist ein Prodrug des aktiven Metaboliten WX-UK1 und fungiert als Inhibitor des Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) Systems. Zurzeit befindet sich Upamostat in Phase II der klinischen Studien und wird in der Kombinationstherapie mit den Antimetaboliten Gemcitabin bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem, inoperablem, nicht metastasiertem Bauchspeicheldrüsenkrebs und zusammen mit Capecitabin bei Patienten mit metastasiertem, HER2-Rezeptor-negativem Brustkrebs erforscht (Heinemann *et al.*, 2010). Das uPA-System spielt eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumoren (Pillay *et al.*, 2007). Es besteht aus dem membrangebundenen uPA-Rezeptor, der auf der Oberfläche von Tumorzellen überexprimiert wird, der Serinprotease des Urokinase Typs dem Plasminogen Aktivator sowie seinen physiologischen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2. Der uPA-Gehalt in dem Tumor erlaubt eine Prognose über die statistische Überlebenswahrscheinlichkeit der Krebspatienten. Je höher der Wert ist, desto schlechter die Prognose. Ursache dafür sind proteolytische Prozesse, die durch die Aktivierung des uPA-Systems in Gang gesetzt werden. Das aktive uPA-Enzymsystem wandelt das Zymogen Plasminogen in die aktive Serinprotease Plasmin um. Plasmin ist am Abbau der Extrazellulärmembran und der Basalmembranen entweder durch direkte proteolytische Verdauung oder durch Aktivierung anderer Zymogen-Proteasen, wie Pro-Metalloproteasen und Prokollagenasen, beteiligt, wodurch die Tumorzell-Migration begünstigt wird (Pillay *et al.*, 2007). Durch den Abbau der extrazellulären Matrix, des den Tumor umgebenden Gewebes, können Tumorzellen in die Blutgefäße und in gesundes Gewebe eindringen und so zur Entstehung von Sekundärtumoren führen.

WX-UK1, die aktive Wirkform von Upamostat, inhibiert Plasmin sowohl direkt als auch indirekt durch Hemmung der uPA-vermittelten Plasminogen-Aktivierung und reduziert signifikant das Wachstum von Primärtumoren und die Metastasenbildung (Ertongur *et al.*, 2004, Setyono-Han *et al.*, 2005).

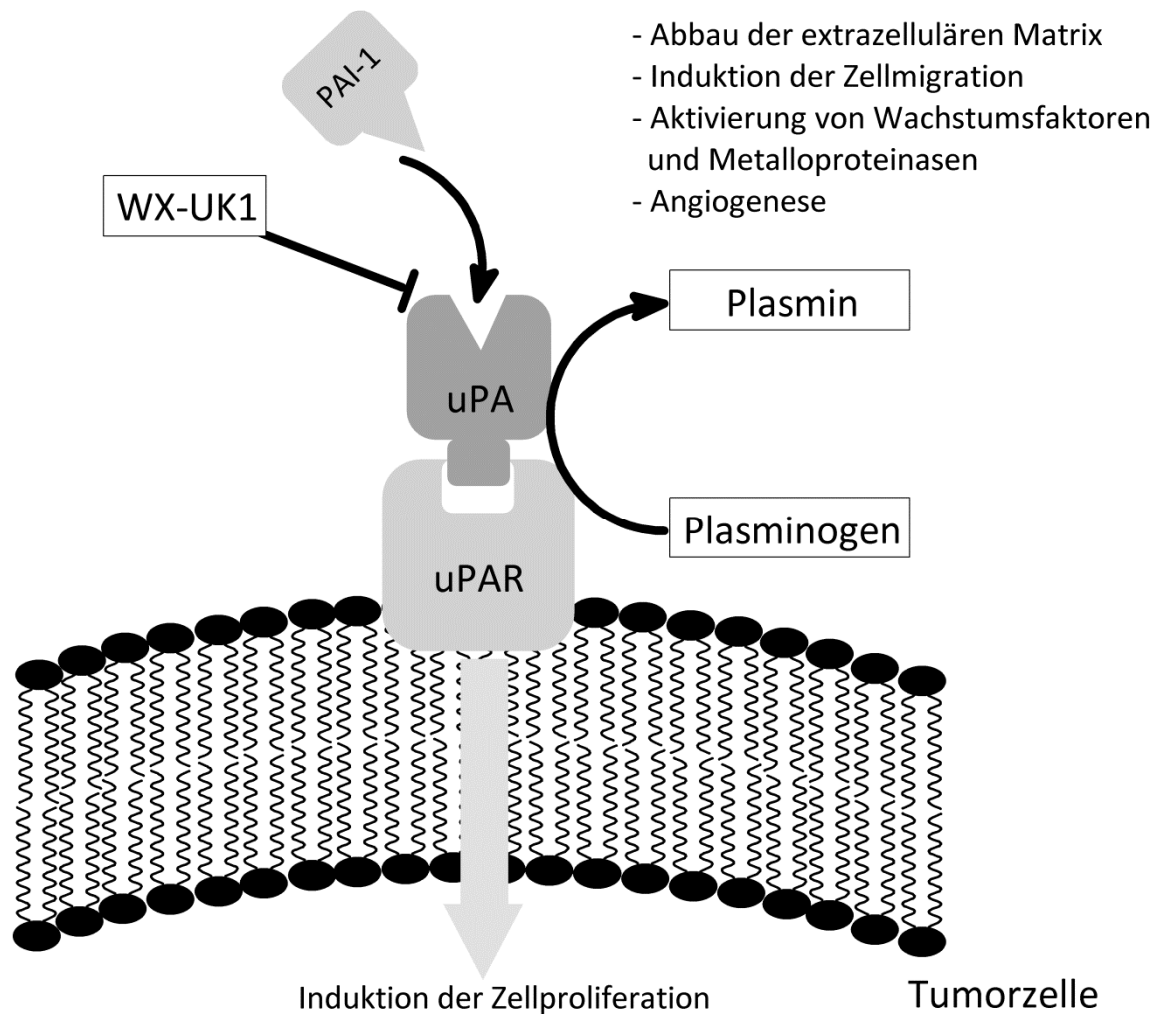


Abb. 2.1.1: Aufbau und Wirkmechanismus des uPA-Systems (modifiziert nach Willex AG, Internetpräsenz Portfolio Mesupron®)

uPA = Plasminogen Aktivator des Urokinase-Typs; PAI-1 = physiologischer Inhibitor, uPAR = Rezeptor des Urokinase Plasminogen Aktivators

WX-UK1 liegt im physiologischen Milieu durch die basische Amidinfunktion protoniert vor, woraus eine unzureichende Absorption im Magen-Darm-Trakt

resultiert. Geladene Verbindungen werden nur schlecht durch Diffusion aufgenommen. Im Tierversuch zeigte WX-UK1 keine orale Verfügbarkeit (persönliche Korrespondenz, Willex AG). Durch Hydroxylierung zur weniger basischen Amidoximfunktion konnte eine gute orale Bioverfügbarkeit des Prodrugs von durchschnittlich 72 % gezeigt werden (Meyer *et al.*, 2008, persönliche Korrespondenz, Willex AG). Nach oraler Gabe von Upamostat und guter Anflutung im Plasma konnten hohe Konzentrationen des Metaboliten WX-UK1 im Gewebe der Patienten detektiert werden, was für einen effizienten Metabolismus des Prodrugs spricht (Meyer *et al.*, 2008). Welches Enzymsystem an der Reduktion zum WX-UK1 und somit an der Aktivierung vorrangig beteiligt ist, blieb bisher weitestgehend unbekannt und soll durch die vorliegende Arbeit näher charakterisiert werden. Dies geschieht mit dem Hintergrund der Entdeckung der mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente (mARC) als aktivierende Komponente für andere Amidoxim-haltige Prodrugs (Havemeyer *et al.*, 2006, Havemeyer *et al.*, 2011).

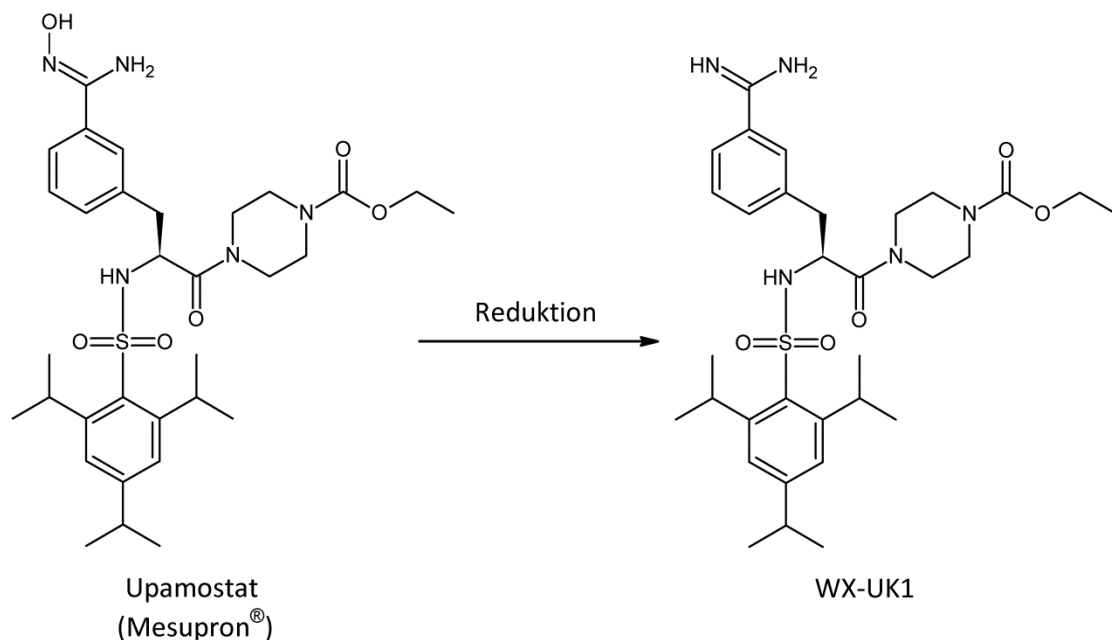


Abb. 2.1.2 Aktivierung des Prodrugs Upamostat zur Wirkform WX-UK1

2.2. ZIELSETZUNG

Durch *in vitro* Biotransformationsstudien sollte die enzymatische Aktivierung des Prodrugs Upamostat (Mesupron®) mit verschiedenen subzellulären Enzymfraktionen näher untersucht werden. Dabei sollte vor allem die postulierte Katalyse durch mARC verifiziert werden. Als Enzymquellen dienten sowohl porcine hepatische als auch extrahepatische subzelluläre Fraktionen, wie z.B. Mitochondrien, Cytosol und Mikrosomen, die in unserem Arbeitskreis vollständig hinsichtlich der N-reduktiven Aktivität am Modellsubstrat Benzamidoxim beschrieben worden sind. Es sollten Reduktionsstudien im rekonstituierten humanen Dreikomponentenenzymssystem mit mARC, Cyt b₅ und dessen NADH-abhängiger Reduktase durchgeführt werden. Bei den dafür verwendeten Proteinen handelte es sich um rekombinant hergestellte humane Enzyme. Dieses System hat sich in vorangegangenen Studien als sehr effektiv in der Reduktion von Amidoximen herausgestellt (Grüne-wald *et al.*, 2008; Kotthaus *et al.*, 2011) und hat eine hohe Relevanz für die *in vivo*-Situation.

Mit Hilfe von enzymkinetischen Berechnungen sollte das Ausmaß der enzymatischen Reduktion von Upamostat zum aktiven Metaboliten WX-UK1 näher charakterisiert werden. Dafür konnten die optimalen Inkubationsbedingungen durch Bestimmung der Substrat-, pH- und Zeitabhängigkeit ermittelt und der Einfluss des Cosubstrats NADH auf die N-Reduktion untersucht werden. Zur Quantifizierung des gebildeten Metaboliten mittels HPLC musste eine neue Methode entwickelt und validiert werden.

2.3. METHODEN

2.3.1. Materialien und Geräte

N- α -(2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl)-3-hydroxyamidino-(L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonylpiperazid (Upamostat) und der pharmakologisch aktive Metabolit *N*- α -(2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl)-3-amidino-(L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonylpiperazid (WX-UK1) wurden für die Testungen von der Firma Wilex AG (München) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen und sind in Kapitel 9 zusammen mit den verwendeten Materialien aufgelistet.

2.3.2. Gewinnung und Charakterisierung der Proteinquellen

2.3.2.1. Rekombinante Enzyme des mARC-haltigen Enzymsystems

Die humanen Enzyme mARC-1 (NP_073583), mARC-2 (NP_060368), mitochondriales Cyt b_5 (NP_085056) und die NADH-abhängige Cyt b_5R Isoform 2 (NP_000389) wurden rekombinant am Institut für Pflanzenbiologie der Technischen Universität Braunschweig im Arbeitskreis von Professor Mendel aus den *E. coli* Stämmen TP 1000 (hmARC) und DL 41 (hCyt b_5 , hCyt b_5R) hergestellt und für die Biotransformationsstudien zur Verfügung gestellt (Wahl *et al.*, 2010).

2.3.2.2. Molybdänbestimmung der mARC-Enzyme durch ICP-MS

Die Messung des Molybdängehalts von mARC-1 und mARC-2 wurde am Geologischen Institut der CAU Kiel im Arbeitskreis von Dr. Garbe-Schönberg mit einem ICP-Quadrupol-Massenspektrometer mit Octopole Reaktion System (Agilent 7500cs mit Kollisionszelle und VG Instruments PlasmaQuad 1 - Agilent Technologies, Inc.,

USA) durchgeführt. Dafür wurden die Proben zuvor auf einen Proteingehalt von ca. 0,5 mg/ml mit Lagerpuffer pH 7,4 (25 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 % Glycerol (v/v)) eingestellt und 10 min im siedenden Wasserbad denaturiert. Zu 200 μl der Proteinverdünnung wurden jeweils 10 μl Indium (2,5 ppb) als interner Standard pipettiert und mit 2 %iger (m/v) oberflächendestillierter Salpetersäure auf 2,0 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben durch Zentrifugalfilter (Amicon Ultra 0.5 Ultracel-PL Membrane, Millipore, Darmstadt) mit einer Porengröße von 30 kDa durch Zentrifugation mit je 500 μl Volumen bei 14 000 g 5 min filtriert. Das Zentrifugat wurde mittels ICP-MS analysiert (Kotthaus *et al.*, 2010). Die Kalibrierung der Methode erfolgte mit 5 und 50 ppb haltiger Molybdänlösung gegen Systemblank. Als Kontrolle wurden Gesteinsstandardreferenzmaterialien (BIR-1 und BHVO-2) mit bekanntem Molybdängehalt vermessen.

2.3.2.3. Häm-Gehaltsbestimmung von Cytochrom b_5

Der Hämgehalt des rekombinanten Cyt b_5 wurde nach der Methode von Estabrook und Werringloer (1978) durch Messung eines Differenzspektrums bestimmt. Das Spektrum der durch NADH-Zusatz reduzierten Cyt b_5 Form wurde dabei von der oxidierten Form subtrahiert. Die Vermessung der Proben erfolgte in Mikroküvetten durch Dreifachbestimmung.

2.3.2.4. FAD-Gehaltsbestimmung der Cytochrom b_5 Reduktase

Die Bestimmung des FAD-Gehalts erfolgte nach der Methode von Whitby (1953). Die Proben wurden zunächst mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 auf einen Proteingehalt von ca. 0,5 mg/ml verdünnt und 10 min im Wasserbad hitzedenaturiert. Nach Zentrifugation, 10 min bei 22 000 g, wurden je 200 μl des Überstandes in 96-Well Plates spektroskopisch bei 450 nm durch Doppelbestimmung vermessen.

Eine 5-Punkt-Kalibrierung wurde mit FAD im Konzentrationsbereich von 0,01 - 0,1 mM parallel mitbestimmt.

2.3.2.5. Gewinnung der porcinen subzellulären Fraktionen

Die für *in vitro* Biotransformationsstudien eingesetzten porcinen Proteinquellen wurden in unserem Arbeitskreis modifiziert nach Hovius *et al.* (1990) und Clement *et al.* (2005) mittels differentieller und Dichtegradienten-Zentrifugation aus porcinen Organen isoliert und mittels Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 2.3.2.8) charakterisiert.

Die Isolierung von Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol erfolgte in drei Schritten. Die porcinen Organe stammten von männlichen und weiblichen Schlachttieren. Das Töten der Tiere erfolgte in einem lokalen Schlachthof. Die Organe wurden sofort nach der Schlachtung entnommen und auf Eis in Puffer transportiert. Zum Transport und für die folgenden Reinigungsschritte wurde ein Standardpuffer mit folgender Zusammensetzung benutzt:

0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , 1 mM DTT und 0,1 % (m/v) BSA (pH 7,4).

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach dem Zerteilen der Organe wurden diese mit Puffer perfundiert um anhaftendes Blut zu entfernen. Die weitere Zerkleinerung der Organproben erfolgte mit einem handelsüblichen Fleischwolf. Die erhaltene Suspension wurde mit Standardpuffer auf das doppelte Volumen aufgefüllt, mit Hilfe eines Durchflusshomogenisators homogenisiert und auf pH 7,4 eingestellt. Im nachfolgenden Schritt der differentiellen Zentrifugation wurde das Homogenat ca. fünfmal bei 600 g für jeweils 15 min zentrifugiert um Zelltrümmer, Zellkerne und Erythrozyten abzutrennen. Der Überstand wurde durch Mull kolliert

und das Pellet verworfen. Ein Teil des erhaltenen Überstandes, der postnukleare Überstand (PNS), wurde aliquotiert und für die *in vitro* Testungen verwendet. Der andere Teil des Überstandes wurde 20 min bei 10 300 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet bildet die rohe Mitochondrienfraktion, der Überstand wurde zur Gewinnung von Mikrosomen und Cytosol weiterverarbeitet. Dieser wurde dafür 70 min bei 200 000 g ultrazentrifugiert.

Das 200 000 g Pellet wurde in Standardpuffer ohne BSA resuspendiert, gepottert und erneut 70 min zentrifugiert. Das Pellet, die isolierten Mikrosomen, wurden in wenig Puffer ohne BSA resuspendiert und gepottert, der Überstand wurde verworfen. Die Mikrosomensuspension wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Der Überstand wurde ebenfalls ein zweites Mal bei 200 000 g ultrazentrifugiert und anschließend aliquotiert.

Die Isolierung der Mitochondrienfraktion erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Das 10 300 g Pellet der rohen Mitochondrienfraktion wurde in Standardpuffer ohne BSA resuspendiert. Mit dieser Suspension wurde anschließend ein Dichtegradient aufgebaut. Dazu wurden jeweils ca. 60 ml Gradientenpuffer pH 7,4 (30 % (v/v) Percoll®, 225 mM Mannitol, 1 mM EGTA, 25 mM HEPES) und 10 ml Mitochondriensuspension im Zentrifugenglas übereinander geschichtet und 40 min bei 95 000 g zentrifugiert. Die gebildeten ringförmigen Mitochondrienfraktionen wurden vorsichtig abpipettiert, gesammelt und mit Puffer ohne BSA verdünnt. In den zwei folgenden Waschschrritten wurde die verdünnte Mitochondriensuspension jeweils für 20 min bei 6 300 g zentrifugiert. Das Pellet, die angereicherte Mitochondrienfraktion, wurde in wenig Puffer ohne BSA resuspendiert und auf pH 7.4 eingestellt, anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.2.6. Isolierung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion

Die Gewinnung der äußeren Membran-Vesikel (OMV) aus porcinen Mitochondrien von Leber und Niere wurde mittels der Swell-Disruption Methode modifiziert nach Kroon *et al.* (1997) und in Anlehnung an Havemeyer (2006) durchgeführt. Die isolierte Mitochondriensuspension wurde zunächst 20 min bei 9 400 g zentrifugiert und das erhaltene Pellet in hypotonem Puffer pH 7,2 (2,5 mM Dikaliumhydrogenphosphat, 2,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat und 3 mM EDTA) resuspendiert und 20 min auf Eis gerührt. Anschließend wurden die gequollenen Mitochondrien mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (Potter 940 S Glaszylinder) homogenisiert. In einem nachfolgenden Sedimentationsschritt wurde das Swell-Disruption-Homogenat der Mitochondrienorganellen auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geladen und mit 141 000 g für 70 min zentrifugiert. Dieser war wie folgt zusammengesetzt: in einem 70 ml Zentrifugenglas von unten nach oben: 15 ml 1,1 M Saccharoselösung in EM-Puffer (10 mM MOPS, 2,5 mM EDTA pH 7,2), 25 ml 0,25 M Saccharoselösung in EM-Puffer und ca. 30 ml Homogenat. Die sich an der Grenzschicht der beiden Saccharoselösungen angereicherte OMV-Fraktion wurde entnommen, mit 1,1 M Saccharoselösung suspendiert und in einem weiteren Flotationsschritt über Nacht ca. 9-16 Stunden mit 141 000 g zentrifugiert. Dazu wurde ein zweiter Saccharosegradient, bestehend aus 30-40 ml der OMV-Fraktion, 10 ml 1,065 M Saccharoselösung in EM-Puffer und ca. 25 ml EM-Puffer, aufgebaut. An der Grenzschicht zwischen EM-Puffer und der Saccharoselösung angereicherte isolierte OMV-Suspension wurde entnommen und in einem Sedimentationsschritt bei 235 000 g 70 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Lagerpuffer (220 mM Mannitol, 70 mM Saccharose, 2 mM HEPES pH 7,4) resuspendiert, anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

2.3.2.7. Proteingehaltsbestimmung

Die Proteingehaltsbestimmungen der eingesetzten Enzymquellen wurden nach der Bicinchoninsäure-Methode (BCA) mit einem Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) nach Herstellerangaben ohne Proteinfällung durchgeführt. Die Messungen erfolgten in 96-Well-Plates bei 562 nm mit paralleler Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 50-700 µg/ml mit BSA als Standard. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80°C.

2.3.2.8. SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse

Zur Charakterisierung der Reinheit der gewonnenen porcinen subzellulären Fraktionen wurde eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Immunblot-Analyse durchgeführt.

Die SDS-PAGE wurde nach der von Laemmli (1970) beschriebenen diskontinuierlichen Methode mit dem SDS-PAGE Mini Protean® Tetra Cell System durchgeführt. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden folgende Puffer und Gele verwendet:

SDS-Gel Ladepuffer (4×)	
Tris-Base	0,2 M
Glycerin (86 %)	40 % (m/v)
β-Mercaptoethanol	20 % (v/v)
SDS	8 % (m/v)
Bromphenolblau	0,02 % (m/v)

Elektrodenpuffer (pH 8,2)

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	8 % (m/v)

	Trenngelpuffer (4×) pH 8,8	Sammelgelpuffer (4×) pH 6,8
Tris-Base	1,5 M	1,5 M
SDS	0,4 % (m/v)	0,4 % (m/v)

	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (4,5%)
<i>Aqua bidest.</i>	3,0 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer (4×)	4,0 ml	---
Sammelgelpuffer (4×)	---	1,0 ml
Acrylamidlösung 30 % (37,5:1)	5,0 ml	0,6 ml
TEMED	10 µl	6 µl
APS (10 %)	80 µl	25 µl

2. N-REDUKTIVE AKTIVIERUNG DES PRODRUGS UPAMOSTAT DURCH MARC

Zur Durchführung der Western-Blot-Analyse wurden folgende Puffer verwendet:

Transferpuffer (pH 8,2)		TBST-Puffer	
Tris-HCl	25 mM	Tris-Base	1,5 M
Glycin	190 mM	SDS	0,4 % (m/v)
Methanol	10 % (v/v)	Tween 20	0,1 % (v/v)

Die hergestellten Gele mit einer Stärke von 1,0 mm wurden nach Herstellerangaben in das Elektrophoresesystem eingespannt und die Kammer mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden entsprechend ihres Proteingehalts verdünnt und mit SDS-Gel-Ladepuffer (4×) versetzt. Anschließend wurden die Proben 10 min im Wasserbad hitzedenaturiert und 5 min bei 22 000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden auf das Sammelgel geladen. Je Tasche wurden 12 µg porcines Protein der isolierten subzellulären Fraktionen aufgetragen. Rekombinantes humanes mARC-1 und -2 wurden als Kontrolle in einer Konzentration von 0,05 µg je Bahn hinzugefügt. Als Molekulargewichtsmarker wurden 5 µl des PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder verwendet. Nach dem Probenauftrag wurde eine Spannung von 80 V angelegt, die nach dem Übergang der Proteine ins Trenngel auf 160 V erhöht wurde. Die Dauer der Gelelektrophorese betrug ca. eine Stunde.

Western-Blots wurden im Tank-Blot-Verfahren auf PVDF-Transfermembranen geblottet. Dazu wurden SDS-Gel und PVDF-Membran übereinandergelegt, mit je zwei in Transferpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier umgeben und anschließend in eine entsprechende Kassette nach Herstellerangaben eingespannt. Der Tank wurde mit Transferpuffer gefüllt und eine Spannung von 90 V für 120 min angelegt. Zur Verhinderung einer starken Aufheizung während des Blottens wurde ein auf -20°C gekühltes Coolpack hinzugegeben. Nach dem Blotten wurden die protein-

freien Bereiche der Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln in Milchpulverlösung bestehend aus TBST-Puffer mit 5 % (m/v) Milchpulver geblockt.

Zur Detektion spezifischer Enzyme, die den Reinigungserfolg der subzellulären Fraktionen charakterisieren, wurden folgende, gegen humane Proteine gerichtete, Primärantikörper verdünnt in 5 % (m/v) Milchpulverlösung verwendet:

Ein Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12, 36 kDa), ein cytosolisches Enzym der Glykolyse, wurde als Cytosol-Marker in der Verdünnung 1:10 000 eingesetzt.

Anti-VDAC2, ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen das auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisierte, spannungsabhängige, Anion-selektive Kanal Protein 2 wurde als Marker für die mitochondriale Fraktion in einer Verdünnung 1:1 000 verwendet. Der Antikörper ist gegen den C-Terminus des humanen VDAC-2 gerichtet und wird im Western-Blot bei ca. 37 kDa und das Dimer bei ca. 63 kDa detektiert.

Anti-Calnexin, ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, wurde als Marker der mikrosomalen Fraktion in der Verdünnung 1:10 000 eingesetzt. Der Antikörper ist gegen das Calnexin, ein etwa 90 kDa großes Integralprotein des endoplasmatischen Retikulums, gerichtet.

Die Expression der isolierten porcinen Fraktionen und der humanen Zellysate mit dem Enzym mARC wurde mit folgenden Primärantikörpern verdünnt in Milchpulverlösung bei ca. 35 kDa detektiert:

anti-mARC-1 (anti-MOSC2) (Abgent Europe, Oxfordshire, UK), polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Verdünnung 1:1 000.

mARC-2 (anti-MOSC2) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Verdünnung 1:10 000.

mARC-2 (anti-MOSC2 L-13) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Verdünnung 1:1 000.

Jeweils 5 ml der entsprechenden Primärantikörperlösungen wurden pro Membran über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit je 10 ml TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20-Zusatz unmittelbar und dreimal für je 15 min gespült. Anschließend wurden die Membranen mit Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern (Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen bzw. Antikörper aus dem Esel gegen Ziege) in den Verdünnungen 1:10 000 eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach erneutem Spülen, wie zuvor beschrieben, erfolgte die Detektion mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL) durch Zusatz von ECL-Reagenz auf die Membran und anschließender Belichtung eines Fotofilms (20 s bis 10 min) in einer lichtundurchlässigen Kassette. Die Entwicklung des Films erfolgte automatisiert im Cawomat.

2.3.3. HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Upamostat und WX-UK1

Für die HPLC-Analytik stand ein Agilent 1100 Series HPLC-System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) mit integriertem Vakuum-Entgaser, binärer Pumpe und Säulenofen zur Verfügung. Zur Detektion wurde ein externer Waters 486 UV/VIS Absorptions-Detektor (Waters, Milford, CT, USA) verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Clarity Lite HPLC-Aufnahme- und Auswertungssoftware (DataApex™, Prag, Tschechische Republik). Es wurden folgende Bedingungen zur Chromatographie mit Ionenpaarreagenz gewählt:

Stationäre Phase:	Phenomenex Gemini NX C 18 (5 µm) 150 × 4 mm (110 Å), Vorsäule C 18 4 × 4 mm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg)	
Säulenofentemperatur:	25°C	
Mobile Phase:	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in <i>Aqua bidest.</i> pH 4,0 (eingestellt mit 10 %iger (m/v) KOH-Lösung) /Acetonitril 40:60 (v/v)	
Flussrate:	1,0 ml/min, isokratisch	
Laufzeit:	8 min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Detektion:	UV 234 nm	
Retentionszeiten:	WX-UK1:	3,4 ± 0,1 min
	Upamostat:	6,8 ± 0,1 min

Nach der Herstellung des wässrigen Anteils der mobilen Phase wurde dieser mittels Vakuumfiltration durch einen 0,45 µm Whatmann® Membranfilter von Partikeln befreit.

Die Kalibrierung der HPLC-Analytik erfolgte mit dem synthetischen Metaboliten WX-UK1 in definierten Konzentrationen von 0,1 - 500 μM . Dazu wurde dieser im Fließmittel gelöst, mit gleichem Anteil Acetonitril versetzt und direkt vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde ebenfalls der Konzentrationsbereich der Kalibrierung von 0,1 - 500 μM verwendet. Eine Stammlösung von WX-UK1 wurde zunächst mit *Aqua bidest.* hergestellt und anschließend mit 20 mM MES-Pufferlösung pH 6,0 und mit 50 μg hitzedenaturierten Schweinelebermitochondrien versetzt. Diese wurden zuvor bei 100°C im Wasserbad abgekocht. Außerdem befanden sich im Inkubationsansatz je 1,0 mM Upamostat als Suspension in 3 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO). Das Volumen des Ansatzes betrug 150 μl . Nach 23 min Inkubation im 37°C warmen Schüttelwasserbad wurden die Reaktionen mit je 150 μl gekühltem Acetonitril abgestoppt, die Proben 5 min geschüttelt und danach bei 22 000 g weitere 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen.

2.3.4. HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Benzamidoxim und Benzamidin

Die Analytik zur Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin wurde mit dem unter Kapitel 2.3.3 beschriebenen HPLC-System in Anlehnung an die von Clement *et al.* (2005) beschriebene Methode durchgeführt. Es wurden folgende Bedingungen zur Chromatographie mit Ionenpaarreagenz gewählt:

Stationäre Phase:	LiChrochart® 250 × 4 mm LiChrospher 60, RP-select B (5 µm) mit Vorsäule RP-select B 4 × 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt)
Säulenofentemperatur:	25°C
Mobile Phase:	10 mM Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> /Acetonitril 83:17 (v/v)
Flussrate:	1,0 ml/min, isokratisch
Laufzeit:	30 min
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	UV 229 nm
Retentionszeiten:	Benzamidoxim: 6,9 ± 0,1 min Benzamidin: 25,5 ± 0,2 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde zuvor durch Vakuumfiltration durch einen Whatmann® Membranfilter 0,45 µm von Partikeln befreit.

Zur Validierung der HPLC-Methode wurde eine 8-Punkt-Kalibrierung mit dem synthetischen Metaboliten Benzamidin in definierten Konzentrationen im Bereich von 0,5-250 µM durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungen zu gleichen Teilen in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 und Acetonitril hergestellt und per HPLC analysiert.

2.3.5. Löslichkeit und Stabilität von Upamostat in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Löslichkeit von Upamostat wurde in einem Mehrkomponentenpuffer im pH-Bereich zwischen 4 und 8 bestimmt. Der Puffer hat über den gesamten pH-Bereich die gleiche Ionenstärke und setzt sich aus 50 mM MES, 100 mM Tris-Base und 50 mM Natriumacetat zusammen. Eingestellt wurde der pH-Wert mit 1,0 M NaOH bzw. 1,0 M HCl. Die Ionenstärke wurde mit 0,5 M NaCl-Lösung korrigiert. Zur Bestimmung der Löslichkeit wurden für jeden pH-Wert übersättigte Upamostat-Lösungen (6,3 mg/ml) in Puffer hergestellt und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Es konnte in jeder Lösung ein Bodensatz des Arzneistoffs beobachtet werden. Nach dem Absetzen der ungelösten Bestandteile wurden 75 µl vom Überstand entnommen und bei 22 000 g 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl vom Überstand entnommen 1:1 mit Acetonitril, zur verbesserten Detektion, versetzt und per HPLC vermessen.

Die Stabilität des Substrats Upamostat und des Metaboliten WX-UK1 wurde in Pufferlösung bei pH 6,0 und 37°C untersucht. Dazu wurden Suspensionen von Upamostat mit einer Konzentration von 0,5 mM und verdünnte Lösungen WX-UK1 mit 10 µM in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 hergestellt. Den Ansätzen mit Upamostat wurden 3 % (v/v) DMSO zur Löslichkeitsverbesserung zugesetzt. Die hergestellten Lösungen wurden im Schüttelwasserbad für einen Zeitraum von 0-120 min bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Ansätze 1:1 mit gekühltem Acetonitril versetzt und mittels HPLC vermessen.

2.3.6. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die N-Reduktion

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Upamostats sollte durch einen Zusatz von DMSO zum Inkubationsansatz die Löslichkeit und damit die Substratkonzentration erhöht werden. Deshalb wurde zuvor eine Hemmstudie mit steigenden DMSO-Anteilen im Inkubationsansatz am Modellsubstrat Benzamidoxim durchgeführt. Dazu wurde DMSO in Konzentrationen von 0-10 % (v/v) zum Inkubationsansatz, bestehend aus 50 µg porcine Lebermitochondrien und 3,0 mM Benzamidoxim in 150 µl 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, gegeben. Nach einer Vorinkubation von 3 min wurde die Reaktion mit 1,0 mM NADH gestartet. Die Inkubation wurde aerob bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt und nach 15 min mit 150 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Anschließend wurde 5 min geschüttelt, weitere 5 min mit 22 000 g zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC vermessen.

2.3.7. Zusammensetzung der *in vitro* Biotransformationsansätze

Nach Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen waren die Inkubationsansätze wie folgt zusammengesetzt:

Inkubationsansätze mit porcinen subzellulären Fraktionen

Als Enzymquellen wurden je nach Inkubationsansatz Mitochondrien aus unterschiedlichen isolierten porcinen Organen (je 10 µg aus Schilddrüse, 50 µg aus Leber, Niere, Herz, Dickdarm, Pankreas, 100 µg aus Lunge, Gehirn, Dünndarm), 50 µg Mikrosomen, Cytosol und die Fraktion des postnuklearen Überstandes aus der Leber verwendet. Das Substrat Upamostat wurde zusammen mit den genannten Proteinen verdünnt in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 1,0 mM NADH in 1,5 ml Reaktionsgefäßen inkubiert. Eine 5 mM Upamostat-Stammlösung wurde zuvor mit *Aqua bidest.* und einer DMSO-Konzentration von 30 % (v/v) hergestellt. Je Ansatz wurden anschließend 0,5 mM Upamostat, mit einem Lösungsmittelanteil von 3 % (v/v) DMSO im Inkubationsansatz, hinzugefügt. Das Gesamtvolumen der Inkubationsansätze betrug 150 µl. Die Inkubation wurde bei 37°C im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Nach einer Vorinkubationszeit von 3 min wurde die Reaktion mit dem Cosubstrat NADH gestartet. Die Ansätze wurden 15 min unter aeroben Bedingungen im 37°C Schüttelwasserbad inkubiert und mit 150 µl eisgekühltem Acetonitril abgestoppt. Anschließend wurden die Proben 5 min geschüttelt, danach ebenfalls 5 min bei 22 000 g zentrifugiert und sofort mittels HPLC vermessen.

Inkubationsansätze mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem

Die Inkubationsansätze mit den rekonstituierten rekombinanten humanen Enzymen enthielten je 7,5 µg mARC-1 (125 pmol Mo) oder mARC-2 (110 pmol Mo), 75 pmol Häm (Cyt b₅) und 7,5 pmol FAD (NADH Cyt b₅R Isoform 2). Abweichend vom

isolierten porcinen Enzymsystem wurden die Inkubationen in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 durchgeführt. Alle weiteren zuvor beschriebenen Parameter für Substrat- und Cosubstrat-Konzentrationen sowie die Inkubationsbedingungen konnten übernommen werden.

Inkubationen zur Bestimmung der Cosubstratabhängigkeit verliefen wie zuvor beschrieben. Es erfolgte ein Austausch des Cosubstrates NADH durch 1 mM NADPH.

Parallel durchgeführte Inkubationen zum Vergleich der *in vitro* Biotransformation von Upamostat mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten je 3 mM Benzamidoxim, je nach eingesetzter Proteinquelle gelöst in 20 mM MES-Puffer oder 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins erfolgte nach der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Methode mittels HPLC.

2.3.7.1. Einfluss des Puffersystems auf die N-Reduktion

Zur Bestimmung des Einflusses der Puffersysteme auf die enzymatische N-Reduktion von Upamostat wurden Inkubationsmedien bestehend aus 20 mM MES-Puffer, 10 bzw. 100 mM Kaliumphosphatpuffer und *Aqua bidest.* verwendet und auf pH 6,0 eingestellt. Es wurden jeweils gesättigte Lösungen von Upamostat hergestellt und ein sich bildender Bodensatz durch Zentrifugation abgetrennt. Zu den verschiedenen Upamostat-haltigen Inkubationsmedien wurden jeweils das rekombinante humane Enzymsystem 7,0 µg mARC-1 (120 pmol Mo) und 4,5 µg mARC-2 (70 pmol Mo) sowie je 50 µg porcine Leber- und Nierenmitochondrien in der unter Kapitel 2.3.7 beschriebenen Zusammensetzung hinzugefügt. Die Reaktionsansätze wurden entsprechend der darin aufgeführten Parameter inkubiert und aufgearbeitet. Die Inkubationszeit betrug abweichend 20 min. Parallel wurde die

Inkubation mit dem rekombinanten Enzymsystem und den Mitochondrienfraktionen unter Standardbedingungen mit DMSO-Zusatz durchgeführt.

2.3.7.2. Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Reduktion

Die Bestimmung des pH-Optimums der enzymatischen Reduktion von Upamostat zum aktiven Metaboliten WX-UK1 wurde mit isolierten porcinen Lebermitochondrien (SLMt) und -mikrosomen (SLMs) im Mehrkomponentenpuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.3.5) im pH-Bereich von 4,0 – 8,0 durchgeführt. Dazu wurden zum vorgelegten Puffer jeweils 50 µg SLMt bzw. 100 µg SLMs und 1 mM Upamostat-Suspension als Substrat hinzugegeben. Als Lösungsvermittler wurde DMSO in einer Endkonzentration von 3 % (v/v) dem Ansatz zugesetzt. Die Inkubation wurde wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben durchgeführt.

2.3.7.3. Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Zur Ermittlung des linearen Bereiches der N-Reduktion von Upamostat zu WX-UK1 wurden die Umsetzungsraten in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

Die Inkubationsansätze enthielten je nach verwendetem Protein entweder 50 µg isolierte porcine Leber- bzw. Nierenmitochondrien verdünnt in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 oder 7,0 µg humanes mARC-1(120 pmol Mo) bzw. mARC-2 (105 pmol Mo), 75 pmol hCyt b₅ und 7,5 pmol hCyt b₅R Isoform 2 in 20 mM MES pH 6,0. Die Durchführung der Inkubation sowie die anschließende Aufarbeitung der Proben erfolgte wie zuvor in Kapitel 2.3.7 beschrieben. Die Inkubationszeit variierte im Bereich von 1,5 – 30 min.

2.3.7.4. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Es wurden Studien zur Bestimmung der Substratabhängigkeit anhand des isolierten porcinen sowie des humanen rekombinanten Enzymsystems mit den unter Kapitel 2.3.7 beschriebenen optimierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. Upamostat wurde in Konzentrationen von 5-1000 μM den Inkubationsansätzen zugesetzt.

2.4. ERGEBNISSE

2.4.1. Quantifizierung von WX-UK1 durch HPLC

Das Beispielchromatogramm der in Kapitel 2.3.3 beschriebenen und neu entwickelten HPLC-Analytik zur Quantifizierung von WX-UK1 zeigt die Detektion von Upamostat bei einer Retentionszeit von 6,8 min. Dessen Metabolit WX-UK1 konnte bei 3,4 min detektiert werden.

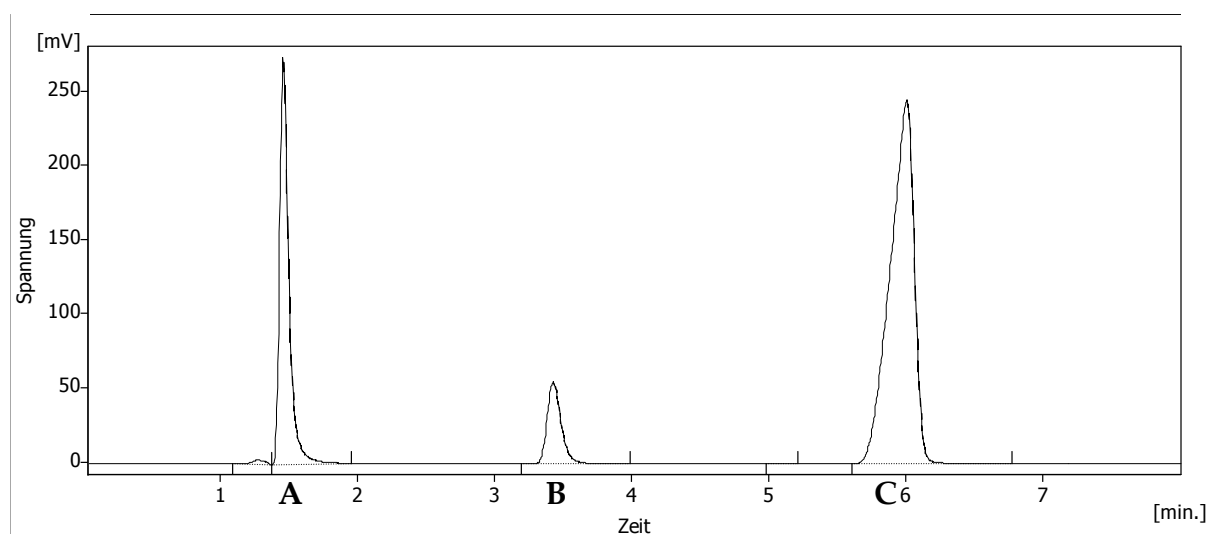


Abb. 2.4.1: Beispielchromatogramm zur Detektion von Upamostat und WX-UK1. Dargestellt sind die Peaks der Wiederfindung bei 234 nm von 50 μ M WX-UK1 (B) im Inkubationsansatz mit 1 mM Upamostat (C) in 3 % DMSO (A).

Die Auswertung der Kalibrierung (Abb. 2.4.2) zeigt, dass die berechnete Kalibriergerade von WX-UK1 im angegebenen Konzentrationsbereich von 0,1-500 μ M mit einem Korrelationskoeffizienten von $r > 0,9999$ linear verläuft.

Die Wiederfindungsgerade zeigte ebenfalls einen linearen Verlauf mit einem Korrelationskoeffizienten von $r > 0,9999$ und einer Wiederfindungsrate von durchschnittlich $100,1 \pm 7,1$ % im Messbereich von 0,5-500 μ M. Es konnte eine

Nachweisgrenze von $0,1 \mu\text{M}$ und eine Bestimmungsgrenze von $0,5 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

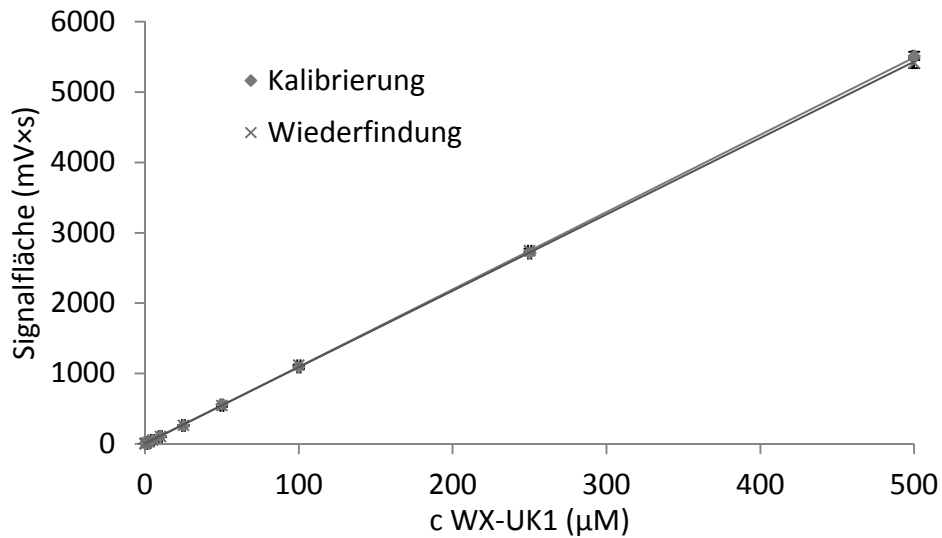


Abb. 2.4.2: Kalibrierung und Wiederfindung von WX-UK1

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der berechneten Signalfächen aus zwei parallel durchgeführten Messreihen, die doppelt vermessen wurden.

2.4.2. Löslichkeit und Stabilität von Upamostat in Abhängigkeit vom pH-Wert

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Löslichkeit von Upamostat ist in der Abb. 2.4.3 in einem Bereich von pH 4-8 gezeigt. Upamostat ist sehr schlecht wasserlöslich. Lediglich im Sauren (pH < 5) ist ein Anstieg der Löslichkeit zu beobachten.

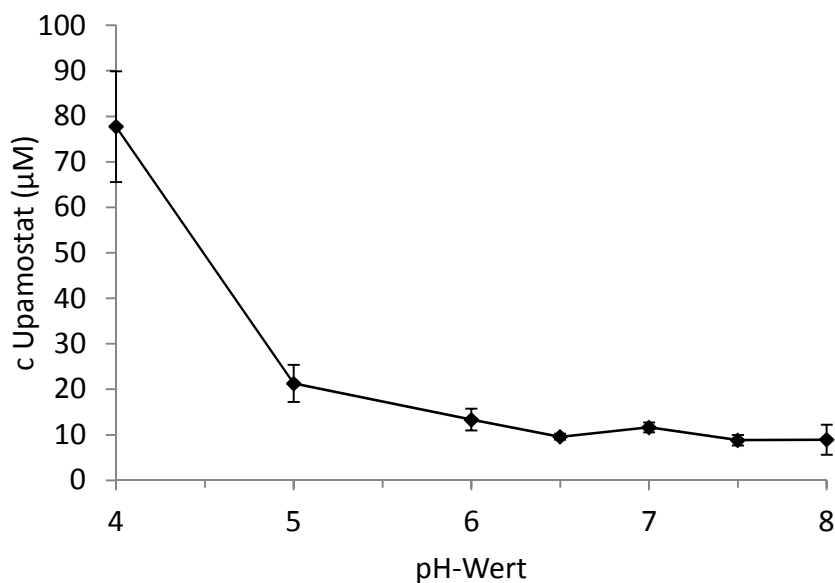


Abb. 2.4.3: Bestimmung der Löslichkeit von Upamostat im pH-Bereich von 4-8

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der Upamostat-Konzentrationen gelöst im Mehrkomponentenpuffer in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.5 beschrieben.

Sowohl Upamostat als auch dessen Metabolit WX-UK1 waren über den gesamten Messzeitraum in MES-Puffer bei 37°C stabil. Eine Vermessung der Proben nach 15-stündiger Inkubation bei 37°C zeigte keine Veränderungen der Konzentrationen. Die Stabilitäten von Upamostat und WX-UK1 über 120 min sind in Abb. 2.4.4 dargestellt.

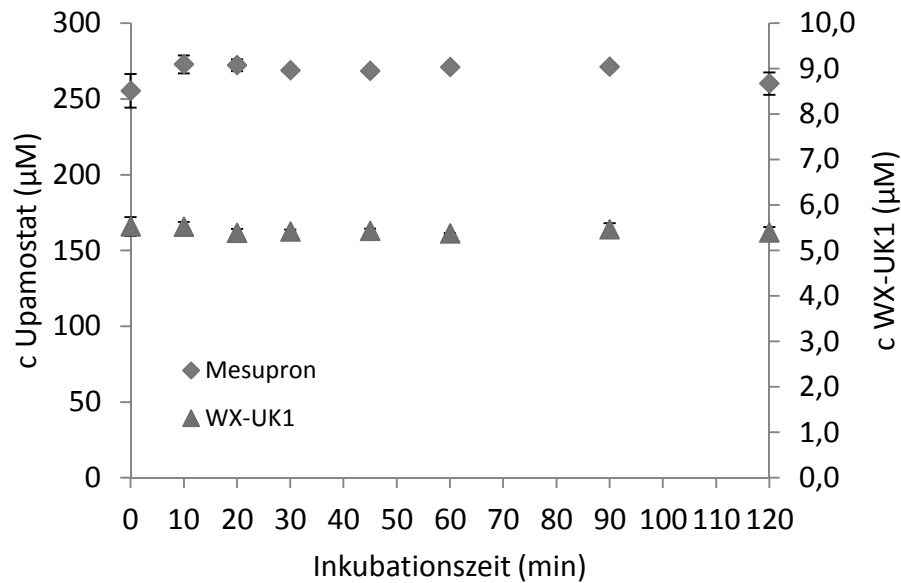


Abb. 2.4.4: Bestimmung der Stabilität von Upamostat und dessen Metabolit WX-UK1 über einen Zeitraum von 120 min bei 37°C

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der Substratkonzentrationen aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.5 beschrieben.

2.4.3. Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die N-Reduktion

Die Inkubation von Benzamidoxim mit Schweinelebermitochondrien unter dem Einfluss des Lösungsmittels DMSO ist in der Abb. 2.4.5 dargestellt. Es ist eine deutliche Hemmung der enzymatischen N-Reduktion zum Benzamidin zu erkennen. Ab einem Zusatz von 3% DMSO zum Inkubationsansatz sinkt die N-reduktive Aktivität um ca. 20%. Ein 10%iger Zusatz bewirkt, dass nur noch ungefähr 40% der enzymatischen Aktivität im Vergleich zum Ansatz ohne DMSO vorhanden ist. Für die Biotransformationsstudien mit Upamostat ist ein DMSO-Zusatz von 3% gewählt worden.

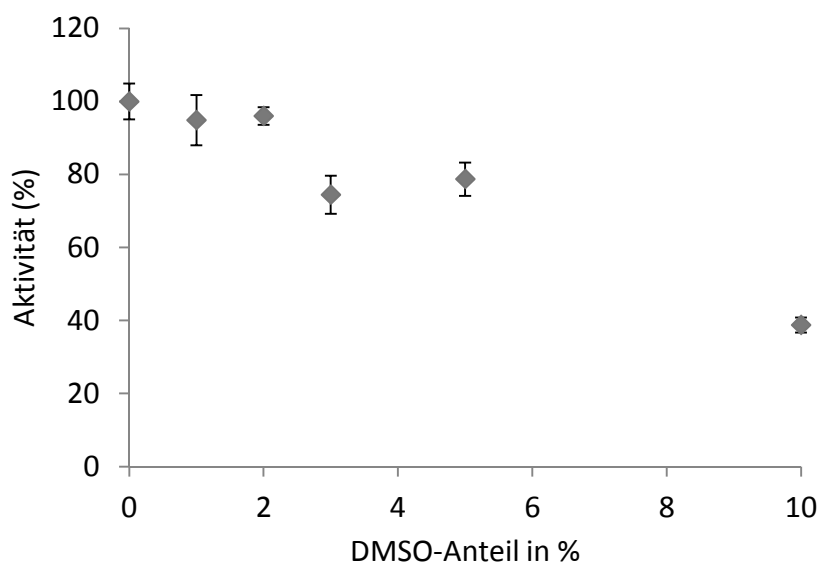


Abb. 2.4.5: Einfluss der DMSO-Konzentration auf die BAO-Reduktion zum Benzamidin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der prozentualen Aktivitäten der Umsetzungsraten in Bezug auf die Inkubation ohne DMSO mit steigendem DMSO-Gehalt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.6 beschrieben.

2.4.4. Einfluss des Puffersystems auf die N-Reduktion

Vorherige Untersuchungen von Plitzko (2010) konnten bereits einen Einfluss des Inkubationspuffers auf die N-reduktive Aktivität des mARC-haltigen Enzymsystems zeigen. Die Durchführung der Inkubationen von Upamostat mit dem humanen Enzymsystem mARC und porcinen Leber- und Nierenmitochondrien in Kaliumphosphatpuffer unterschiedlicher Ionenstärke bzw. in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 wurde in Kapitel 2.3.7.1 beschrieben. Deutlich erkennbar war eine Steigerung der N-Reduktion für die rekombinanten Proteine im MES-Puffer. Demgegenüber wurde nur ein geringer Einfluss der verwendeten Puffer auf die Umsetzung von Upamostat durch die isolierten porcinen Proteine beobachtet. Der Kontrollansatz in Wasser zeigte wie erwartet nur sehr niedrige Umsetzungsraten (Daten nicht gezeigt). In der Abb. 2.4.6 sind die spezifischen Aktivitäten durch Inkubationen von mARC und den isolierten porcinen Mitochondrien mit Upamostat in 20 mM MES- bzw. 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit und ohne DMSO-Zusatz dargestellt. Durch den 3%igen DMSO-Zusatz zum Inkubationsansatz sind deutlich höhere spezifische Aktivitäten messbar, was aus der verbesserten Löslichkeit von Upamostat resultiert. Die Upamostatkonzentration im Inkubationsansatz mit dem Zusatz des Lösungsvermittlers konnte bei einem pH-Wert von 6,0 von etwa 15 μM (siehe Abb. 2.4.3) auf etwa 30 μM gelöstes Substrat verdoppelt werden. Die höhere Substratkonzentration überwiegt den hemmenden Einfluss des DMSO, sodass für weitere Inkubationen dem Inkubationsansatz 3% DMSO zur Verbesserung der Löslichkeit zugesetzt wurde.

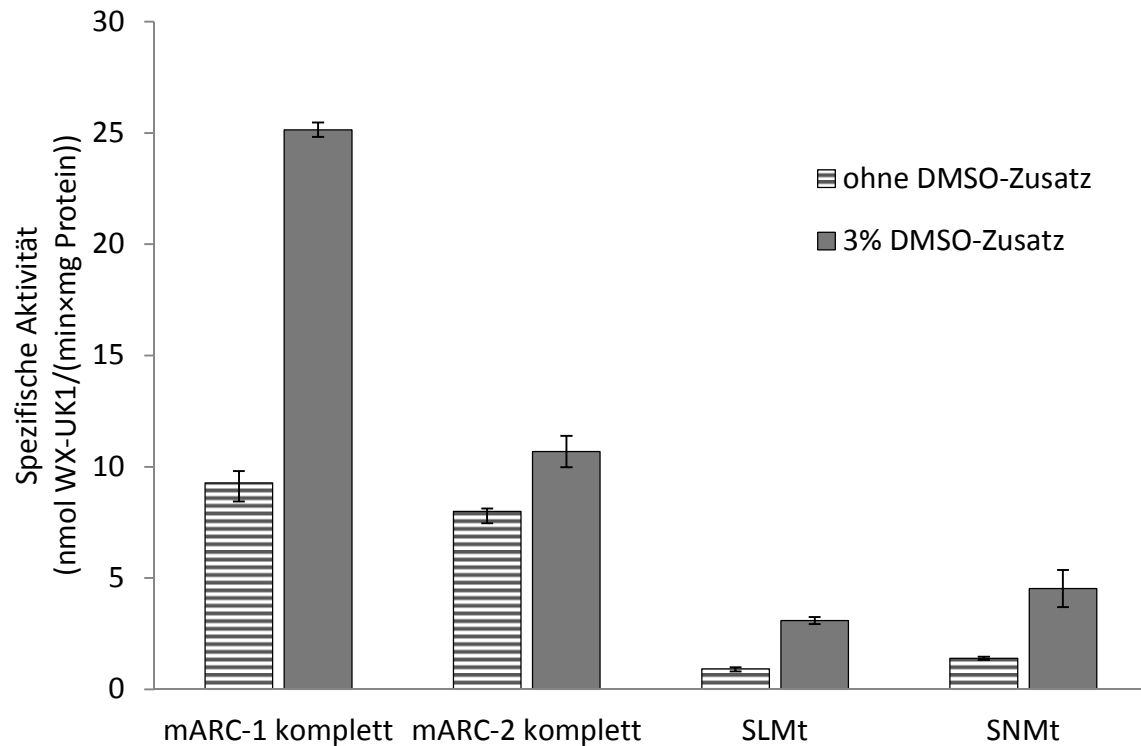


Abb. 2.4.6: Einfluss des Inkubationspuffers auf die Reduktion von Upamostat mit rekombinatem humanen mARC und isolierten porcinen Leber- (SLMt) und Nierenmitochondrien (SNMt)

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.7.1 beschrieben.

2.4.5. Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Reduktion

Der Einfluss des pH-Wertes auf die N-Reduktion von Upamostat ist für die Inkubation mit porcinen Lebermitochondrien und –mikrosomen exemplarisch in Abb. 2.4.7 gezeigt. Das pH-Optimum für die *in-vitro* Biotransformationsstudien liegt bei etwa 6,0. Für alle Inkubationen wurde ein pH-Wert von 6,0 gewählt.

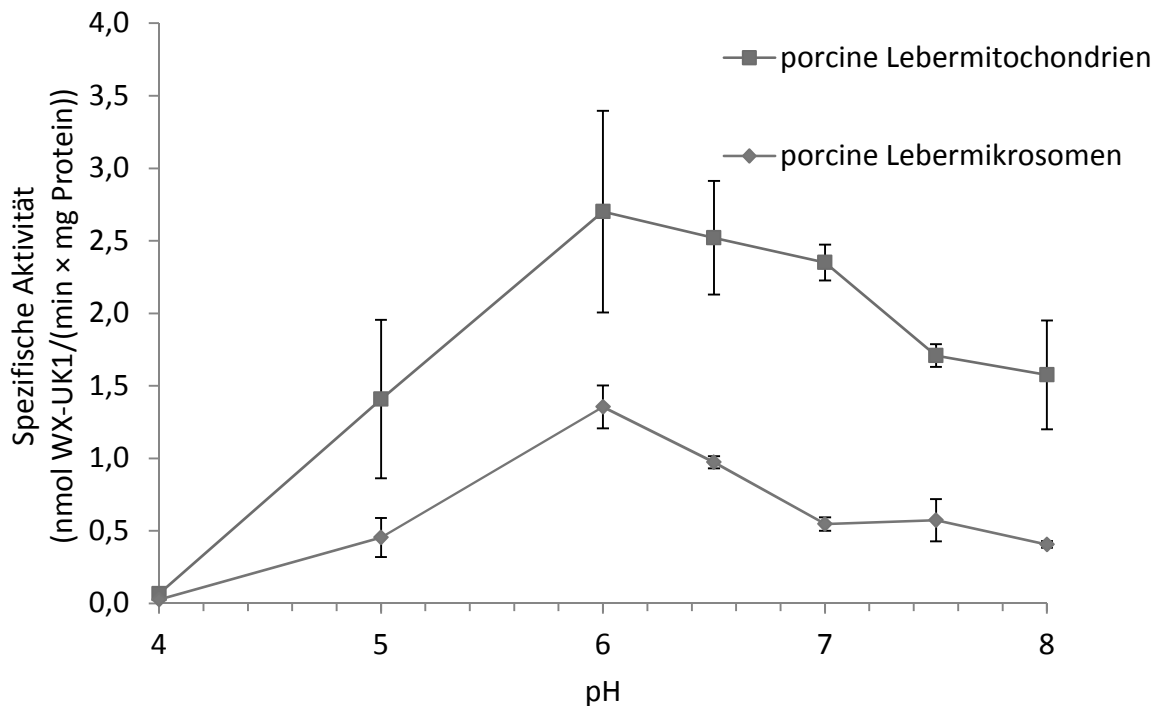


Abb. 2.4.7: Abhängigkeit der WX-UK1-Bildung vom pH-Wert bei Inkubationen mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.7.2 beschrieben.

2.4.6. Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Reduktion

Zur Ermittlung des linearen Bereiches der N-Reduktion von Upamostat durch Inkubation mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Exemplarisch wurde die Zeitabhängigkeit durch Inkubation mit porcinen Leber- und Nierenmitochondrien ermittelt (Abb. 2.4.8). Die Durchführung und Inkubationsbedingungen sind in Kapitel 2.3.7.3 beschrieben.

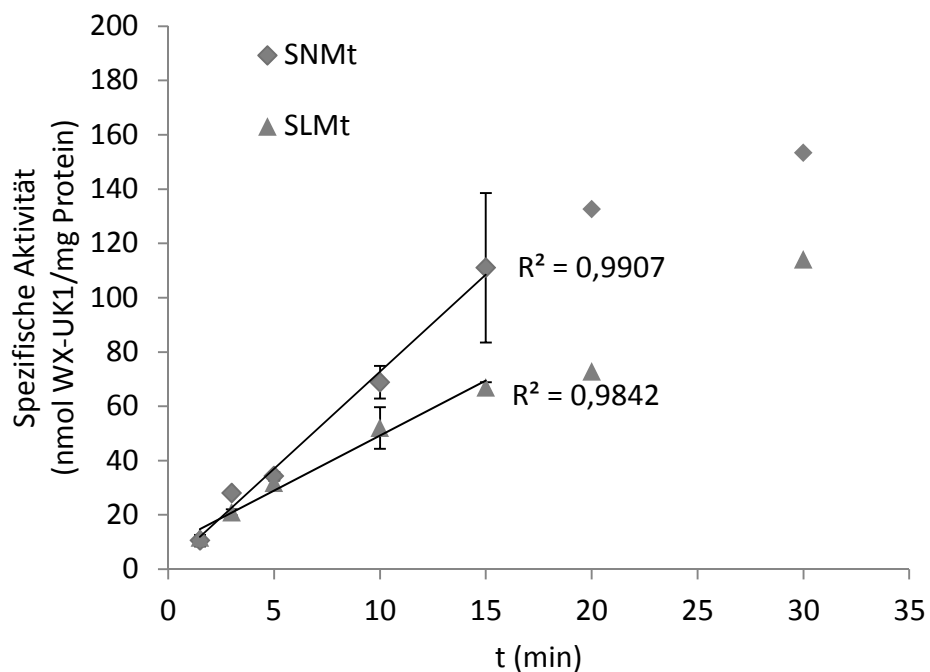


Abb. 2.4.8: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von Upamostat mit porcinen Mitochondrien aus der Leber (SLMt) und Niere (SNMt)

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.7.3 beschrieben.

Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der enzymatischen Reduktion und der Inkubationszeit über den Zeitraum bis 15 min gezeigt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Upamostatreduktion nahm bei längerer Inkubationsdauer ab. Nach einer Reaktionszeit von 15 min konnte WX-UK1 in ausreichend hoher Konzentration enzymatisch gebildet werden ($> 11 \mu\text{M}$), sodass eine valide Quantifizierung des Metaboliten ermöglicht wurde. Für alle weiteren Inkubationen wurde die optimierte Inkubationszeit von 15 min gewählt.

2.4.7. Bestimmung und Vergleich der Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen mit Upamostat und Benzamidoxim

Die Inkubation wurde unter den in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt und vermessen. Die Abb. 2.4.9 zeigt die Umsetzungsgeschwindigkeit von Upamostat und Benzamidoxim zum korrespondierenden Amidin durch Inkubation mit Mitochondrien (SLMt), Mikrosomen (SLMs), Cytosol und dem postnuklearen Überstand aus Schweineleber (SL-PNS). Zusätzlich sind zu den einzelnen isolierten subzellulären Fraktionen Western-Blot-Analysen durchgeführt worden, um diese in Bezug auf deren Reinheit und Anreicherung mit mARC näher zu charakterisieren. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse sind zu den entsprechenden Fraktionen unterhalb der graphischen Darstellung abgebildet. Die Durchführung der Western-Blot-Analyse wurde in Kapitel 2.3.2.8 beschrieben.

Die größte Umsetzungsgeschwindigkeit wurde in der Mitochondrienfraktion gemessen. Im Vergleich zur Umsetzung mit SL-PNS konnte dort eine sechsfache Anreicherung der Aktivität ermittelt werden. Die mikrosomale Fraktion zeigt dagegen eine etwa 2,5-fach geringere spezifische Aktivität im Vergleich zur Inkubation mit Mitochondrien. Eine Umsetzung der Substrate Upamostat und Benzamidoxim durch die cytosolische Fraktion findet nur in einem sehr geringen Ausmaß statt. Die entsprechenden Western-Blots zur Identifizierung von mARC-1 und mARC-2 bestätigen die Anreicherung des für die N-Reduktion verantwortlichen Enzymsystems in den Mitochondrien. Dabei konnte eine höhere Expression von mARC-2 gegenüber mARC-1 detektiert werden.

Die gemessene Aktivität der mikrosomalen Fraktion ist auf die geringe Crosskontamination mit Mitochondrien zurückzuführen. Im VDAC-2- (Mitochondrien-Marker)

und mARC-2-Blot sind entsprechende schwache Banden detektierbar. Eine Verunreinigung der Mitochondrien mit mikrosomalen (Calnexin) bzw. cytosolischen Enzymen (GAPDH) konnte nicht beobachtet werden, sodass von einer hochreinen Mitochondrienfraktion ausgegangen werden kann.

Der Vergleich der Umsetzungsraten beider Substrate durch Inkubation der gleichen Proteinchargen zeigte, dass Upamostat etwa um den Faktor vier langsamer zum Amidin durch die porcinen subzellulären Leberfraktionen reduziert wurde als das Benzamidoxim. Ein Grund dafür könnte die schlechte Wasserlöslichkeit des Upamostats sein, da während der Inkubation nur eine geringe Menge an gelöstem Substrat für die enzymatische Umsetzung zur Verfügung stand. Dagegen konnte Benzamidoxim in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt werden.

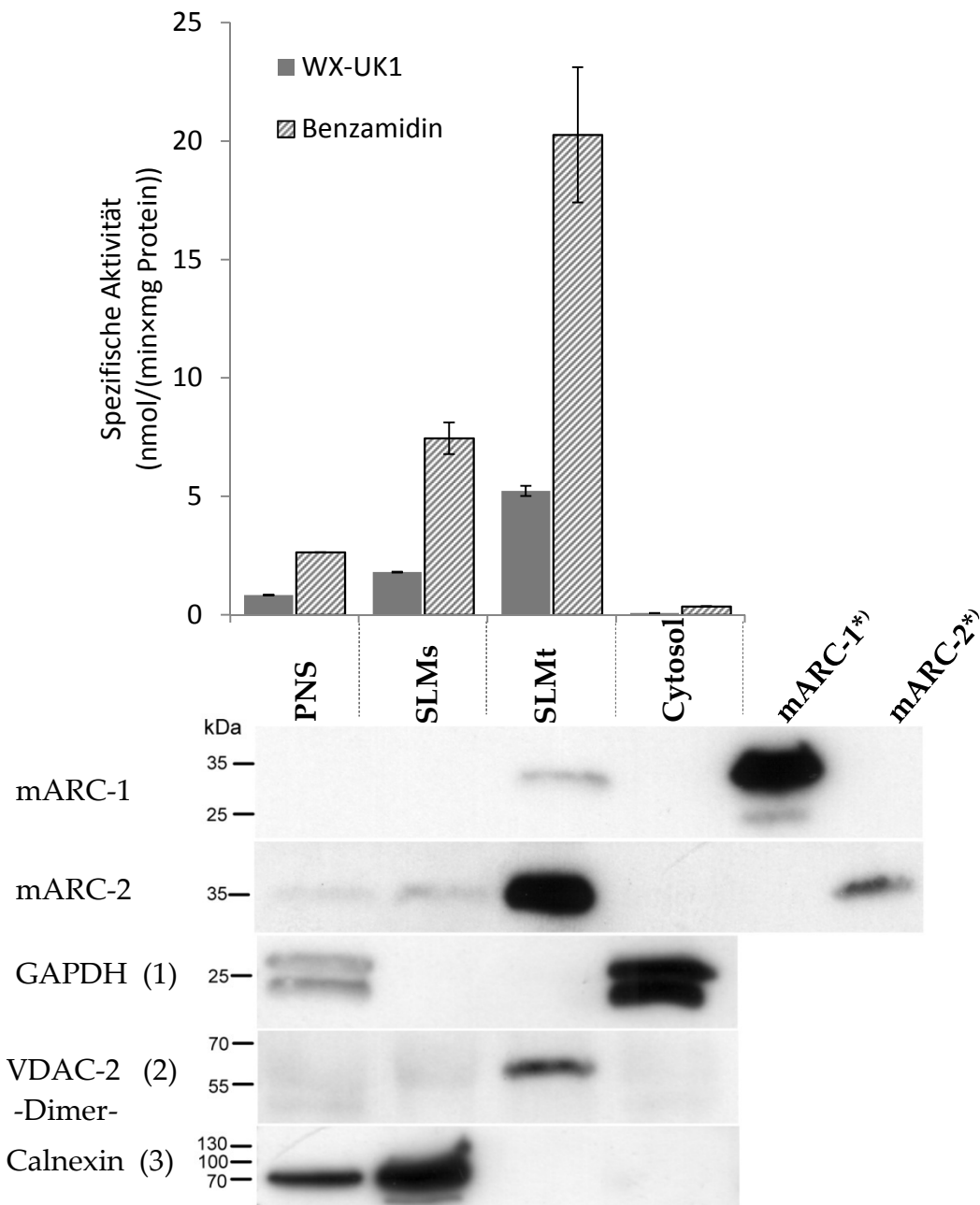


Abb. 2.4.9: N-Reduktion von Benzamidoxim und Upamostat durch porcine subzelluläre Leberfraktionen.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden und Western-Blots der isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen mit Antikörpern als Marker für cytosolische (1); mitochondriale (2) und mikrosomale Proteine (3) sowie mARC-1 und mARC-2.

*) Rekombinantes humanes mARC-1/2 wurde als Kontrolle aufgetragen. SLMt/Ms = Schweinelebermitochondrien/-mikrosomen; PNS = Fraktion des postnuklearen Überstandes

2.4.8. Reduktion von Upamostat durch porcine subzelluläre Leberfraktionen - Ermittlung des Cosubstrat-Einflusses

Die Inkubationen wurden unter den in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Bedingungen mit isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen aus Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol und Homogenat durchgeführt. Die Ergebnisse der enzymatischen Umsetzung mit NADH bzw. NADPH als Cosubstrat zeigten, dass die Reduktion von Upamostat zum Amidin mit NADH bevorzugt stattfindet. Die NADPH-abhängige Reduktion verläuft dagegen in den isolierten porcinen subzellulären Fraktionen, sowohl in der Mitochondrienfraktion als auch in den Mikrosomen und im Homogenat, deutlich schwächer. Ohne den Zusatz eines Cosubstrats zum Inkubationsansatz ist keine enzymatische Umsetzung messbar.

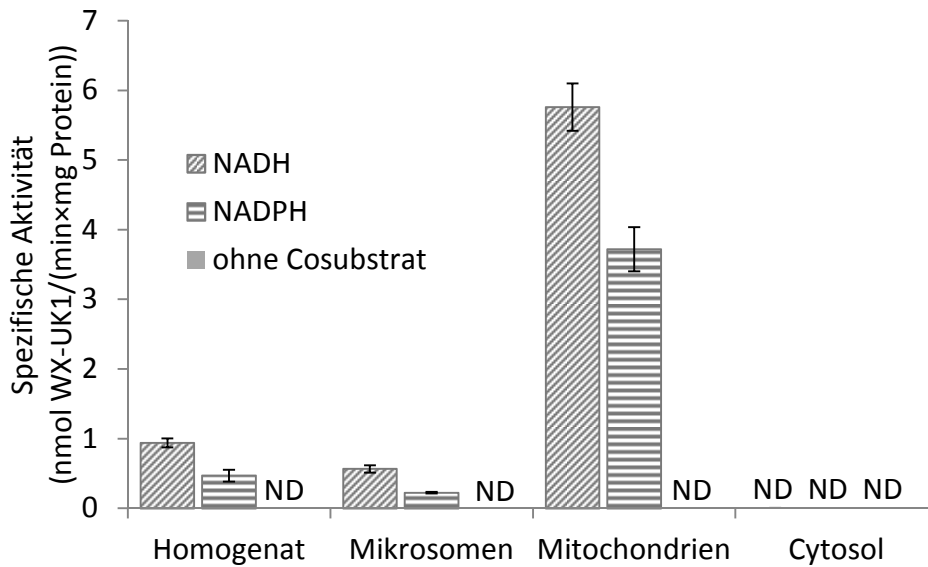


Abb. 2.4.10: Reduktion von Upamostat durch porcine subzelluläre Leberfraktionen mit NADH und NADPH als Cosubstrat

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.7 beschrieben. Abweichend dazu wurden 50 μ g Mitochondrien, je 100 μ g Mikrosomen, Homogenat und 30 μ g Cytosol zum Inkubationsansatz hinzugefügt (Inkubationszeit 20 min)
 ND = nicht detektierbar

2.4.9. Vergleich der N-reduktiven Aktivität in porcinen hepatischen und extrahepatischen Mitochondrienfraktionen

Die Inkubation mit Mitochondrien aus verschiedenen isolierten Schweineorganen wurde unter den in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Auswertung der Inkubation und die Bestimmung der Umsetzungsraten zeigten eine hohe N-reduktive Aktivität in der Leber, Schilddrüse, Niere und Pankreas, wohingegen in allen anderen Organen nur geringe Aktivitäten gemessen werden konnten.

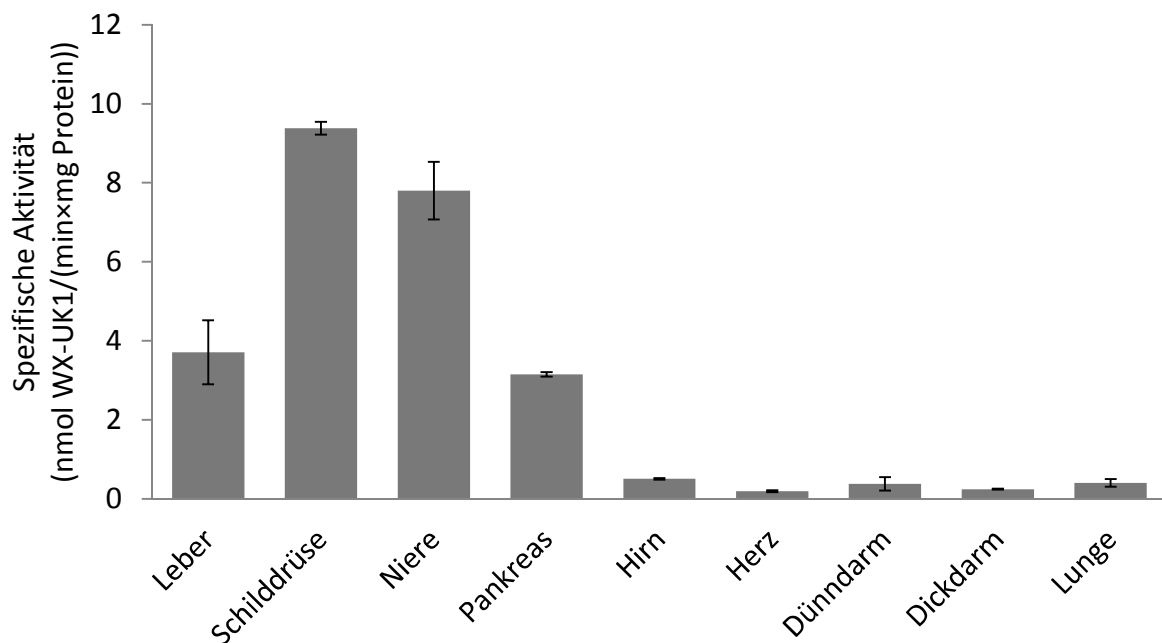


Abb. 2.4.11: Vergleich des Ausmaßes der WX-UK1-Bildung durch die Inkubationen mit isolierten porcinen Mitochondrien

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Inkubation mit Pankreasmitochondrien erfolgte in einem unabhängigen Versuch. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.7 beschrieben.

2.4.10. Reduktionsstudien mit dem rekombinanten humanen Dreikomponentenzymssystem mARC

An die Untersuchungen zur Reduktion von Upamostat mit mARC-haltigen porcinen subzellulären Fraktionen schlossen sich Biotransformationsstudien mit dem humanen rekombinanten Dreikomponentenzymssystem bestehend aus Cyt b₅, der NADH-abhängigen Cyt b₅R und mARC an.

Die Ermittlung des linearen Bereichs der Umsetzungsgeschwindigkeit von Upamostat zeigte, ähnlich wie bei der Inkubation mit porcinen subzellulären Fraktionen (Kapitel 2.4.6), einen linearen Verlauf im Bereich von 0-15 min, sodass alle weiteren Inkubationen mit einer Inkubationszeit von 15 min durchgeführt wurden.

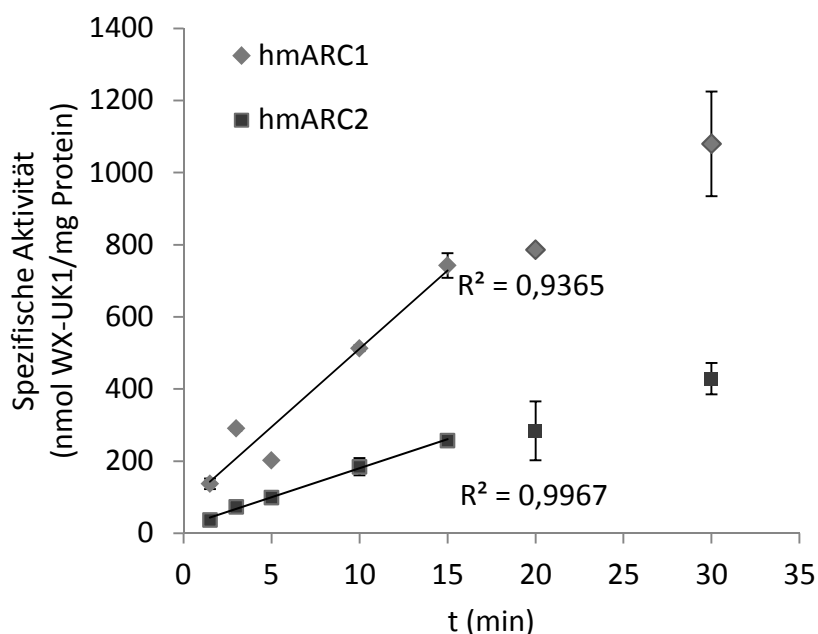


Abb. 2.4.12: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von Upamostat mit dem rekombinanten humanen Enzymssystem mARC

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.7.3 beschrieben.

Die Inkubation mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem wurde, wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben, unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Es wurden die Umsetzungsraten der rekonstituierten Inkubationsansätze mit mARC-1 und mARC-2 bestimmt:

Tab. 2.4.1: Spezifische Aktivitäten des rekombinanten Enzymsystems durch Umsetzung von Upamostat

Inkubationsansatz	Spezifische Aktivität (nmol WX-UK1×min ⁻¹ ×mg ⁻¹ Protein)	
	mARC-1	mARC-2
komplett ^a	56,1 ± 1,3	24,3 ± 0,4
ohne NADH	ND	ND
ohne Cyt b ₅	ND	ND
ohne Cyt b ₅ R	2,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1
nur mARC	ND	ND
ohne mARC	ND	ND
ohne Protein	ND	ND

^aDer komplette Inkubationsansatz enthält mARC, Cyt b₅, Cyt b₅R und NADH.

Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten ± Stabw. von vier Bestimmungen. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 2.3.7 beschrieben.

ND = nicht detektierbar (Bestimmungsgrenze: 0,6 nmol×min⁻¹×mg⁻¹)

Das rekombinante Enzymsystem mARC-1 mit Cyt b₅ und Cyt b₅R zeigte im Vergleich zum mARC-2 eine deutlich höhere spezifische Aktivität. Die Inkubation ohne Cosubstrat-Zusatz, ohne Cyt b₅ und Cyt b₅R bzw. ohne Cyt b₅ zeigte keinerlei Umsetzung zum Amidin WX-UK1. Lediglich der Ansatz mit mARC, Cyt b₅ und NADH zeigte noch eine geringe Aktivität. Bezogen auf die Umsetzung des Modell-

substrats Benzamidoxim wurde Upamostat durchschnittlich fünffach langsamer zum Amidin umgesetzt. Für mARC-1 konnte eine spezifische Aktivität im Komplettansatz von $204,3 \pm 42,0$ nmol Benzamidin \times min⁻¹ \times mg⁻¹ Protein und für mARC-2 $192,8 \pm 20,0$ nmol Benzamidin \times min⁻¹ \times mg⁻¹ Protein ermittelt werden.

2.4.11. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Es wurden Studien zur Bestimmung der Substratabhängigkeit anhand des isolierten porcinen sowie des humanen rekombinanten Enzymsystems mit den zuvor beschriebenen optimierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. Es konnten keine zuverlässigen enzymkinetischen Parameter wie K_m und v_{max} -Werte bestimmt werden, da es trotz des Zusatzes von 3 % DMSO als Lösungsvermittler zum Inkubationsansatz während der Inkubation zum Ausfallen des Substrates aus der Pufferlösung kam. Nach Zentrifugation der Inkubationsansätze wurde eine maximale Upamostat-Konzentration von nur 30 μ M detektiert. Eine Erhöhung der DMSO-Konzentration zur Verbesserung der Löslichkeit konnte nicht in Betracht gezogen werden, da ansonsten, wie in Kapitel 2.4.3 gezeigt wurde, Proteinhemmung eintritt.

2.5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte aufbauend auf vorausgegangenen Untersuchungen erstmalig die Reduktion des Amidoxim-Prodrugs Upamostat (Mesupron[®]) zu seinem aktiven Metaboliten WX-UK1 durch das mitochondriale Enzymsystem, das in unserem Arbeitskreis vollständig aufgeklärt wurde, identifiziert werden (Havemeyer *et al.*, 2006). Bei dem beteiligten Enzymsystem handelt es sich um ein in Mitochondrien lokalisiertes Dreikomponenten-enzymssystem bestehend aus der molybdänhaltigen mitochondrialen Amidoxim Reduzierenden Komponente (mARC), Cyt b₅ und der NADH-abhängigen Cyt b₅R. Erste Studien wurden durch Inkubation von Upamostat mit porcinen subzellulären Fraktionen durchgeführt. Die Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in der mitochondrialen Fraktion war für Upamostat mit der des mARC-spezifischen Substrats Benzamidoxim vergleichbar. Deshalb kann angenommen werden, dass die Reduktion von Benzamidoxim und Upamostat durch identische mitochondriale Proteine auf die gleiche Weise katalysiert werden. Des Weiteren führte ein Austausch des Cofaktors NADH durch NADPH zu einer Verringerung der N-reduktiven Aktivität in der mitochondrialen und mikrosomalen Fraktion. Dies zeigt, dass eine Beteiligung anderer NADPH-abhängiger N-reduktiver Enzymsysteme unwahrscheinlich ist.

Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Reduktion von Benzamidoxim gegenüber der des Upamostats viermal schneller verlief (Abb. 2.4.9). Dies geschieht aufgrund der begrenzten Wasserlöslichkeit des Upamostats, woraus eine Senkung der effektiven Substratkonzentration im Inkubationsansatz resultierte. Zur Erhöhung der Substratkonzentration im Inkubationsansatz wurde das Lösungsmittel DMSO in niedriger Konzentration eingesetzt. Die hemmende Wirkung des Lösungsvermittlers DMSO auf die Enzymaktivität (Monder, 1967) war in diesem Konzentrationsbereich

vernachlässigbar. Der Zusatz von 3% DMSO zu dem Inkubationsansatz verringerte die spezifische Aktivität um maximal 20%.

Abschließend konnte eine Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems an der metabolischen Aktivierung von Upamostat, unter Verwendung des rekonstituierten Enzymsystems durch Inkubation der rekombinanten humanen Proteine, bestätigt werden. Wie bereits für andere N-hydroxylierte Strukturen gezeigt wurde, sind beide mARC-Enzyme in der Lage Upamostat zu reduzieren (Havemeyer *et al.*, 2010, Kotthaus *et al.*, 2011, Krompholz *et al.*, 2012, Wahl *et al.*, 2010). Inkubationsansätzen, denen eines dieser Proteine fehlte, zeigten entweder keine oder nur noch eine vernachlässigbar geringe Aktivität (Tab. 2.4.1). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorheriger Studien (Krompholz *et al.*, 2012) zeigte das humane mARC-1-haltige System höhere Umsetzungsraten als das Enzymsystem mit humanem mARC-2.

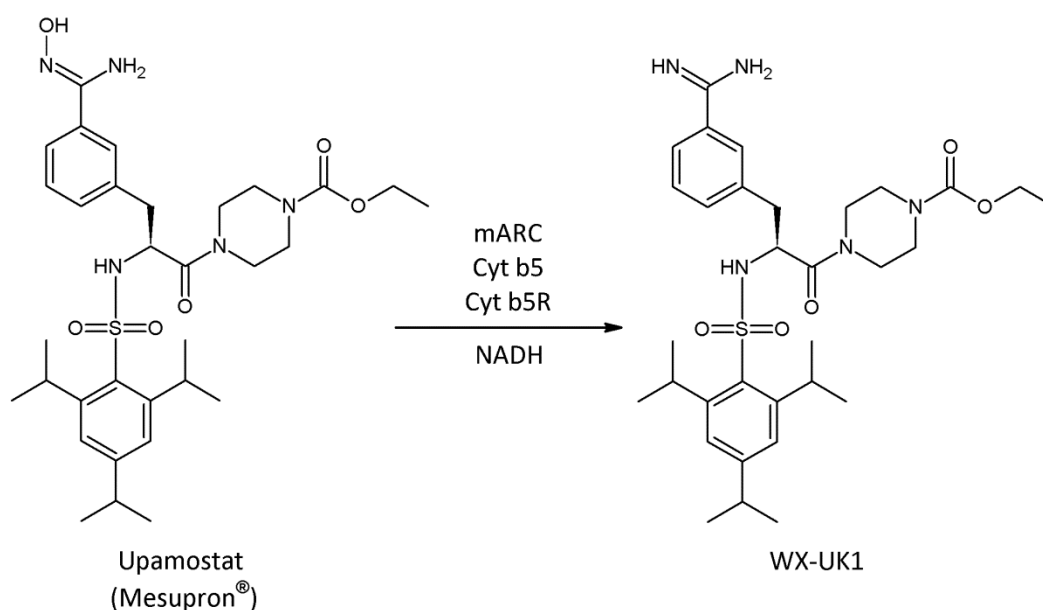


Abb. 2.5.1: Postulierte Aktivierung zur Wirkform WX-UK1 durch enzymatische Reduktion.

Basierend auf immunhistochemischer Färbung des mARC-Enzyms in porcinen Geweben konnte bisher in allen untersuchten Geweben N-reduktive Aktivität und Expression mindestens einer mARC-Isoform detektiert werden. Hohe Konzentrationen beider Isoformen konnten in der mitochondrialen Fraktion von Leber, Niere und Schilddrüse beobachtet werden (Krompholz *et al.*, 2012). Diese Studie bestätigt eine hohe N-reduktive Aktivität gegenüber Upamostat in den isolierten Mitochondrien dieser Gewebe. Die mARC-Expression in allen Organen erklärt auch die schnelle Umwandlung von Upamostat in die aktive Form, so wie es *in vivo* beobachtet wurde (Meyer *et al.*, 2008). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Upamostat durch das mARC-haltige Enzymsystem reduziert wird. Diese Ergebnisse deckten sich in weiten Teilen mit Untersuchungen anderer N-hydroxylierter Prodrugs (Grünwald *et al.*, 2008, Havemeyer *et al.*, 2010, Havemeyer *et al.*, 2011). Alle Komponenten sind in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, was auch den Zugang von Fremdstoffen wie Upamostat erleichtert. Die Aktivierung verläuft vergleichbar schnell in Bezug auf die bekannte Umwandlung von Esterprodrugs, die in großer Zahl zugelassen worden sind (Rautio *et al.*, 2008). Besonders vorteilhaft an dieser Aktivierung ist, dass keine signifikanten Polymorphismen für mARC entdeckt werden konnten (Ott, Dissertation in Vorbereitung). Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei allen Patienten die Aktivierung zur Wirkform ablaufen wird. Von gleicher Bedeutung ist die CYP 450 unabhängige Reduktion von Upamostat zum zugehörigen wirksamen Amidin. Insofern sind keine CYP 450-bedingten Interaktionen zu erwarten.

3. ZELLKULTURSTUDIEN MIT HUMANEN KREBSZELLINIEN ZUR BESTIMMUNG DER N-REDUKTIVEN AKTIVITÄT DURCH mARC

3.1. EINLEITUNG

Zellkulturstudien werden als *in vitro* Testsysteme für die Erforschung zellulärer Prozesse eingesetzt. Anhand von kultivierten Zelllinien lassen sich beispielsweise der Metabolismus und die Toxizität von Xenobiotica oder Signaltransduktionswege der Zelle untersuchen. Säugetierzellkulturen können in Primärkulturen und stabile Zelllinien eingeteilt werden. Primärkulturen bilden Zellkulturen aus primären Geweben oder Organen, die direkt dem Organismus entnommen und durch mechanische oder enzymatische Dissoziation des Gewebes gewonnen werden (Schmitz, 2009). Stabile Zelllinien bilden immortalisierte Zellen, die häufig aus Tumoren oder embryonalen Geweben gewonnen oder durch virale Transfektion hergestellt werden.

Das von Havemeyer *et al.* (2006) beschriebene N-reduktive molybdänhaltige Enzym-system konnte erstmals aus der porcinen äußeren Mitochondrienmembran isoliert werden. Es ist bekannt, dass das humane Genom für zwei homologe Proteine mARC-1 und mARC-2 kodiert. Sowohl mARC-1 als auch mARC-2 konnten in vielen humanen Geweben durch mRNA-Expressionsanalyse identifiziert werden (Malik *et al.*, 2007, Su *et al.*, 2004). Auffallend hohe mRNA-Expressionslevel konnten für mARC-1 in Adipocyten und für mARC-2 außerdem in der Leber, Schilddrüse und Lunge gezeigt werden (Su *et al.*, 2004). Basierend auf diesen Daten wurden Zellkulturstudien mit verschiedenen humanen Zelllinien (Caco-2 und HEK-293) sowie primären porcinen Zellkulturen (Hepatocyten und Schilddrüsenfolikel) durchgeführt und auf deren N-reduktive Aktivität und mARC-Expression (auf Proteinebene mittels Immunblot-Analyse) hin untersucht (Schwering, 2010). Es konnte sowohl die

Benzamidoxim-Reduktion als auch die mARC-2-Expression für die betrachteten Zellkulturen gezeigt werden.

Für mARC-2, zusammen mit dem Elektronentransportprotein Cytochrom b₅B, wurde kürzlich eine hohe Amidoxim-Reduktase-Aktivität in der äußeren Mitochondrienmembran von Adipocyten der Ratte sowie im murinen Zellsystem mit reifen Adipocyten gezeigt (Neve *et al.*, 2012). Eine Beteiligung des mARC-2-haltigen Enzymsystems an der Lipogenese wird als eine mögliche physiologische Funktion vermutet.

3.2. ZIELSETZUNG

Frühere und auch eigene Arbeiten (siehe Kapitel 2) konnten bereits die durch mARC katalysierte Umsetzung von N-hydroxylierten Fremdstoffen anhand von *in vitro* Experimenten mit dem rekonstituierten humanen rekombinanten Enzymsystem und isolierten subzellulären Fraktionen zeigen (Grünewald *et al.*, 2008, Havemeyer *et al.*, 2010, Kotthaus *et al.*, 2011, Krompholz *et al.*, 2012). Per Microarray durchgeführte mRNA-Expressionsanalysen detektierten eine weite Verbreitung von mARC-1 und mARC-2 im humanen Organismus (Su *et al.*, 2004). Auf Proteinebene beschrieben Krischkowski (Dissertation in Vorbereitung) und Krompholz *et al.* (2012) für isolierte porcine hepatische und extrahepatische Mitochondrienfraktionen hohe N-reduktive Aktivitäten vor allem in der Leber, Niere, Schilddrüse und Pankreas, was mit der mARC-Expression, die durch Western-Blot-Analyse bestätigt wurde, korrelierte. Die vergleichsweise hohe N-reduktive Aktivität in den porcinen Mitochondrien der Bauchspeicheldrüse (siehe Kapitel 2.4.9) sollte anhand von Zellkultur-Experimenten, in Anlehnung an die von Schwering (2010) durchgeführten Versuche, näher charakterisiert werden.

Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit humane adhären-wachsende Krebszelllinien aus dem Pankreas sowie humane Kolon- und Mammakarzinomzelllinien kultiviert und hinsichtlich der *N*-reduktiven Aktivität sowie der mARC-1- und mARC-2-Expression untersucht werden.

Panc-1 ist eine aus einem 56 Jahre alten männlichen Kaukasier gewonnene adhären epitheliale Pankreaskarzinomzelllinie eines Primärtumors. Colo-357 und Panc-89 sind ebenfalls humane Adenokarzinom-Zelllinien aus dem Ductus der Bauchspeicheldrüse, die aus Lymphknotenmetastasen gewonnen wurden (Sipos *et al.*, 2003). Die Zelllinie MCF-7 stammt aus einem Pleuraerguss einer 69 Jahre alten kaukasischen Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom. HT-29 sind humane Kolonadenokarzinomzellen eines 1964 entnommenen Primärtumors einer 44-jährigen Frau.

Es sollten stellvertretend für *N*-hydroxylierte Prodrugs Inkubationen mit dem Modells substrat Benzamidoxim und im Speziellen Studien mit dem in Kapitel 2 beschriebenen Serin-Protease-Inhibitor Upamostat durchgeführt und die mARC-Expression der verwendeten Zelllinien anhand von Immunblot-Analysen mit spezifischen mARC-Antikörpern identifiziert werden.

Bisher ist wenig bekannt über die Unterschiede der mARC-Expression und *N*-reduktiven Aktivität in humanen malignen Geweben. Deshalb sollte in dieser Studie die Aktivierung des Prodrugs Upamostat näher charakterisiert werden. Durch Ermittlung der enzymkinetischen Parameter der *N*-Reduktion sollten die kultivierten Zelllinien hinsichtlich der Prodrug-Aktivierung miteinander verglichen und mögliche Unterschiede aufgezeigt werden.

3.3. METHODEN

3.3.1. Materialien und Geräte

Die humanen Zelllinien Colo-357, Panc-1, Panc-89, HT-29, MCF-7 wurden freundlicherweise vom Arbeitskreis Kalthoff (Institut für Experimentelle Krebsforschung, Abteilung Molekulare Onkologie, UK S-H Campus Kiel) für die Durchführung der Biotransformationsstudien zur Verfügung gestellt. Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293) wurden von der Firma CLS (Cell Lines Service, Eppelheim) bezogen.

Alle weiteren Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit erworben und sind in Kapitel 9 zusammen mit den verwendeten Materialien aufgelistet.

3.3.2. HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Benzamidoxim und Benzamidin

Die Analytik zur Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin wurde in Anlehnung an die validierte Methode von Schwering (2010) mit dem unter Kapitel 2.3.3 beschriebenen HPLC-System durchgeführt. Es wurden folgende Bedingungen zur Chromatographie gewählt:

Stationäre Phase:	Phenomenex Gemini NX C 18 (5 μ m) 150 \times 4 mm (110 \AA), Vorsäule C 18 4 \times 4 mm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg)	
Säulenofentemperatur:	25°C	
Mobile Phase:	50 mM Ammoniumacetat/Methanol 90:10 (v/v)	
Flussrate:	1,0 ml/min, isokratisch	
Laufzeit:	15 min	
Injektionsvolumen:	10 μ l	
Detektion:	UV 229 nm	
Retentionszeiten:	Benzamidin:	4,7 \pm 0,1 min
	Benzamidoxim:	11,0 \pm 0,3 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde zuvor durch Vakuumfiltration durch einen Whatmann[®] Membranfilter 0,45 μ m von Partikeln befreit.

Zur Validierung der HPLC-Methode wurde eine 10-Punkt-Kalibrierung mit dem synthetischen Metaboliten Benzamidin in definierten Konzentrationen im Bereich von 0,5-250 μ M durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungen im Inkubationsmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.3.4) hergestellt und per HPLC analysiert.

3.3.3. Kultivierung humaner Zelllinien

Alle in Kapitel 3.3.1 aufgelisteten humanen Zelllinien wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen von maximal 15 aufeinanderfolgenden Passagen verwendet. Die Zelllinien wurden in 15 ml RPMI 1640 Flüssigmedium mit 2,0 g/l NaCO₃ und unter Zusatz von 10 % FBS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat in 75 cm² Gewebekulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden ca. dreimal pro Woche bei einer Konfluenz von >90 % passagiert, indem diese zunächst mit 5 ml Dulbecco's PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung

abgelöst wurden. Nach dem Zentrifugieren der Zellsuspensionen bei 300 g für 5 min und dem Entfernen des Trypsin-haltigen Mediums erfolgte die Aussaat der Zelllinien im Verhältnis 1:5.

3.3.4. Metabolismusstudien humaner Zelllinien – Bestimmung der N-reduktiven Aktivität

Zur Durchführung der Biotransformationsstudien wurden die Zelllinien (Colo-357, Panc-1, Panc-89, HT-29, MCF-7 und HEK-293) auf 24-Well-Gewebekulturplatten mit einer eingestellten Zellzahl von ca. 1×10^5 Zellen pro ml und Well ausgesät. Drei Tage nach Aussaat der Zellen und einer Konfluenz von ≥ 80 % wurden die Studien wie folgt durchgeführt:

Je Well wurde zweimal mit 1,0 ml Inkubationspuffer (10 mM HEPES in HBSS pH 7,4) gewaschen. Der Versuch wurde mit der Zugabe von 250 μ l substrathaltigem Inkubationspuffer gestartet. Das Inkubationsmedium enthielt je nach zugesetztem Substrat 0,5 mM Upamostat, suspendiert mit 1 % (v/v) absolutem Ethanol zur Löslichkeitsvermittlung oder Benzamidoxim gelöst in den Konzentrationen 0,25, 0,5, 1,0, 6,0 und 10,0 mM. Für jede Zelllinie wurden Vierfachbestimmungen für Benzamidoxim und Fünffachbestimmungen für Upamostat gegen entsprechende Kontrollen ohne Substrat durchgeführt.

Die Platten wurden in einem Platteninkubator bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 120 min wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Metabolitenkonzentration mittels HPLC bestimmt (siehe Kapitel 2.3.3 und 3.3.1).

Anschließend wurde der Zellrasen jedes Wells in $3 \times 0,5$ ml Dulbecco's PBS suspendiert, danach pelletiert (mit 22 000 g 10 min) und das Pellet mit 100 μ l NP-40 Lysispuffer (150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 50 mM Tris pH 8,0 und Complete® Protease

Inhibitor) versetzt. Zur Zellyse wurde das Gemisch eine Stunde bei 4°C geschüttelt und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 11 000 *g* für 2 min entfernt. Der Überstand des Zellysats wurde abgenommen und der Proteingehalt, wie unter 2.3.2.7 beschrieben, mit der BCA-Methode gemäß Herstellervorschrift gegen BSA als Standard bestimmt. Die apparenten enzymkinetischen Parameter K_m und v_{max} wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse mit der wissenschaftlichen Graphik- und Datenanalyse-Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) berechnet.

3.3.5. SDS-PAGE und Immunblot-Analyse

Zur Charakterisierung der mARC-Expression der kultivierten humanen Zelllinien Panc-1, Panc-89, MCF-7, Colo-357, HT-29 und HEK-293 wurden unter den in Kapitel 2.3.2.8 beschriebenen Bedingungen SDS-PAGE mit anschließender immunhistochemischer Färbung mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden pro Bahn jeweils 30 µg Protein des Zellysats auf das Gel geladen. Als Vergleich wurden 0,05 µg rekombinantes humanes mARC-1 und mARC-2 aufgetragen.

3.4. ERGEBNISSE

3.4.1. Quantifizierung von Benzamidin per HPLC

Zur Bestimmung der N-reduktiven Aktivität von humanen Krebszelllinien wurde der durch Inkubation mit dem Modells substrat gebildete Metabolit Benzamidin mit einer im Arbeitskreis etablierten HPLC-Methode quantifiziert (siehe Kapitel 3.3.2). Die Kalibrierung verlief im angegebenen Konzentrationsbereich von 0,5 - 250 μM linear (siehe Abb. 3.4.2).

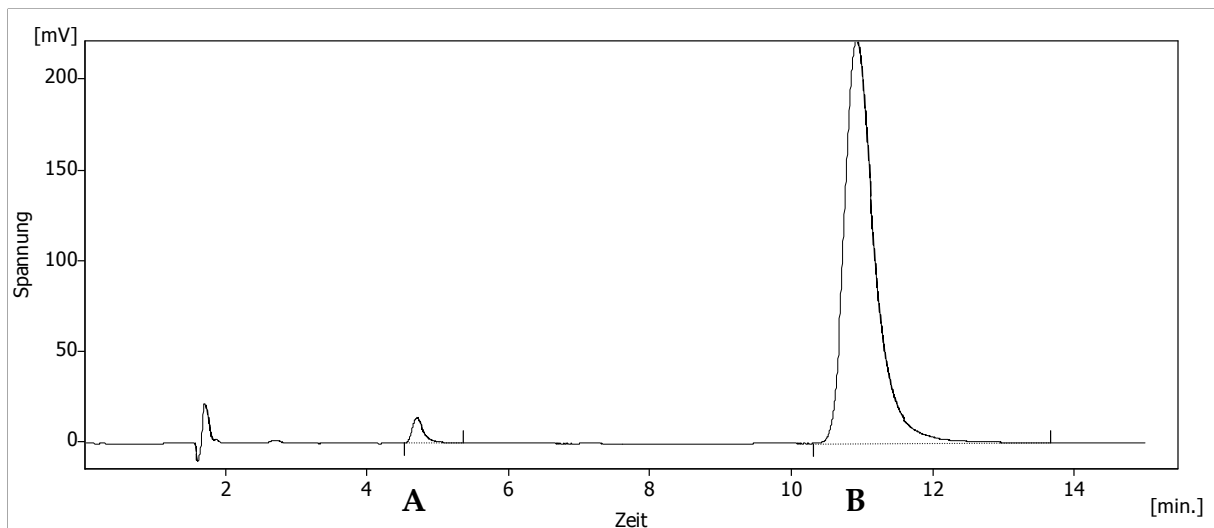


Abb. 3.4.1: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm zur Detektion von Benzamidoxim und Benzamidin.

Dargestellt sind die Peaks des gebildeten Metaboliten Benzamidin (A) durch Inkubation von HEK-293 Zellen mit 2 mM Benzamidoxim (B).

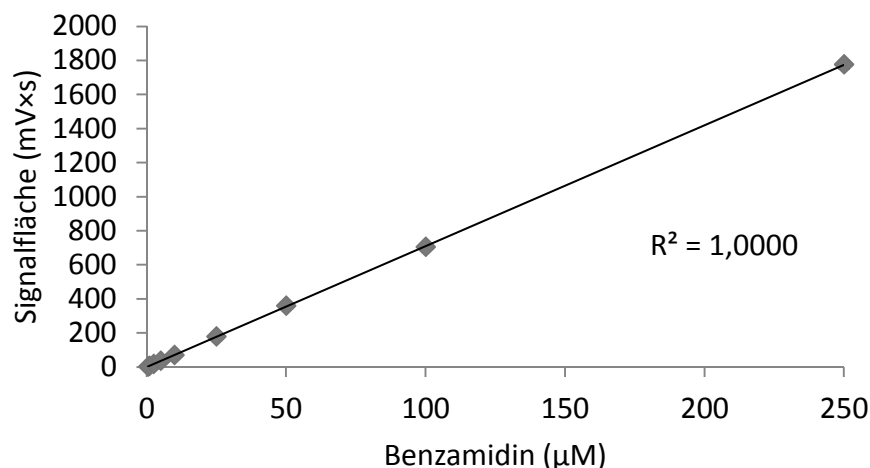


Abb. 3.4.2: Kalibrierung von Benzamidin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der berechneten Signalflächen aus zwei parallel durchgeführten Messreihen, die doppelt vermessen wurden. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression

3.4.2. Amidoximreduktion durch humane Zelllinien

Die Auswertung der Inkubation mit Benzamidoxim als Substrat für die mARC-abhängige N-Reduktion zeigte für die Zelllinien MCF-7, Colo-357 und HT-29 eine von der Substratkonzentration abhängige Umsetzung zum Metaboliten Benzamidin. Die höchsten spezifischen Aktivitäten lieferten die Ergebnisse der Vergleichszelllinie HEK-293, die bereits in vorherigen Untersuchungen vergleichbare N-reduktive Aktivität zeigte (Schwering, 2010). Für die beiden Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und Panc-89 konnten keine Umsetzungsraten detektiert werden. Die Kurvenverläufe der substratabhängigen, enzymatischen Umwandlung des Benzamidoxims mit MCF-7, Colo-357, HT-29 und HEK-293 Zellen sind in Abb. 3.4.3 dargestellt. Die N-Reduktion zum Amidin folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die ermittelten kinetischen Parameter K_m und v_{max} sind in Tab. 3.4.1 dargestellt.

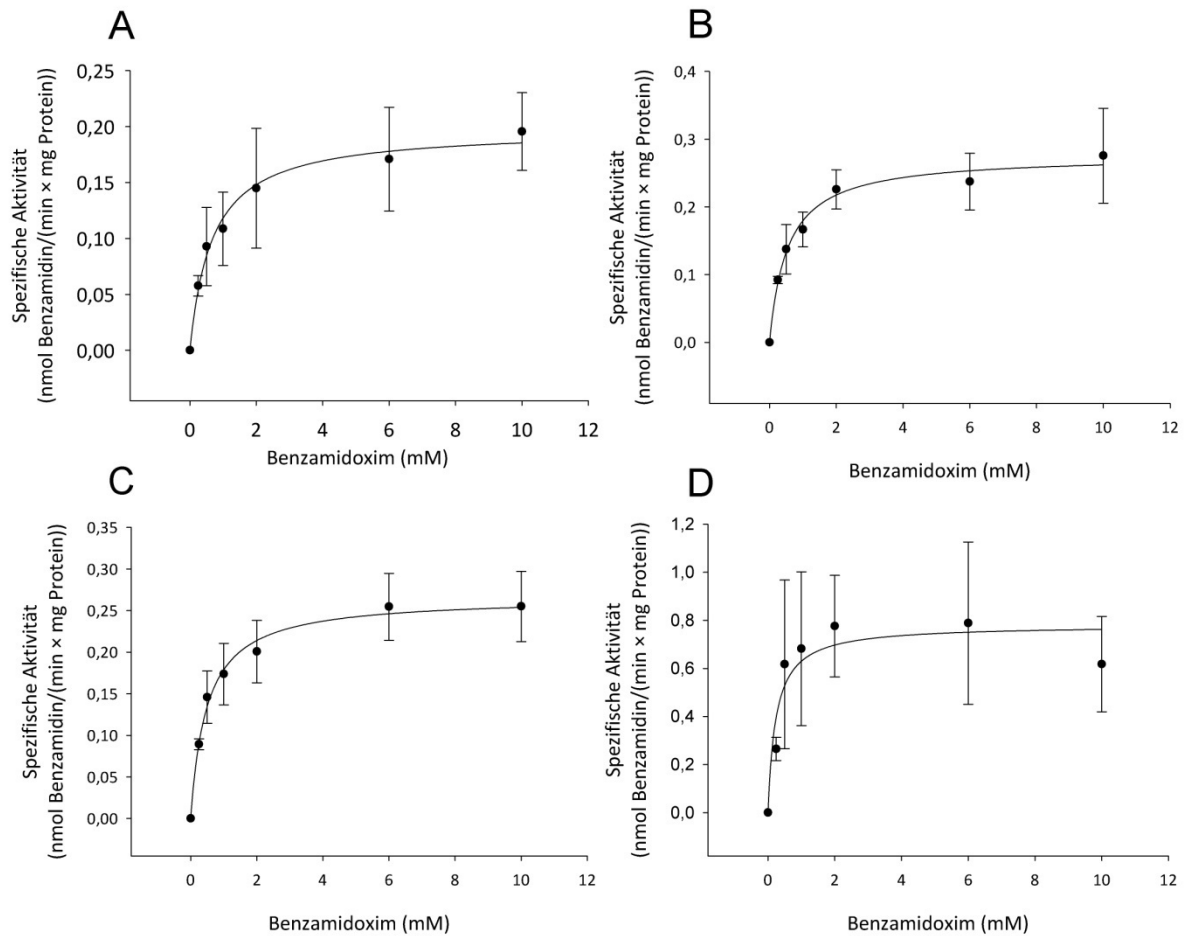


Abb. 3.4.3: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim durch humane Zelllinien: Colo-357 (A), MCF-7 (B), HT-29 (C) und HEK-293 (D)

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Wiederholungen. Die Inkubationsbedingungen und die Durchführung der Experimente sind in Kapitel 3.3.4 beschrieben.

Tab. 3.4.1: Enzymkinetische Parameter der N-reduktiven Umsetzung von Benzamidoxim mit den humanen Zelllinien MCF-7, Colo-357, HEK-293, HT-29, Panc-1 und Panc-89

Zelllinie	K_m (mM)	V_{max} (nmol Benzamidin \times $min^{-1} \times mg^{-1}$)
HEK-293	$0,24 \pm 0,12$	$0,78 \pm 0,08$
HT-29	$0,49 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,01$
MCF-7	$0,54 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,01$
Colo-357	$0,67 \pm 0,10$	$0,20 \pm 0,01$
Panc-1	ND	ND
Panc-89	ND	ND

Dargestellt sind die v_{max} und K_m -Werte aus drei unabhängigen Versuchen an verschiedenen Tagen, die durch Vierfachbestimmung ermittelt wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 3.3.4 beschrieben. Quantifizierungslimit: $0,02 \text{ nmol Benzamidin} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$

ND = nicht detektierbar

Auf die Durchführung der Substratabhängigkeit von Upamostat wurde aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit verzichtet. Die Inkubation mit $0,5 \text{ mM}$ Upamostat suspendiert im Medium lieferte nur für die HEK-293 Zelllinie nachweisbare Metabolitenkonzentrationen. Es konnte eine spezifische Aktivität von $12 \pm 3 \text{ pmol WX-UK1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ bezogen auf das Gesamtprotein ermittelt werden.

3.4.3. Immunblotanalyse zur Identifizierung von mARC

Die mARC-Expression wurde anhand von Westen-Blot-Analysen, wie in Abb. 3.4.4 gezeigt, bestimmt. Dabei konnte mARC in allen Zellen nachgewiesen werden, wobei sich Unterschiede im Expressionsprofil von mARC-1 und mARC-2 zeigten. Für die Pankreaszelllinie Panc-1 konnte kein mARC-1 detektiert werden.

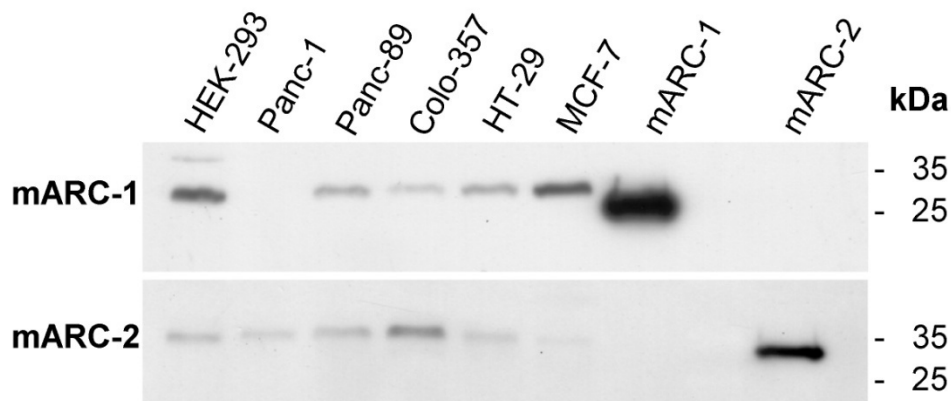


Abb. 3.4.4: Western-Blot-Analyse der mARC-1 und mARC-2-Expression in humanen Zelllinien

Die Durchführung und die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.3.2.8 beschrieben. Aufgetragen wurden je 30 μ g Zellsuspension und 0,05 μ g rekombinantes mARC-1 und mARC-2 als Kontrollen.

3.5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser und auch kürzlich veröffentlichter Untersuchungen konnten bereits die hohe N-reduktive Aktivität und die mARC-Expression unter anderem in isolierten porcinen Mitochondrien der Bauchspeicheldrüse postuliert werden (Krompholz *et al.*, 2012). Für den Einsatz als Serin-Protease-Inhibitor zur Behandlung des Pankreaskarzinoms ist die schnelle metabolische Aktivierung des Prodrugs Upamostat von besonderer Bedeutung. Bisher ist wenig bekannt über die Unterschiede der mARC-Expression und N-reduktiven Aktivität in humanen malignen Geweben. Deshalb wurden stellvertretend für N-hydroxylierte Prodrugs mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim und im Speziellen mit dem Arzneistoff Upamostat Biotransformationsstudien mit verschiedenen humanen Krebszelllinien durchgeführt.

Es konnte in allen untersuchten Zelllinien mindestens eine mARC-Isoform durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen beide mARC-Proteine detektiert werden (Abb. 3.4.4). In weiterführenden Untersuchungen sollten die erzielten Ergebnisse zur mARC-1- und mARC-2-Expression mittels real-time PCR-Analyse quantifiziert werden.

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Upamostats konnten Michaelis-Menten-Konstanten der metabolischen Aktivierung des Amidoxim-Prodrugs durch Biotransformationsassays mit variierenden Konzentrationen nur für das Marker-substrat Benzamidoxim ermittelt werden (Abb. 3.4.3). Mit Ausnahme der Pankreas-krebszelllinien Panc-1 und Panc-89 konnte in allen Zelllinien, einschließlich der Brustkrebs- (MCF-7) und Kolonkarzinomzellen (HT-29), die Amidoxim-Reduktion zum korrespondierenden Amidin detektiert werden. Die bestimmten enzymkinetischen Parameter (K_m und v_{max}) unterschieden sich dabei kaum. Die höchsten Umsetzungsraten wurden in der Nierenzelllinie HEK-293 beobachtet. In weiter-

führenden Studien sollte das Fehlen der N-reduktiven Aktivität in Panc-1 und Panc-89 Zellen weiter untersucht werden. Basierend auf aktuellen und vorhergehenden Ergebnissen ist es wahrscheinlich, dass u.a. die humane mARC-1-Isoform für die N-reduktive Aktivität von besonderer Bedeutung ist. Gen-Knockdown-Experimente mit transfizierter Small interfering RNA (siRNA) gegen mARC-1 und mARC-2 bestätigten einen signifikanten Rückgang der Benzamidoxim-Reduktion bei reduzierter mARC-1-Expression in HEK-293 Zellen. Ein Knockdown des mARC-2-Gens zeigte lediglich einen geringen Einfluss auf die N-reduktive Aktivität (Plitzko, Dissertation in Vorbereitung). Die Isoform mARC-1 konnte nicht in Panc-1 Zellen detektiert werden, was eine mögliche Ursache der Inaktivität dieser Zelllinie gegenüber der Amidoxim-Reduktion ist.

Zellkulturexperimente stellen ein geeignetes *in vitro* Testsystem dar, um in weiteren Studien die bisher unbekannt physiologische Funktion des mARC-abhängigen reduktiven Enzymsystems aufzuklären.

4. BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN VON OXIMEN

4.1. EINLEITUNG

Oxime gehören zur Stoffklasse *N*-hydroxylierter Verbindungen. Durch Umsetzung mit Hydroxylamin können diese aus Aldehyden und Ketonen synthetisiert werden und bilden Aldoxime bzw. Ketoxime.

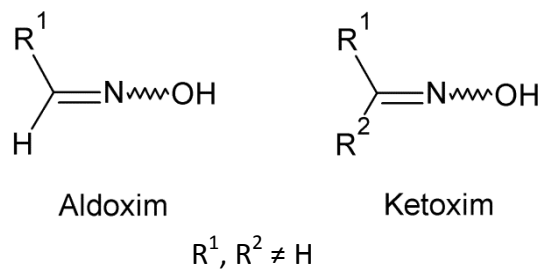


Abb. 4.1.1: Strukturunterschiede von Aldoximen und Ketoximen

Oxime und Oximderivate sind häufige Intermediate u.a. in Stoffwechselprozessen von Tieren und Pflanzen (Hucker *et al.*, 1971, Lin und Cashman, 1997, Zhao, 2010) und bilden ein wichtiges Strukturmotiv in Arzneistoffen und bioaktiven Substanzen. Zahlreiche Verbindungen mit Oximen, Oximethern oder Oximestern als funktionelle Gruppen befinden sich in der klinischen Entwicklung oder wurden bereits zugelassen (Bergström *et al.*, 2008, Rad *et al.*, 2010).

Eine bekannte Gruppe von Arzneistoffen zur Behandlung von Vergiftungen mit Phosphorsäureestern aus Pflanzenschutzmitteln (z.B. Parathion, Chlorpyrifos) und chemischen Kampfstoffen (z.B. Sarin, Soman, Tabun) bilden die Oxime Pralidoxim, Obidoxim bzw. Neuentwicklungen wie MMB-4 und HI-6 (Kalisiak *et al.*, 2011). Diese Antidote fungieren als Reaktivatoren der Acetylcholinesterase und können deren

durch Phosphorylierung hervorgerufene Hemmung teilweise aufheben (Mutschler *et al.*, 2008).

Weitere Beispiele von Oximen als funktionelle Gruppe in Arzneistoffkandidaten finden sich u.a. in der Krebstherapie. Zu den Inhibitoren des JAK-STAT-Signalwegs (cytoplasmatische Tyrosinkinasen) zählen Indirubin-Derivate wie das 6-Bromindirubin-3'-oxim, dem eine Beteiligung an der Apoptose-Induzierung humaner Melanomzellen und damit an der Unterdrückung des Krebszellwachstums zugesprochen wird (Liu *et al.*, 2011).

Von pharmakologischem Interesse sind auch Arzneistoffe mit entzündungshemmender und antiallergener Wirkung. Studien zeigten, dass die Oxime 4'-Piperidinoacetophenonoxim und 4'-Morpholinoacetophenonoxim potentielle Cyclooxygenase-Inhibitoren sind (Kataoka *et al.*, 2002).

Olesoxim ist ein Cholesterin-ähnliches potenzielles Neuroprotektivum, das zur Behandlung von amyotropher Lateralsklerose (ALS) entwickelt wurde. ALS ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, bei der es zum Untergang von kortikalen und spinalen motorischen Neuronen kommt und für die es bisher keine effektive Behandlung gibt (Bordet *et al.*, 2007). In präklinischen Studien konnte das Überleben der motorischen Neuronen gefördert und dessen induzierter Zelltod verhindert werden. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zu Phase III Studien zeigten jedoch im Vergleich zur Placebo-Einnahme keine Verlängerung der Überlebenschance bei Patienten mit ALS. Zurzeit befindet sich Olesoxim in Phase III der klinischen Prüfung zur Behandlung der spinalen Muskelatrophie, einer weiteren neurodegenerativen Erkrankung.

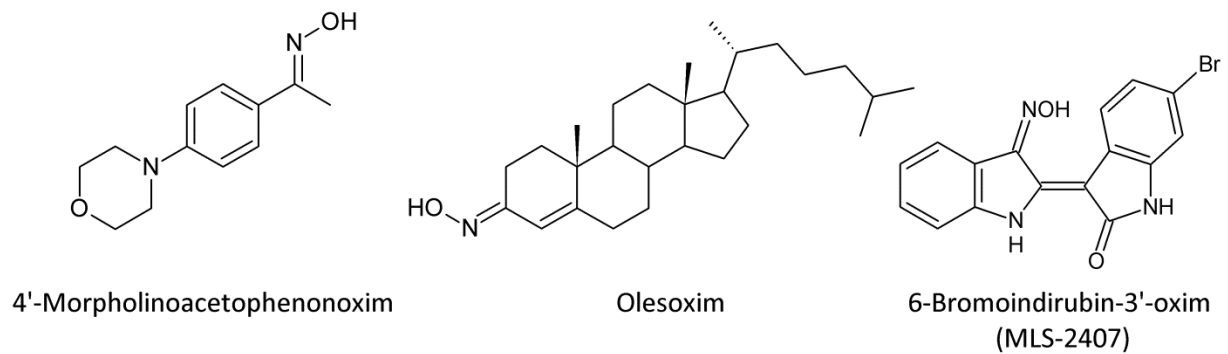


Abb. 4.1.2: Beispiele potentieller Arzneistoffe mit *N*-Oximen als funktionelle Gruppe.

Oxime spielen nicht nur in der Entwicklung neuer Wirkstoffe pharmakologisch eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Biotransformation von chemischen Fremdstoffen, wie z.B. Nahrungsmittelzusätze und Kosmetika. Die häufig durch CYP 450 Enzyme vermittelte Aktivierung von Oximen kann unter bestimmten Umständen auf der Haut zu einer allergischen Kontaktdermatitis führen, wenn sie als Prohaptene vorliegen (Bergström *et al.*, 2008, Mutlib *et al.*, 2002). Bergström *et al.* (2008) untersuchten das stark sensibilisierende Potential der metabolischen Aktivierung des α,β -ungesättigten Prohaptens *R*-Carvoxim und postulierten folgenden Mechanismus:

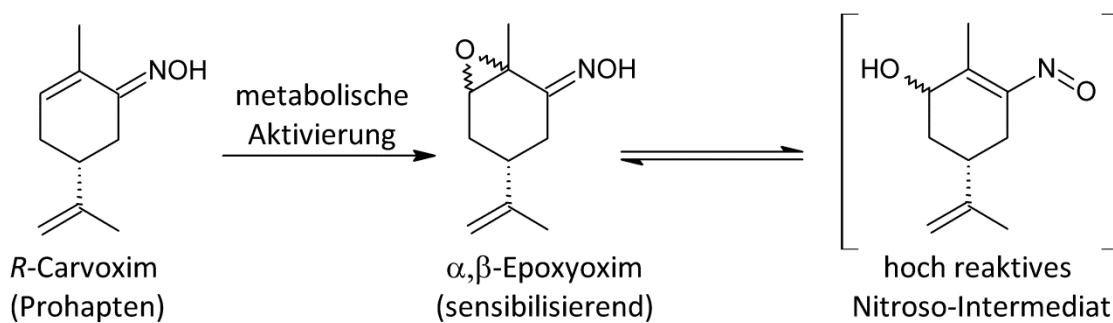


Abb. 4.1.3: Postulierter Mechanismus der kutanen metabolischen Aktivierung des Kontaktallergens *R*-Carvoxims (nach Bergström *et al.*, 2008).

Die Bioaktivierung des *R*-Carvoxims zum sensibilisierenden α,β -Epoxyoxim erfolgt dabei vorwiegend durch die Isoenzyme CYP 1A1 und 1B1. Anschließend kann das

entstandene α,β -Epoxyoxim durch Tautomerisierung zu hoch reaktiven Nitroso-Intermediaten umgewandelt werden. Die entstandenen reaktiven Verbindungen führen in der Haut durch die Bindung an körpereigene Proteine zur Sensibilisierung und damit zur Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten, die eine Kontaktdermatitis auslösen (Mutschler *et al.*, 2008, Ott *et al.*, 2009).

Der Metabolismus von Oximen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Bildung von Oximen als Intermediate durch enzymatische *N*-Oxygenierung primärer aliphatischer Amine wurde bereits 1971 von Hucker beschrieben, nachdem Axelrod (1955) die Umsetzung des Amphetamins zum Phenylaceton durch Kaninchenlebermikrosomen beobachten konnte (Hucker, 1973, Hucker *et al.*, 1971). Parli *et al.* (1971) postulierten anhand von Studien mit dem Isotop ^{18}O die Oxidation von Amphetamin durch Kaninchenleber-Oxygenase. Dabei beschrieben sie die Bildung eines Carbinolamins, das im ersten Schritt durch Hydroxylierung als wichtigstes Intermediat entsteht. Ausgehend von Carbinolamin folgt in einem zweiten Schritt zum einen die Reaktion zum Keton durch direkte Ammoniakabspaltung und zum anderen die Phenylacetoximbildung durch Dehydratation zum Imin, als ein Zwischenprodukt, und anschließender Oxygenierung (Parli *et al.*, 1971b). Anhand von weiteren Experimenten bestätigten Parli *et al.* (1971) die Oximbildung durch enzymatische *N*-Hydroxylierung von Iminen. Das stabile Imin 2,4,6-Trimethylacetophenonimin galt dabei als Modells substrat für die durch mikrosomale Ratten- und Kaninchenleberfraktionen katalysierte CYP 450-abhängige Reaktion zum 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim, wobei bevorzugt das (*E*)-Isomer gebildet wurde (siehe Abb. 4.1.4). Die enzymatische *N*-Hydroxylierung von Iminen zu deren korrespondierenden Oximen wurde durch die Ergebnisse von Gorrod und Christou (1986) bekräftigt. Durch spektroskopische Untersuchungen mit einer Reihe von stabilen, substituierten Acetophenonimininen zeigten sie durch Inkubation mit mikrosomalen Leberpräparationen verschiedener Spezies die enzymatische Bildung von Oximen. Beide Isoformen der gebildeten

Oxime konnten detektiert werden, wobei bei allen untersuchten Spezies das (*E*)-Isomer überwog (Gorrod und Christou, 1986).

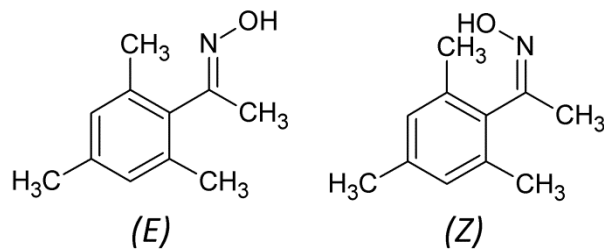


Abb. 4.1.4: (*E*)- und (*Z*)-Isomer des 2,4,6-Trimethylacetophenonoxims

Lin und Cashman (1997) untersuchten die Detoxifikation des biogenen Amins Tyramin und konnten die stereoselektive Bildung des korrespondierenden (*E*)-Oxims durch Inkubation mit porcinen und humanen Lebermikrosomen beobachten. Hemmstudien zeigten eine NADPH-abhängige Beteiligung von flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO) und CYP 450-Enzymen an der *N*-Oxygenierung des Amins, bei der zuerst Hydroxylamin als Intermediat gebildet wird und in einem zweiten Schritt das Di-*N*-Hydroxylamin entsteht, welches spontan zum (*E*)-Oxim dehydratisiert. Eine Nebenreaktion, bei der durch C-Oxidation am β -C-Atom des Tyramins 4-Hydroxybenzaldehyd entsteht, konnte ebenfalls gezeigt werden (Lin und Cashman, 1997).

Die enzymatische Reduktion von Oximen ist im Vergleich zu deren Bildung durch *N*-Oxygenierung von Aminen oder Iminen weniger gut erforscht. *In vivo* Toxizitätsstudien an Ratten zeigten, dass Cyclohexanonoxim, ein Intermediat, das in der Synthese von Polycaprolactam eingesetzt wird, schnell vom Organismus absorbiert und innerhalb kürzester Zeit zu Cyclohexanon hydrolysiert und anschließend zu Cyclohexanol reduziert wird (Parmar und Burka, 1991). Anhand von *in vitro* Biotransformationsstudien wurde gezeigt, dass Acetophenonoxim sehr langsam durch anaerobe Inkubation mit Rattenleberhomogenat und -cytosol NADPH-abhängig zum korrespondierenden Hydroxylamin reduziert wird (Hes und Sternson, 1974).

Tatsumi und Ishigai (1987) konnten die hepatische Aldehydoxidase als verantwortliches Enzym für die Reduktion der Substrate Acetophenonoxim, Salicylaldoxim und Campheroxim identifizieren. Zusammen mit dem Elektronendonator setzt die Aldehydoxidase Acetophenonoxim und Salicylaldoxim unter anaeroben Bedingungen enzymatisch durch Rattenlebercytosol zu den jeweiligen Oxoverbindungen um. Für Campheroxim dagegen konnte erstmals sowohl die Bildung der korrespondierenden Oxokomponente Campher als auch das Ketimin Campherimin detektiert werden (Tatsumi und Ishigai, 1987).

Boucher *et al.* (1994) postulierten erstmals eine CYP 450-abhängige Isomeren-selektive Dehydratation von Alkyl- und Arylaldoximen. Durch Inkubation mit Rattenlebermikrosomen in Gegenwart von NADPH oder Dithionit erfolgte die Umsetzung des (*Z*)-Isomers des Benzaloxims und 4-(Hexyloxy)benzaloxims zu den korrespondierenden Nitrilen. Eine Beteiligung des (*E*)-Isomers an der Reaktion zum Nitril konnte nur in sehr geringem Ausmaß beobachtet werden (Boucher *et al.*, 1994). Es wurde vermutet, dass (*Z*)-Isomere des Aldoxims einen Komplex mit dem Häm-Eisen des Cytochroms eingehen können, während (*E*)-Isomere und Ketoxime aufgrund sterischer Hinderung nicht mit dem Enzym interagieren.

4.2. ZIELSETZUNG

Die Reduktion von Oximen durch das rekombinante mARC-haltige humane Enzymsystem sollte im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Heberling *et al.* (2006) konnte bereits durch *in vitro* Studien die sauerstoffunabhängige enzymatische Reduktion von Oximen zu Iminen zeigen. Die meisten Imine unterliegen in wässriger Lösung leicht der Hydrolyse und werden, vor allem wenn sie unsubstituiert vorliegen, in ihre korrespondierenden Ketone (aus Ketiminen) oder Aldehyde (aus Aldiminen) überführt und lassen sich somit nicht isolieren (Eckardt, 2001, Kalia und Raines, 2008). Für das 2,4,6-Trimethylacetophenonimin dagegen konnte die Hydrolysestabilität in wässriger Lösung gezeigt werden (Parli *et al.*, 1971a). Erstmals konnte Heberling *et al.* (2006) durch aerobe und anaerobe Inkubationen mit porcinen und humanen subzellulären Leberfraktionen die enzymatische Reduktion des 2,4,6-Trimethylacetophenonoxims durch Detektion des gebildeten stabilen 2,4,6-Trimethylacetophenonimins bestätigen. Die gezeigte Reaktion verlief sauerstoffunabhängig und NADH-abhängig bevorzugt in Mitochondrien, wobei das (*E*)-Isomer das bessere Substrat lieferte (Heberling, 2004).

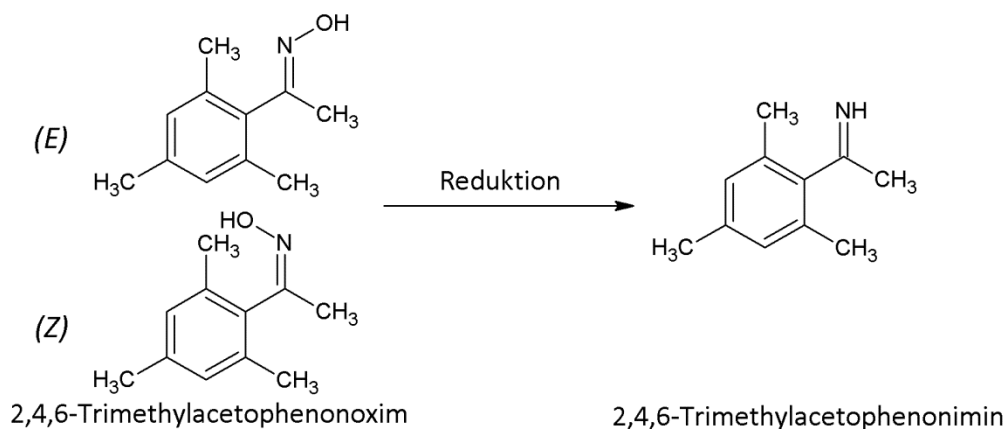


Abb. 4.2.1: N-Reduktion der (*E*)- und (*Z*)-Isomere des 2,4,6-Trimethylacetophenonoxims zum korrespondierendem Imin (Heberling, 2004)

Die von Heberling (2004) erhobenen Daten geben einen ersten Hinweis darauf, dass Oxime Substrate des von Havemeyer (2006) vollständig identifizierten *N*-reduktiven molybdänhaltigen Enzymsystems sind. In der vorliegenden Arbeit sollte aufbauend auf den Untersuchungen von Heberling (2004) die Reduktion von Oximen durch das mARC-Enzym anhand der isomeren Formen des Modellsubstrats (*E*)- und (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim näher untersucht werden.

Zunächst sollten die bereits beschriebenen Ergebnisse der *N*-Reduktion des 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim anhand von aeroben *in vitro* Studien mit porcinen subzellulären Leberfraktionen reproduziert und durch Inkubationen extrahepatischer Gewebe ergänzt werden. Im Anschluss daran sollten Untersuchungen mit dem rekonstituierten Enzymsystem bestehend aus den humanen rekombinanten Proteinen Cyt b₅, deren Reduktase und mARC durchgeführt werden, um deren Beteiligung an der Reduktion von Oximen zu klären. Dabei sollten ebenfalls mögliche Unterschiede zwischen dem rekombinanten humanen Enzymsystem und den nativen Proteinen durch Inkubation mit den isomeren Formen des Oxims untersucht werden.

4.3. METHODEN

4.3.1. Materialien und Geräte

(*E,Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim bzw. dessen gereinigte Isomere sowie der Metabolit 2,4,6-Trimethylacetophenonimin wurden von Heberling synthetisiert und standen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Testungen zur Verfügung. 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim wurde durch Umsetzung von 2,4,6-Trimethylacetophenon mit Hydroxylaminhydrochlorid in wasserfreiem Pyridin in Anlehnung an die Methoden von Hauser und Hoffenberg (1955) und Greer und Pearson (1955) gewonnen. Die Isolierung der reinen (*E*)- und (*Z*)-Isomeren erfolgte mittels säulenchromatographischer Trennung. 2,4,6-Trimethylacetophenonimin wurde nach einem von Pickard und Tolbert (1961) beschriebenen Verfahren durch Umsetzung von 2,4,6-Trimethylbenzonnitril mit Methylmagnesiumiodid in einer Grignard-Reaktion synthetisiert (Heberling *et al.*, 2006).

Alle weiteren Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen und sind in Kapitel 9 zusammen mit den verwendeten Materialien aufgelistet.

4.3.2. Proteinquellen

Für die *in vitro* Biotransformationsstudien wurden sowohl rekombinante humane Proteine des Dreikomponentenenzymystems mit mARC, Cyt b₅ und der NADH Cyt b₅R als auch isolierte subzelluläre Fraktionen aus porcinen Organen verwendet. Die Gewinnung und Charakterisierung der Enzymquellen ist in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Die Untersuchungen erfolgten mit einheitlichen mARC-Enzymchargen. Die subzellulären Fraktionen stammten aus verschiedenen Aufreinigungen.

4.3.3. HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von (E)- und (Z)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim und dessen Imin

Die Analytik zur Trennung und Quantifizierung von (E)- und (Z)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim und dessen Metaboliten 2,4,6-Trimethylacetophenonimin wurde mit dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenen HPLC-System durchgeführt. Es wurden folgende Bedingungen zur Trennung mittels Ionenpaarchromatographie gewählt:

Stationäre Phase:	LiChrochart® 250 × 4 mm LiChrospher 60, RP-select B (5 µm) mit Vorsäule RP-select B 4 × 4 mm (Merck KGaA, Darmstadt)
Säulenofentemperatur:	25°C
Mobile Phase:	10 mM Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> pH 3,0 (eingestellt mit 10 %iger (m/v) HCl-Lösung)/ Acetonitril 72:28 (v/v)
Flussrate:	1,0 ml/min, isokratisch
Laufzeit:	20 min
Injektionsvolumen:	10 µl
Detektion:	UV 210 nm
Retentionszeiten:	2,4,6-Trimethylacetophenonimin: 8,6 ± 0,1 min (Z)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim: 15,8 ± 0,1 min (E)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim: 16,6 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde zuvor durch Vakuumfiltration durch einen 0,45 µm Whatmann® Membranfilter von Partikeln befreit.

Die Kalibrierung der HPLC-Analytik erfolgte mit dem synthetischen Metaboliten 2,4,6-Trimethylacetophenonimin in definierten Konzentrationen von 0,1 - 150 µM. Dazu wurde dieser im Fließmittel gelöst, mit gleichen Teilen Acetonitril zu einem Gesamtvolumen von 300 µl versetzt und direkt vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde ebenfalls der Konzentrationsbereich der Kalibrierung von 0,1 -150 μM verwendet. 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim wurde in den entsprechenden Verdünnungen in *Aqua bidest.* gelöst und mit 20 mM MES-Puffer pH 6,0 und 50 μg denaturierten Schweinelebermitochondrien versetzt. Als Substrat wurden je 3,0 mM (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim zum Inkubationsansatz hinzugefügt, das zuvor in *Aqua bidest.* gelöst und mit 10 % DMSO als Lösungsvermittler versetzt wurde. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 150 μl . Nach 23 min aerober Inkubation im 37°C warmen Schüttelwasserbad wurden die Reaktionen mit je 150 μl eisgekühltem Acetonitril abgestoppt, die Proben 5 min geschüttelt und anschließend bei 22 000 g weitere 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC direkt vermessen.

Das Substrat (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim wurde zur Quantifizierung im Konzentrationsbereich von 5 bis 5×10^3 μM in DMSO und *Aqua bidest.* 1:1 (v/v) gelöst und per HPLC vermessen.

4.3.4. Löslichkeit und Stabilität von 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim

Zur Bestimmung der Löslichkeit von 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim wurden gesättigte Lösungen vom (*E*)-Isomer in *Aqua bidest.*, in 100 mM Kaliumphosphatpuffer und 20 mM MES-Puffer pH 6,0 hergestellt und 30 min geschüttelt. Anschließend wurden die ungelösten Bestandteile durch Zentrifugation (10 min bei 22 000 g) abgetrennt. Die Überstände wurden sofort und nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur per HPLC vermessen.

4.3.5. Zusammensetzung der *in vitro* Biotransformationsansätze

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen im 37°C Schüttelwasserbad in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 3,0 mM des Substrats (*E*)- bzw. (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim und 1,0 mM NADH in einem Gesamtvolumen von 150 µl. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde das Substrat zuvor in DMSO gelöst und anschließend mit Puffer verdünnt. Die DMSO-Konzentration im Inkubationsansatz betrug 3 %. Für Inkubationen mit subzellulären Fraktionen wurde 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 und für Inkubationen mit rekonstituierten rekombinanten Enzymen 20 mM MES-Puffer pH 6,0 verwendet. Nach einer Vorinkubationszeit von 3 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrats NADH gestartet. Die Inkubation wurde nach 15 min durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Acetonitril abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 22 000 g für 5 min sedimentiert und der Überstand per HPLC analysiert.

Als Enzymquellen wurden je nach Inkubationsansatz Mitochondrien aus unterschiedlichen isolierten porcinen Organen (je 10 µg aus Schilddrüse, 50 µg aus Leber, Niere, Herz, Dickdarm, Pankreas, 100 µg aus Lunge, Gehirn, Dünndarm), 50 µg Mikrosomen, Cytosol und die Fraktion des postnuklearen Überstandes aus der Leber verwendet. Die Inkubationsansätze mit rekombinanten humanen Enzymen bestanden aus 7,0 µg mARC-1 (120 pmol Mo) oder 7,0 µg mARC-2 (105 pmol Mo), 75 pmol Häm (Cyt b₅) und 7,5 pmol FAD (NADH Cyt b₅R Isoform 2).

4.3.5.1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Zur Ermittlung des linearen Bereichs der *N*-Reduktion von 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim zu 2,4,6-Trimethylacetophenonimin wurden die Umsetzungsraten in Abhängigkeit von der Zeit exemplarisch für porcine Schweinelebermitochondrien bestimmt.

Die Inkubationsansätze enthielten 50 µg isolierte porcine Lebermitochondrien verdünnt in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Jedem Ansatz wurden 1,0 mM (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim hinzugefügt. Die Durchführung der Inkubation sowie die anschließende Aufarbeitung der Proben erfolgte wie zuvor in Kapitel 4.3.5 beschrieben. Die Inkubationszeit variierte im Bereich von 5 – 120 min.

4.3.5.2. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Es wurden Studien zur Bestimmung der Substratabhängigkeit mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen sowie anhand des humanen rekombinanten Enzymsystems mit den unter 4.3.5 beschriebenen optimierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim wurde in Konzentrationen von 0,1 - 3,0 mM den Inkubationsansätzen zugesetzt. Als Proteinquellen wurden zum einen 10 µg porcine Lebermitochondrien und zum anderen 3,5 µg rekombinantes humanes mARC-1 (entsprechend 60 pmol Mo) bzw. mARC-2 (entsprechend 50 pmol Mo) zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cyt b_5 (37,5 pmol Häm) und NADH Cyt b_5 R (3,75 pmol FAD) eingesetzt.

4.4. ERGEBNISSE

4.4.1. Kalibrierung und Wiederfindung

Das Beispielchromatogramm der in Kapitel 4.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik zur Quantifizierung von 2,4,6-Trimethylacetophenonimin zeigt die Detektion vom (E)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim bei einer Retentionszeit von 16,6 min. Der Metabolit 2,4,6-Trimethylacetophenonimin konnte bei 8,6 min detektiert werden. Das (Z)-Isomer des Oxims wird bei einer Retentionszeit von 15,8 min getrennt vom (E)-Isomer detektiert.

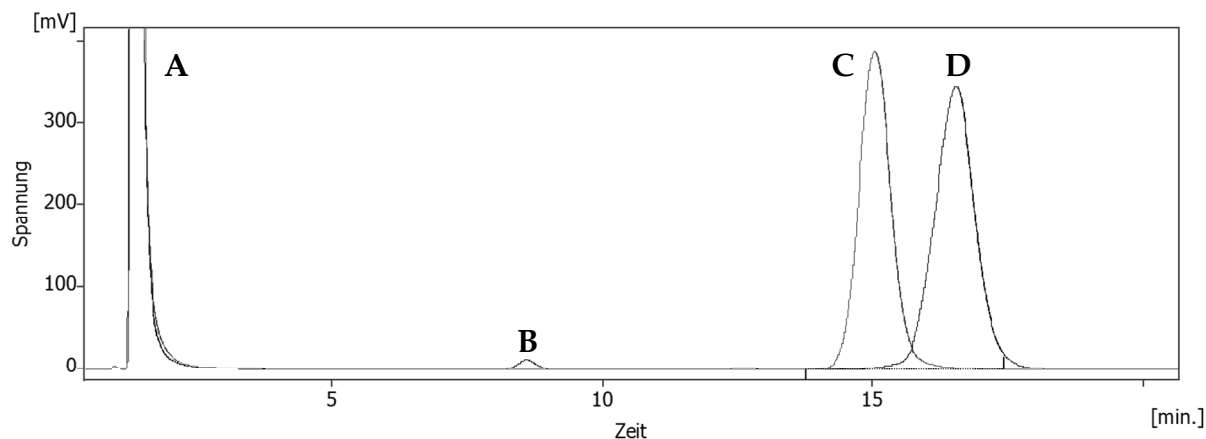


Abb. 4.4.1: Repräsentative HPLC-Chromatogramme zur Detektion von (E)- und (Z)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim und 2,4,6-Trimethylacetophenonimin

Dargestellt ist das Chromatogramm der Wiederfindung von 50 μM 2,4,6-Trimethylacetophenonimin (B) im Inkubationsansatz mit 3 mM (E)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim (D) in 3 % DMSO (A) sowie des Substrats 3 mM (Z)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim (C).

Die Auswertung der Kalibrierung (Abb. 4.4.2) zeigt, dass die berechnete Kalibriergerade von 2,4,6-Trimethylacetophenonimin im angegebenen Konzentrationsbereich von 0,1-150 μM mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9997$ linear verläuft.

Die Wiederfindungsgerade verlief ebenfalls linear mit einem berechneten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9997$ und einer Wiederfindungsrate von durchschnittlich $100,7 \pm 3,4 \%$ im Messbereich von $0,5\text{--}150 \mu\text{M}$. Es konnte eine Nachweisgrenze von $\leq 0,1 \mu\text{M}$ und eine Bestimmungsgrenze von $0,3 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

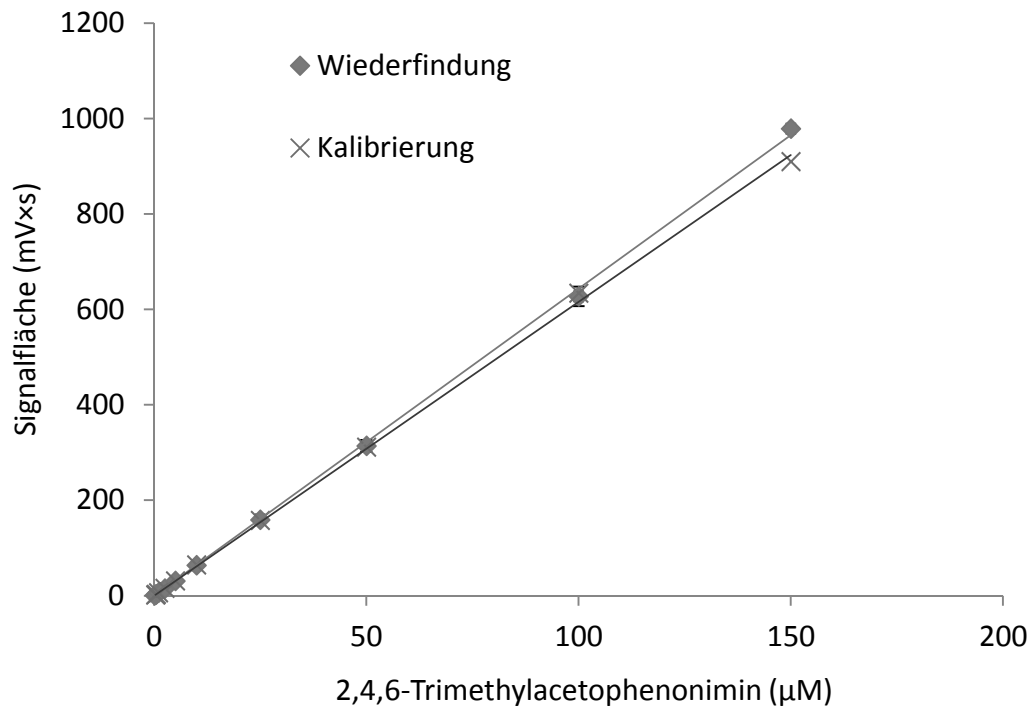


Abb. 4.4.2: Kalibrierung und Wiederfindung von 2,4,6-Trimethylacetophenonimin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der berechneten Signalflächen aus zwei parallel durchgeführten Messreihen, die doppelt vermessen wurden.

Die Kalibrierung von (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim verlief im Konzentrationsbereich von $5 - 5 \times 10^3 \mu\text{M}$ linear. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von $r = 1,0000$ bestimmt.

4.4.2. N-Reduktion durch isolierte porcine subzelluläre Fraktionen

4.4.2.1. Bestimmung der Substratlöslichkeit und -stabilität

Es konnte eine maximale Löslichkeit des (*E*)-Isomers von ca. 1,4 mM und des (*Z*)-Isomers von ca. 2,3 mM in Wasser bestimmt werden. Die Löslichkeit des Substrats bei pH 6,0 in den zur Inkubation verwendeten Puffern ist vergleichbar. Sowohl (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim als auch dessen Metabolit 2,4,6-Trimethylacetophenonimin waren über den gesamten Messzeitraum in Lösung stabil. Eine Vermessung der Proben nach 24-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur zeigte keine Veränderungen der Konzentrationen. In Abb. 4.4.3 ist die Löslichkeit und Stabilität stellvertretend für das (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim gezeigt. Die von Heberling (2004) gezeigte Substratstabilität gegenüber Hydrolyse konnte bestätigt werden.

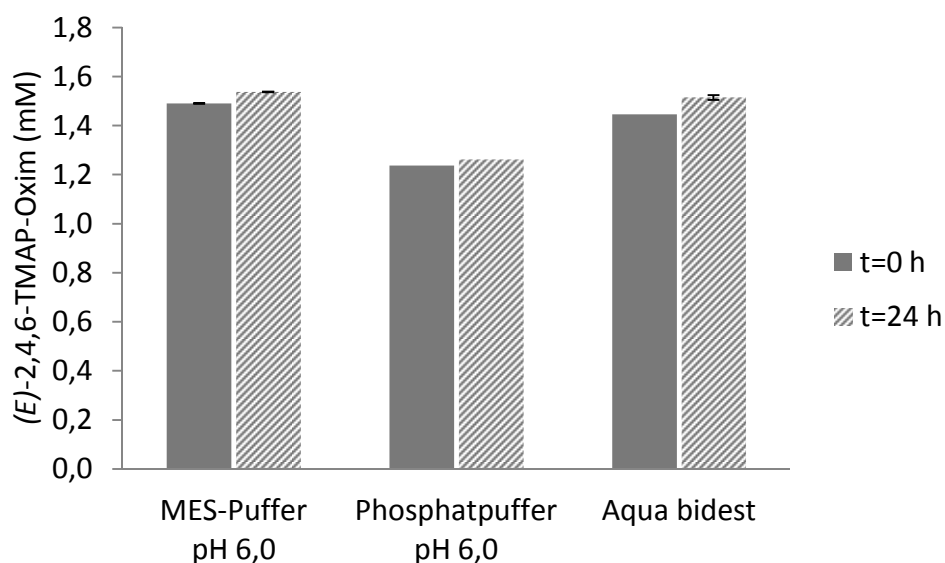


Abb. 4.4.3: Löslichkeit und Stabilität von (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der Oximkonzentrationen aus zwei parallel durchgeführten Messreihen, die sofort ($t = 0$ h) und nach jeweils 24 h bei Raumtemperatur doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.4 beschrieben.

4.4.2.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Reduktion

Zur Ermittlung des linearen Bereiches der *N*-Reduktion von 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim zu 2,4,6-Trimethylacetophenonimin wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Da das (*Z*)-Isomer als Substrat nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurde die Zeitabhängigkeit exemplarisch für das (*E*)-Isomer durchgeführt.

Wie aus Abb. 4.4.4 hervorgeht verliefen diese im Bereich von 5 - 30 min linear. Die graphische Darstellung zeigt die Iminbildung in einem Inkubationszeitraum von 5 - 120 min mit isolierten porcinen Lebermitochondrien als Proteinquelle.

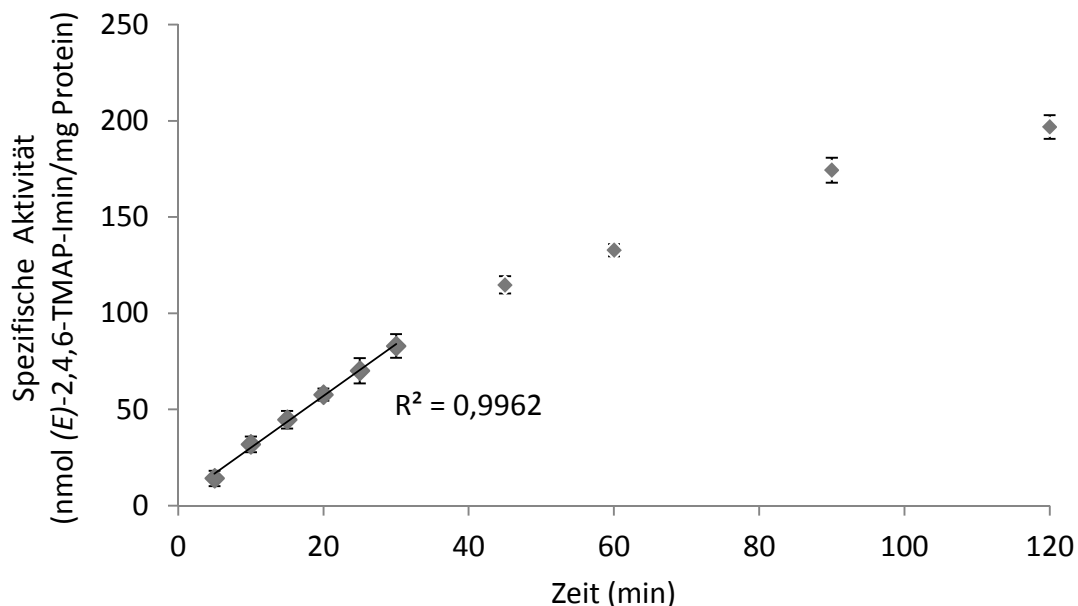


Abb. 4.4.4: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim mit porcinen Lebermitochondrien

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.5.1 beschrieben.

Für alle weiteren Inkubationen wurde eine optimierte Inkubationszeit von 15 min gewählt. Nach dieser Reaktionszeit wurde das Substrat in ausreichend großem Maße enzymatisch umgesetzt, sodass eine valide Quantifizierung des Metaboliten 2,4,6-Trimethylacetophenonimin möglich war.

4.4.2.3. Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen

Die Inkubation wurde unter den in Kapitel 4.3.5 beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt und vermessen. Die Abb. 4.4.5 zeigt die Umsetzungsgeschwindigkeit von (*E*)- und (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim zum korrespondierenden Imin durch Inkubation mit Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol und dem postnuklearen Überstand aus Schweineleber.

Die größte Umsetzungsgeschwindigkeit wurde in den Mitochondrien gemessen. Im Vergleich zur Umsetzung mit SL-PNS konnte dort eine fünffache Anreicherung der Aktivität ermittelt werden. Die mikrosomale Fraktion zeigt dagegen eine etwa 2,5-fach geringere spezifische Aktivität im Vergleich zur Inkubation mit Mitochondrien. Eine Umsetzung der Substrate durch cytosolische Enzyme findet nur in einem sehr geringen Ausmaß statt.

Der Vergleich der Umsetzungsraten beider Substrate zeigte, dass das (*E*)-Isomer bevorzugt gegenüber dem (*Z*)-Isomer zum Imin durch porcine subzelluläre Leberfraktionen reduziert wurde.

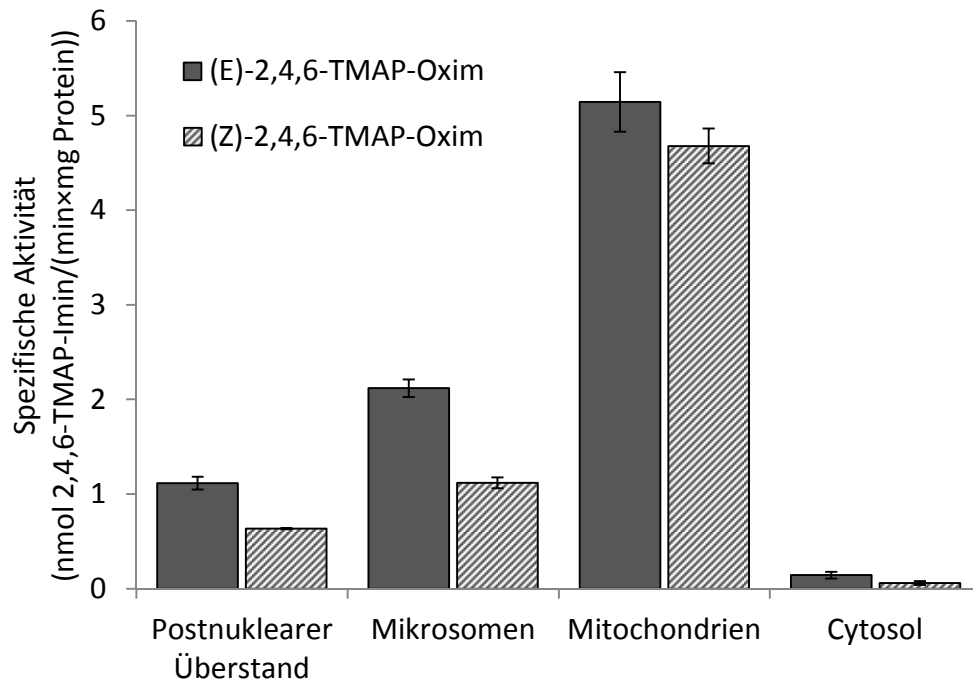


Abb. 4.4.5: Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

4.4.2.4. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Es wurden Studien zur Bestimmung der Substratabhängigkeit mit isolierten porcinen Lebermitochondrien exemplarisch für (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim unter den zuvor beschriebenen optimierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. Die Abb. 4.4.6 zeigt, dass die Umsetzung von (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim substratabhängig einer enzymatisch katalysierten Reaktion nach Michaelis-Menten folgt, sodass deren enzymkinetische Parameter bestimmt werden konnten. Es wurde eine maximale Umsetzungsgeschwindigkeit zum Imin (v_{\max}) von $3,7 \pm 0,3 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$ und ein K_m -Wert von $0,75 \pm 0,20 \text{ mM}$ ermittelt.

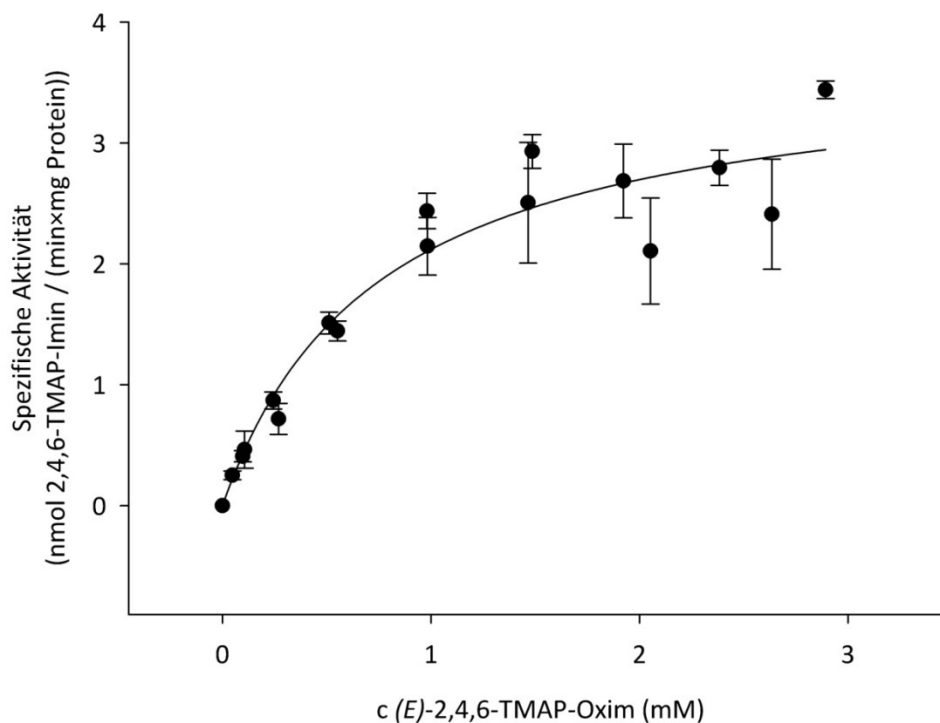


Abb. 4.4.6: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim mit porcinen Lebermitochondrien

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei Messreihen mit zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden ($n=4$). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.5.2 beschrieben.

4.4.2.5. Vergleich der N-reduktiven Aktivität in isolierten hepatischen und extrahepatischen porcinen subzellulären Organfraktionen

Die Inkubation mit Mitochondrien aus verschiedenen isolierten Schweineorganen wurde mit den in Kapitel 4.3.5 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Auswertung der Inkubation und die Bestimmung der Umsetzungsraten zeigen eine deutlich gesteigerte N-reduktive Aktivität in der Leber, Schilddrüse, Niere und dem Pankreas, wohingegen in allen anderen Organen nur geringe Aktivitäten gemessen werden konnten.

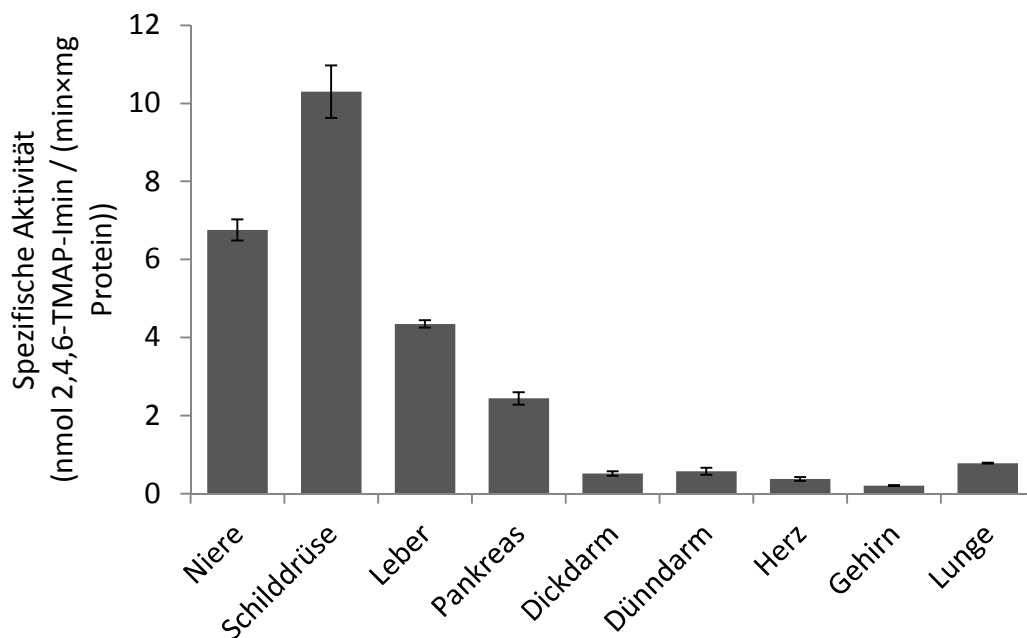


Abb. 4.4.7: N-Reduktion von (E)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim durch Inkubation mit isolierten hepatischen und extrahepatischen porcinen Mitochondrien

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Inkubationen mit Pankreas- und Lebermitochondrien erfolgten in unabhängigen Versuchen. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

In weiteren Untersuchungen zeigte sich bei der Inkubation von porcinen Schilddrüsen-, Leber- und Nierenmitochondrien mit den isolierten (*E*)- und (*Z*)-Isomeren als Substrat, dass die (*E*)-Form bevorzugt zum Imin reduziert wird. Es konnten etwa doppelt so hohe Umsetzungsraten des (*E*)-Isomers im Vergleich zur (*Z*)-Form gemessen werden.

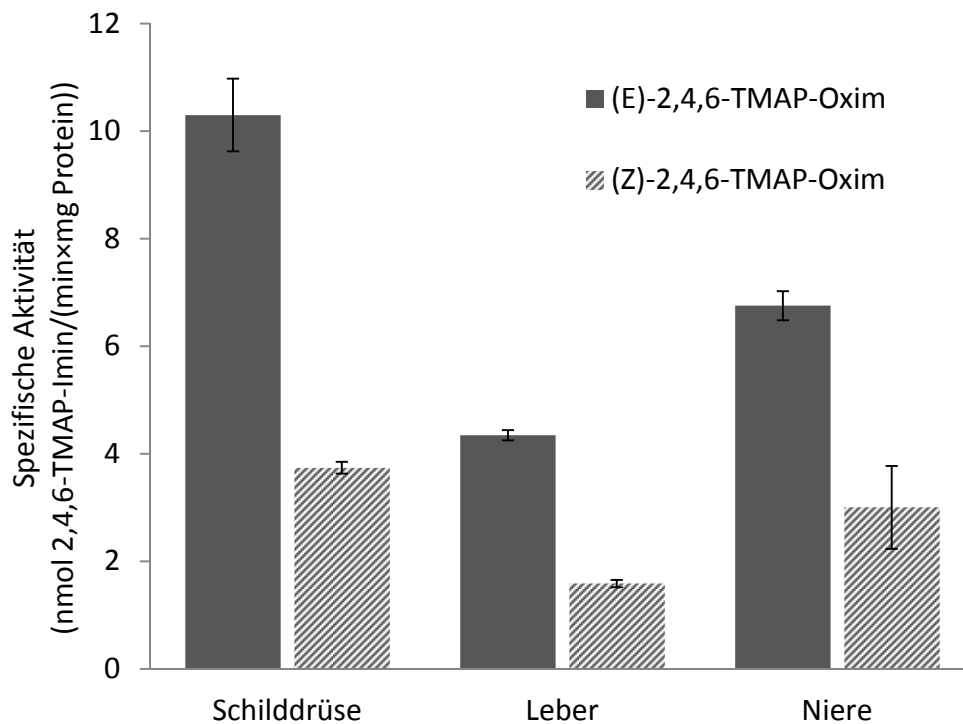


Abb. 4.4.8: Vergleich des Ausmaßes der 2,4,6-Trimethylacetophenonimin-Bildung durch die Inkubationen von (*E*)- und (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim mit porcinen Mitochondrien

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei aufeinanderfolgenden Versuchen, die in Parallelansätzen inkubiert und doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

4.4.3. Reduktionsstudien mit dem rekombinanten humanen Dreikomponentenenzymssystem mARC

An die Untersuchungen zur Reduktion von 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim mit den isolierten porcinen subzellulären Fraktionen schlossen sich *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem rekombinanten humanen Dreikomponentenenzymssystem bestehend aus Cyt b₅, der NADH-abhängigen Cyt b₅R und mARC an.

4.4.3.1. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Die Bestimmung der Substratabhängigkeit wurde anhand des humanen rekombinanten Enzymsystems mit mARC-1 und mARC-2 exemplarisch für das (*E*)-Isomer unter den in Kapitel 4.3.5 beschriebenen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Es konnte keine Enzymkinetik nach Michaelis-Menten bestimmt werden, da (wie in Abb. 4.4.9 gezeigt) keine Substratsättigung erzielt wurde. Die schlechte Wasserlöslichkeit des Substrates führt bei Konzentrationen oberhalb von 3 mM zum Ausfallen des Oxims im Inkubationsansatz. Eine Erhöhung der DMSO-Konzentration zur Verbesserung der Löslichkeit konnte nicht in Betracht gezogen werden, da ansonsten, wie für Benzamidoxim gezeigt wurde (siehe Kapitel 2.4.3), Proteinhemmung eintritt.

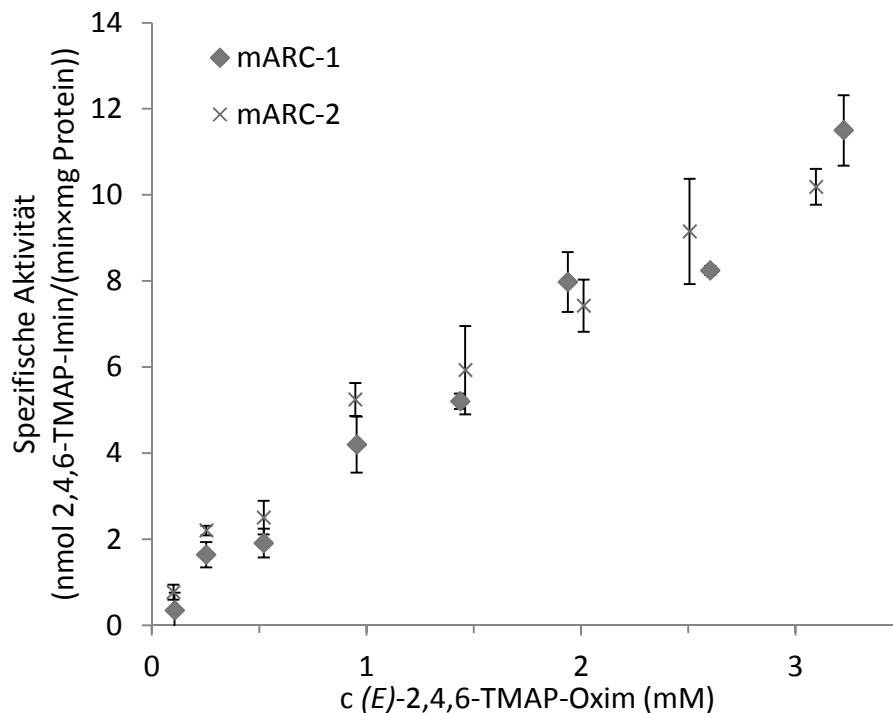


Abb. 4.4.9: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von (*E*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim mit rekombinantem mARC-1 und mARC-2, Cyt b_5 und NADH Cyt b_5 R

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

4.4.3.2. Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit humanem mARC-1 und mARC-2

Die Inkubation mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem wurde, wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Es wurden die Umsetzungsraten der rekonstituierten Inkubationsansätze mit mARC-1 und mARC-2 zusammen mit Cyt b₅ und NADH Cyt b₅R bestimmt.

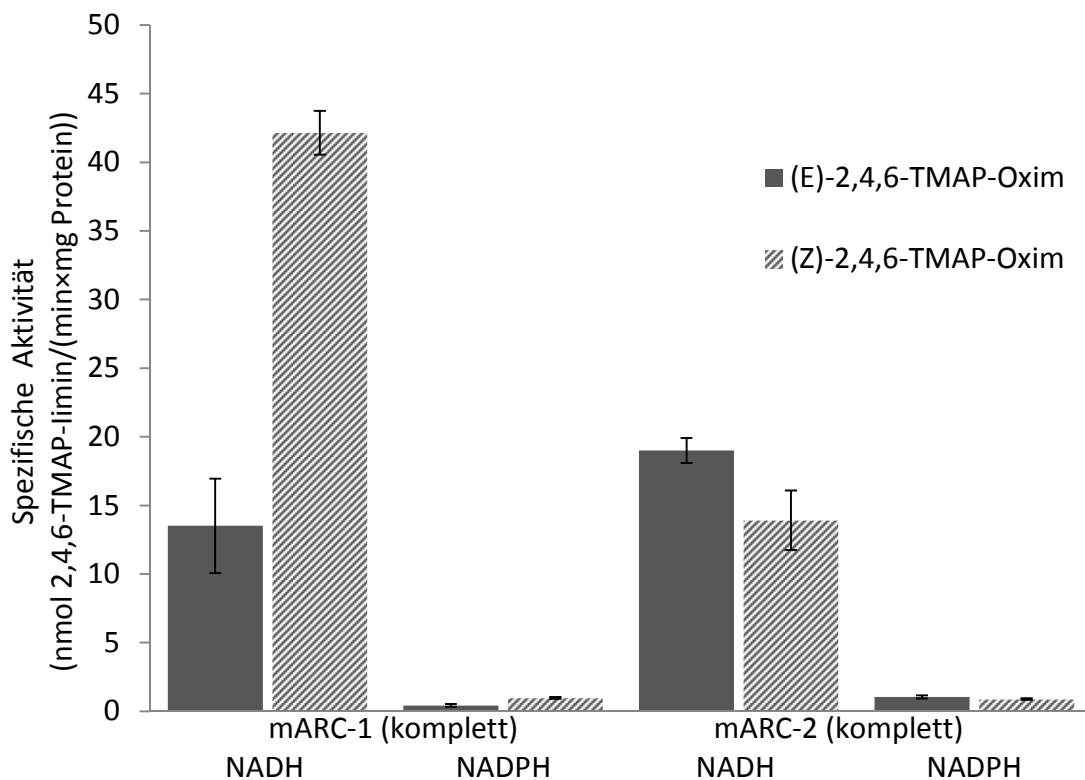


Abb. 4.4.10: N-Reduktion von (E)- und (Z)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim durch Inkubation mit dem rekonstituierten humanen mARC-haltigen Enzymsystem und NAD(P)H als Cofaktor

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

In Abb. 4.4.10 sind die spezifischen Aktivitäten im Komplettansatz mARC-1 und mARC-2 sowohl mit dem (*E*)- als auch dem (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim dargestellt. Zusätzlich wurde das Cosubstrat NADH gegen NADPH ausgetauscht und parallel inkubiert.

Es konnten die Umsetzungsraten der *N*-Reduktion im rekonstituierten Enzymsystem sowohl für mARC-1 als auch für mARC-2 detektiert werden. Die Ergebnisse der enzymatischen Umsetzung mit NADH als Cosubstrat zeigten, dass die Reduktion vom Oxim zum Imin bevorzugt abläuft. Die NADPH-abhängige Reduktion verlief wie erwartet deutlich langsamer. Kontrollansätze, denen eine oder mehrere Komponenten des Enzymsystems fehlten, zeigten keine bzw. vernachlässigbar geringe detektierbare *N*-reduktive Aktivität (Daten nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, dass das mARC-haltige NADH-abhängige Enzymsystem vorrangig an der Reduktion von 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim beteiligt ist.

Ein Vergleich der Umsetzungsraten der untersuchten Isomere lässt erkennen, dass mARC-1 im Komplettansatz inkubiert das Substrat (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim etwa doppelt so schnell umsetzt wie das (*E*)-Isomer. Für mARC-2 im rekombinanten Enzymsystem sind keine großen Unterschiede in den Aktivitäten messbar. Das (*E*)-Isomer zeigte keine erhöhten Umsetzungsraten wie es in Inkubationen mit dem isolierten porcinen mARC-haltigen Enzymsystem in Kapitel 4.4.2.5 gezeigt werden konnte.

4.5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte aufbauend auf den Untersuchungen von Heberling aus dem Jahr 2004 gezeigt werden, dass Oxime potentielle Substrate des mitochondrialen molybdänhaltigen Enzymsystems sind und zu den korrespondierenden Iminen reduziert werden. Es wurden *in vitro* Biotransformationsstudien sowohl mit isolierten porcinen hepatischen und extrahepatischen subzellulären Fraktionen als auch erstmalig mit dem vollständig rekombinant exprimierten humanen Enzymsystem, bestehend aus den Komponenten Cyt b₅, deren Reduktase und mARC durchgeführt. Als Modellsubstrate wurden die Isomere (*E*)- und (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim eingesetzt, die zum hydrolysestabilen 2,4,6-Trimethylacetophenonimin enzymatisch umgesetzt wurden. Der entstandene Metabolit konnte mittels HPLC-Analyse quantifiziert und die Umsetzungsraten der *N*-Reduktion berechnet werden. Durch das Vorliegen stabiler isolierter (*E*)- und (*Z*)-Isomeren war es möglich, Effekte der chemisch unterschiedlichen *cis*- und *trans*-Formen auf die mARC-abhängige Oxim-Reduktion zu untersuchen.

Heberling konnte erstmals die *in vitro* Biotransformation des 2,4,6-Trimethylacetophenonoxims zum Imin durch isolierte porcine Leberenzymquellen zeigen und charakterisieren (Heberling *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt und erstmals auch auf extrahepatische subzelluläre Fraktionen übertragen werden. Die Reduktion des Substrats 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim zum korrespondierenden Imin durch die isolierten subzellulären Fraktionen zeigte eine in den Mitochondrien angereicherte *N*-reduktive Aktivität, die cofaktorabhängig bevorzugt durch NADH katalysiert wurde. Dabei traten besonders die hohen enzymatischen Aktivitäten in den Mitochondrien der Schilddrüse, Niere, Leber und dem Pankreas hervor, wohingegen Mitochondrienfraktionen der anderen untersuchten Organe nur geringe *N*-reduktive Aktivität zeigten. Diese Beobachtungen decken sich mit den Untersuchungen anderer *N*-hydroxylierter

Verbindungen, die in Kapitel 2 für die Amidoxime Upamostat und Benzamidoxim sowie für *N*-hydroxylierte Basenanaloga (Krompholz *et al.*, 2012) gezeigt werden konnten. Durch Immunblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen mARC konnte in allen bisher untersuchten Geweben mindestens eine Isoform des Enzyms nachgewiesen werden (Krischkowski, Dissertation in Vorbereitung).

Erstmals konnte *in vitro* die cofaktorabhängige enzymatische Reduktion des 2,4,6-Trimethylacetophenonoxims anhand des vollständig rekombinant hergestellten humanen Enzymsystems sowohl für mARC-1 als auch für mARC-2 gezeigt werden (Abb. 4.5.1).

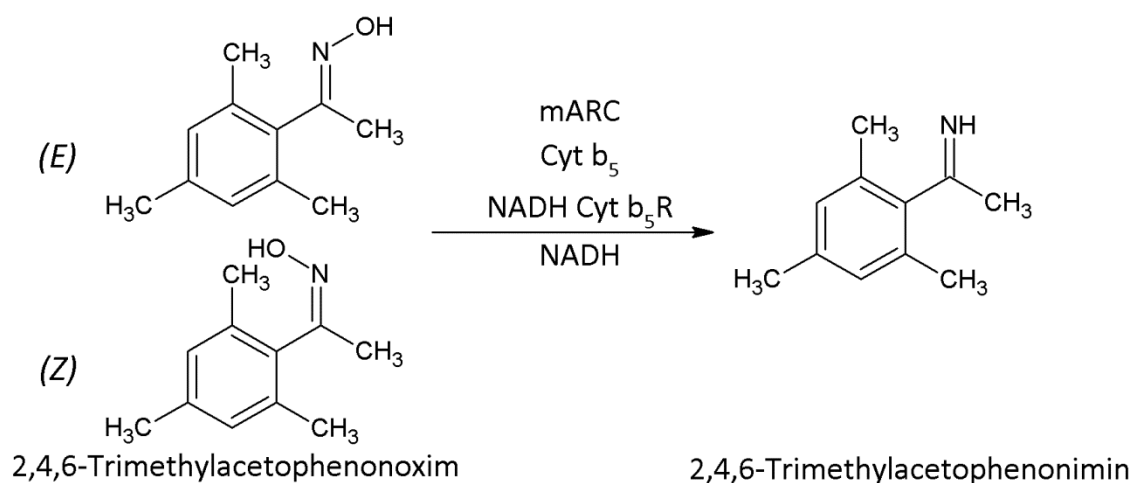


Abb. 4.5.1: Reduktion von (E)- und (Z)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim zum korrespondierenden Imin durch mARC

2,4,6-Trimethylacetophenonoxim liegt in zwei stabilen isomeren Formen (*E*) und (*Z*) vor, die getrennt voneinander als Substrate für das *N*-reduktive Enzymsystem untersucht werden konnten. Heberling (2004) beschrieb erstmals einen Einfluss der Konfiguration des Oxims an der C-N-Doppelbindung auf die Biotransformation zum korrespondierenden Imin. Das (*E*)-Isomer zeigte gegenüber dem (*Z*)-Isomer erhöhte Umsetzungsraten durch Inkubation mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Studien von Gobbini *et al.*

(2008) beobachteten ebenfalls Unterschiede der isomeren Formen des O-substituierten Oxims Istaroxim in Bezug auf dessen Wirksamkeit am Rezeptor. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* am Meerschweinchenmodell zeigten sie, dass Istaroxim, ein Na⁺, K⁺-ATPase-Inhibitor, in seiner (*E*)-Form etwa 11-mal potenter ist als dessen (*Z*)-Isomer (Gobbini *et al.*, 2008). *In vitro* Biotransformationsstudien mit humanem mARC-1 und mARC-2 im rekonstituierten System wurden mit beiden Isomeren als Substrate durchgeführt und die ermittelten Enzymaktivitäten miteinander verglichen. Dabei konnte beobachtet werden, dass das (*E*)-Isomer sowohl von mARC-1 als auch von mARC-2 im gleichen Ausmaß zum Imin reduziert wurde. Anders dagegen verhielt sich die *N*-Reduktion des (*Z*)-Isomers. Das Substrat (*Z*)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim wurde von mARC-1 gegenüber dem (*E*)-Isomer um den Faktor drei schneller zum Metaboliten 2,4,6-Trimethylacetophenonimin reduziert. Für die Inkubation mit mARC-2 wurden nur geringe Unterschiede in der spezifischen Aktivität beider isomeren Formen detektiert. Die niedrigere spezifische Enzymaktivität von mARC-2 in der Umsetzung des (*Z*)-Ketamins im Vergleich zu mARC-1 spiegelte die in Studien für Amidoxime gezeigten Ergebnisse wider. Wie bereits in Kapitel 3 diskutiert wurde, gibt es erste Hinweise darauf, dass das an der *N*-Reduktion hydroxylierter Verbindungen im humanen Organismus beteiligte Enzymsystem vorrangig durch mARC-1 katalysiert wird.

Der Unterschied, dass mARC-1 das (*Z*)-, nicht aber das (*E*)-Isomer bevorzugt reduziert, steht im Gegensatz zu den für das native porcine Enzymsystem gezeigten Studien. Ursachen dafür liegen vermutlich an Unterschieden zwischen den membrangebundenen nativen und den löslichen, am *N*-Terminus trunkierten rekombinanten mARC-haltigen Enzymen und damit an sterischen Einflüssen der Isomere auf die Erreichbarkeit des katalytischen Zentrums von mARC. Auch könnten Unterschiede in der Substratspezifität der mARC-Enzyme zwischen verschiedenen Spezies eine Rolle spielen. Dies sollte in anderen Studien durch Inkubation mit subzellulären Fraktionen aus humanem Gewebe untersucht werden.

In weiterführenden Arbeiten sollte die Proteinstruktur des nativen humanen mARC aufgeklärt werden, um Unterschiede zu den in *E. coli* rekombinant exprimierten Enzymen, z.B. durch posttranslationale Proteinmodifikationen, untersuchen zu können. Auch die Kristallisation des molybdänhaltigen Enzyms könnte Aufschluss über die Struktur des Proteins und damit über die Voraussetzungen der Bindung von Substraten an das aktive Zentrum (Moco) geben.

Zusammenfassend konnte für das Modellsubstrat 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim eine von der Konfiguration abhängige stereoselektive *N*-Reduktion zum stabilen Imin durch das mARC-haltige Enzymsystem gezeigt werden. Im Vergleich zur Umsetzung des Modellsubstrats Benzamidoxim, dem Markersubstrat zur Bestimmung der *N*-reduktiven mARC-Aktivität, konnten für die untersuchten Oxime nur geringe spezifische Aktivitäten ermittelt werden. Die höchsten Metabolitenkonzentrationen wurden bei Inkubationen mit Mitochondrien der Leber, Niere, dem Pankreas und der Schilddrüse detektiert. Die vergleichsweise hohen Umsetzungsraten der untersuchten Substrate in Organen hoher Stoffwechselaktivität lassen für das mARC-haltige Enzymsystem eine Beteiligung an zahlreichen physiologischen Funktionen vermuten, die allerdings bisher nicht aufgeklärt werden konnten. Es gibt erste Hinweise, dass mARC mit Detoxifikationsprozessen *N*-hydroxylierter Substanzen in Verbindung gebracht werden kann (Krompholz *et al.*, 2012). Andere Studien zeigten, dass Oxime chemischer Fremdstoffe Prohaptene bilden, die in der Haut zu allergischen Reaktionen (Kontakdermatitis) führen können (Bergström *et al.*, 2008, Mutlib *et al.*, 2002). Aktuelle Studien konnten mARC im porcinen Hautgewebe nachweisen (Krischkowski, Dissertation in Vorbereitung), sodass eine Beteiligung von mARC am Abbau dieser hoch reaktiven Oxime möglich erscheint und in weiteren Forschungsarbeiten aufgeklärt werden sollte. Für die Entwicklung potentieller Arzneistoffe mit Oximen als funktionelle Gruppe sollte eine schnelle Metabolisierung durch mARC berücksichtigt werden.

5. N-REDUKTION ALIPHATISCHER UND AROMATISCHER N-OXIDE

5.1. EINLEITUNG

5.1.1. Chemische Eigenschaften von N-Oxiden

Als N-Oxide werden Derivate oxidierter Amine bezeichnet, die als funktionelle Gruppe eine N-O-Bindung besitzen (Zheng *et al.*, 2011). Sie werden eingeteilt in tertiäre aliphatische und aromatische heterocyclische N-Oxide. N-Oxide sind salzartige Verbindungen mit einer formalen Ladung, großem Dipolmoment und hoher Polarität. Aufgrund der höheren Elektronenaffinität des Sauerstoffs verglichen mit dem Stickstoff findet ein Elektronentransfer in Richtung des Sauerstoffs statt (Bickel, 1969). Im Vergleich zu den korrespondierenden tertiären Aminen sind N-Oxide weniger stark basisch. Untersuchungen von Bickel und Weder (1969) zeigten eine pKa-Wert-Verschiebung von 8,0 zu 4,7 durch Bildung des N-Oxids aus dem Arzneistoff Imipramin.

5.1.2. Bedeutung von N-Oxiden als Arzneistoffe

Seit der Entdeckung von N-Oxiden im Jahre 1894 durch Dunstan und Goulding und deren detaillierten Beschreibungen ist das Interesse an der Erforschung dieser Substanzklasse ungebrochen groß (Dunstan und Goulding, 1899). Sowohl das natürliche Vorkommen von N-Oxiden in tierischen und pflanzlichen Geweben, deren Metabolisierung als auch die Entwicklung von N-Oxiden als Arzneistoffkandidaten sind Gegenstand zahlreicher pharmakologischer und toxikologischer Untersuchungen (Bickel, 1969). Zu den Arzneistoffen mit N-Oxiden als funktionelle Gruppe zählen beispielsweise die Psychopharmaka Amitriptylin-N-oxid (Breyer-Pfaff, 2004) und der Tranquilizer Chlordiazepoxid (Bickel, 1969) sowie der Lipidsenker aus der Gruppe der Nicotinsäureanaloga Acipimox (Fucella *et al.*, 1980).

Potentielle Arzneistoffe aus aktueller Forschung sind z. B. Antibiotika aus der Klasse der Chinoxalin-1,4-di-*N*-oxide wie Cyadox, das in der Tierzucht eingesetzt wird (Zheng *et al.*, 2011) oder deren Derivate, die zur Bekämpfung der Tuberkulose entwickelt wurden (Vicente *et al.*, 2011). Weitere in der klinischen Entwicklung befindlichen *N*-Oxide sind Pyridin-*N*-oxid-Derivate, potentielle Reverse-Transkriptase-Inhibitoren zur Behandlung von HIV-Infektionen (Balzarini *et al.*, 2005) und aliphatische di-*N*-Oxid-Derivate, wie der potentielle Topoisomerase-II-Inhibitor Banoxantron, die als Chemotherapeutika in der Krebstherapie eingesetzt werden (Alama *et al.*, 2012).

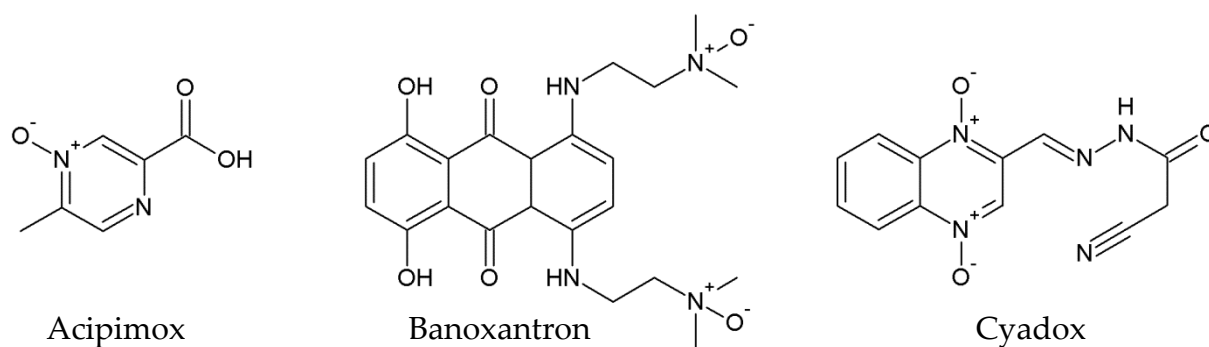


Abb. 5.1.1: Beispiele potentieller Arzneistoffe mit aliphatischen und aromatischen heterocyclischen *N*-Oxiden als funktionelle Gruppe.

Sowohl die Oxidation zu *N*-Oxiden als auch deren Reduktion sind von pharmakologischem und auch toxikologischem Interesse. Die Wirkstärken der *N*-Oxide in Bezug auf ihre korrespondierenden Amine unterscheiden sich dabei wesentlich. Bei einigen *N*-Oxiden, wie den Arzneistoffen Banoxantron und Amitriptylin-*N*-oxid, handelt es sich um Prodrugs, die erst durch Reduktion in die Wirkform überführt werden. Durch dieses Prinzip können systemische Nebenwirkungen reduziert werden (Breyer-Pfaff, 2004, McKeown *et al.*, 2007). Bei anderen *N*-Oxiden, wie dem Tranquilizer Chlordiazepoxid weist die reduzierte Form hingegen eine neun- bis zehnfach niedrigere Wirkpotenz verglichen mit dem *N*-Oxid auf (Bickel, 1969).

5.1.3. Enzymatische und nichtenzymatische Reduktion von N-Oxiden

N-Oxide können chemisch leicht zu ihren korrespondierenden tertiären Aminen reduziert werden (Bickel, 1969). Schon in den zwanziger Jahren des vorherigen Jahrhunderts zeigten Ackermann *et al.* (1926) dass Trimethylamin-N-oxid durch Leberpräparationen aus Säugetieren reduziert wird. Dabei gingen sie davon aus, dass die Abspaltung des Sauerstoffs durch tierisches Gewebe mittels eines biologischen und hitzebeständigen Katalysators wie beispielsweise Cystein oder Glutathion vermittelt wird (Ackermann *et al.*, 1926).

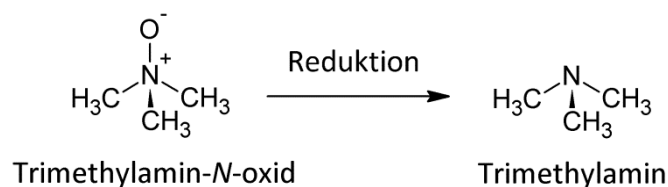


Abb. 5.1.2: Reduktion von Trimethylamin-N-oxid zum korrespondierenden Amin

Vaisey (1956) bestätigte die hitzestabile nichtenzymatische aerobe Reduktion von Trimethylamin-N-oxid durch Hämoglobin in Gegenwart von Cystein, Terayama (1963) die anaerobe Reduktion von Indicin-N-oxid durch Cytochrom c in Gegenwart von Ascorbinsäure und Powis und DeGraw (1980) berichteten von der aeroben Reduktion des 4-Dimethylaminoazobenzon-N-oxids durch Methämoglobin. Weiterführende Studien zeigten ebenfalls, dass unter Beteiligung von Hämoproteinen (Catalase, Peroxidase, Hämoglobin und Cytochrom c) die Reduktion von tertiären Amin-N-oxiden unabhängig von der Enzymaktivität auch nichtenzymatisch abläuft (Takekawa *et al.*, 2001a, Takekawa *et al.*, 2001b, Takekawa *et al.*, 1997, Zheng *et al.*, 2011).

Aus bisherigen Veröffentlichungen zur enzymatischen Reduktion von N-Oxiden geht hervor, dass unterschiedliche Enzymsysteme die Reaktion katalysieren können. Es ist bisher noch nicht eindeutig geklärt worden, welche dieser Enzymsysteme

unter physiologischen Bedingungen an der Reduktion beteiligt sind (Breyer-Pfaff, 2004).

Erstmals wurde ein für die Reduktion von N-Oxiden verantwortliches Enzymsystem in der Leber von Säugetieren entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass das CYP 450-System und die NADH Cytochrom b₅ Reduktase an der mikrosomalen und die Aldehydoxidase an der cytosolischen Reduktion beteiligt sind (Kitamura und Tatsumi, 1984b, a, Powis und Wincentzen, 1980, Sugihara *et al.*, 1996, Sugiura *et al.*, 1976, Sugiura *et al.*, 1974, Zheng *et al.*, 2011). Die Aldehydoxidase ist ein Flavoenzym und gehört wie die Xanthinoxidase zu den molybdänhaltigen cytosolischen Enzymen (Shimada *et al.*, 1987). In Gegenwart von Elektronendonatoren wie Benzaldehyd, N'-Methylnicotinamid oder 2-Hydroxypyrimidin werden aliphatische und heterocyclische N-Oxide reduziert (Kitamura und Tatsumi, 1984b, Takekawa *et al.*, 2001b). Zheng *et al.* (2011) untersuchten den Mechanismus der enzymatischen und der nichtenzymatischen Reduktion des Arzneistoffs Cyadox und zeigten unter anaeroben Bedingungen reduktive Aktivität der Aldehydoxidase sowohl für das 1-N- als auch für das 4-N-Oxid. Die enzymatische Reaktion konnte durch Zusatz von Menadion oder Chlorpromazin inhibiert und durch das Abkochen des Cytosols komplett ausgeschaltet werden. Des Weiteren bestätigten sie, wie bereits Murray und Chaykin (1966), die Beteiligung der Xanthinoxidase an der enzymatischen Reduktion von N-Oxiden zusammen mit Xanthin als Elektronendonator (Zheng *et al.* 2011).

5.1.3.1. Das aliphatische N-Oxid des Amitriptylins

Amitriptylin und seine Derivate sind Dibenzocycloheptadiene und gehören zur Wirkstoffklasse der tricyclischen Antidepressiva (TCA) (Steinhilber *et al.*, 2005). TCA hemmen nicht selektiv die Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin. Außerdem antagonisieren sie unterschiedlich stark Neurorezeptoren, wie z.B. histaminerge, muscarinerge, α_1 -, α_2 - und 5-HT₂-Rezeptoren. Amitriptylin wirkt

anxiolytisch, sedierend und schlafanstoßend (Steinhilber *et al.*, 2005). Als wichtige Nebenwirkungen sind vor allem anticholinerge Effekte zu nennen. Dazu gehören beispielsweise antagonistische Eigenschaften an muscarinergen Rezeptoren, die zu Mundtrockenheit, Akkomodationsstörungen, Tachykardie, Obstipation, Miktions- und Gedächtnisstörungen führen können (Steinhilber *et al.*, 2005). Die orale Gabe des Arzneistoffs Amitriptylin-*N*-oxid, der zu Amitriptylin und Nortriptylin metabolisiert wird (siehe Abb. 5.1.3), bewirkt im Vergleich zur oralen Einnahme von Amitriptylin-HCl eine Abnahme des Amitriptylin-Plasmaspiegels um mehr als die Hälfte, bei gleich hohem Amitriptylin-ZNS-Spiegel. Dadurch sind die Nebenwirkungen im Vergleich zum Amitriptylin-HCl insgesamt geringer (Steinhilber *et al.*, 2005). Amitriptylin-*N*-oxid kann somit als ein Prodrug angesehen werden (Breyer-Pfaff, 2004).

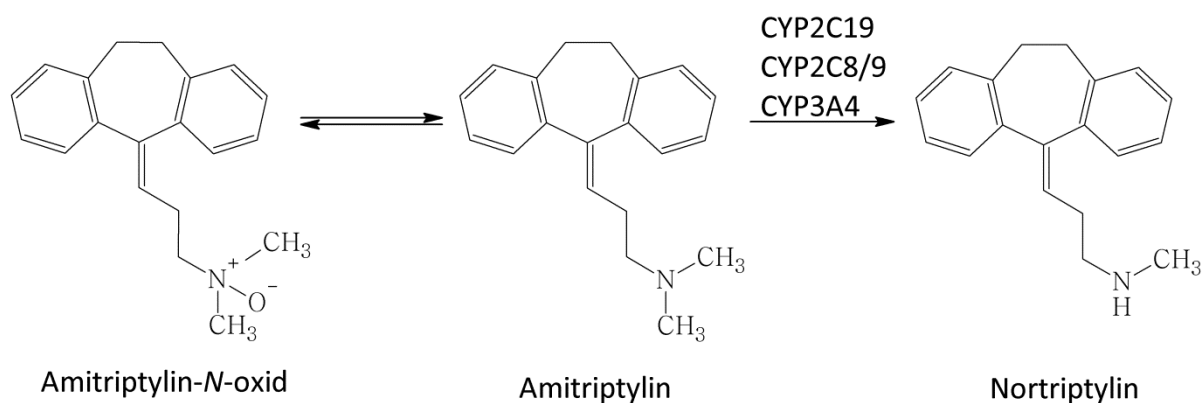


Abb. 5.1.3: Metabolismus in der Seitenkette von Amitriptylin-*N*-oxid, Amitriptylin und Nortriptylin (nach Breyer-Pfaff, 2004)

Die bisherigen Studienergebnisse zur enzymatischen Reduktion von Amitriptylin-*N*-oxid stammen aus Untersuchungen von Blut, tierischen Organhomogenaten und subzellulären Fraktionen (Breyer-Pfaff, 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass Amitriptylin-*N*-oxid, vergleichbar wie Imipramin-*N*-oxid, durch Leber- und Nierenhomogenat der Ratte reduziert wird. Eine Steigerung der Reduktion konnte dadurch erreicht werden, dass die Reaktion unter anaeroben Bedingungen stattfand. Aller-

dings konnte auch gezeigt werden, dass durch Hitzebehandlung des Proteins nur eine partielle Inhibierung stattfand (Bickel, 1972), was möglicherweise auf die Beteiligung nichtenzymatischer Mechanismen bei der Reduktion hinweist (Breyer-Pfaff, 2004). Takekawa *et al.* (2001a) fanden heraus, dass Imipramin-*N*-oxid auf vergleichbare Weise durch Rattenlebermikrosomen zu Imipramin reduziert und ebenfalls nicht durch Hitzebehandlung inhibiert wird. Basierend auf den Untersuchungen wurde für die Reduktion von aliphatischen tertiären Aminen ein zweistufiger Mechanismus vermutet, indem das Häm im CYP 450 abhängig von NAD(P)H und Flavin die Reaktion katalysiert (Takekawa *et al.*, 2001a) (siehe Abb. 5.1.4).

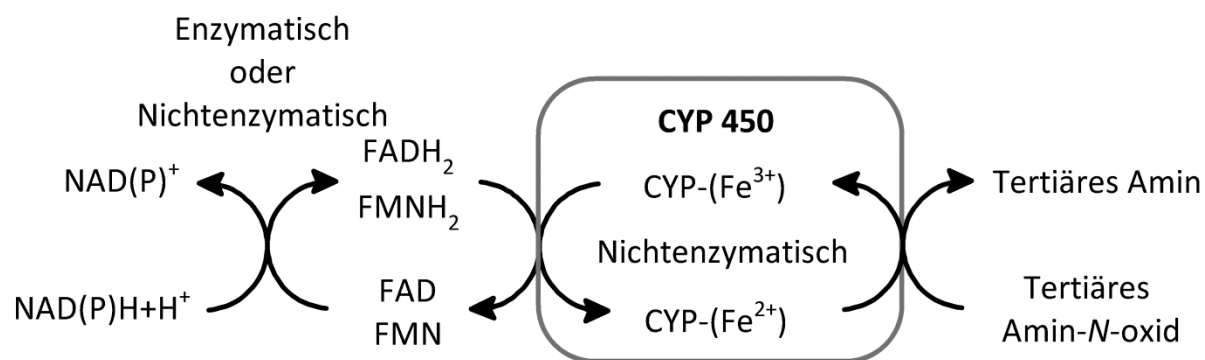


Abb. 5.1.4: Schema des Mechanismus der N-Oxid-Reduktion tertiärer Amine durch CYP 450 zusammen mit NAD(P) und Flavin (nach Takekawa *et al.*, 2001a)

Im ersten Schritt erfolgt die Reduktion des Flavins durch das in der reduzierten Form vorliegende Pyridinnukleotid. In nativen Mikrosomen wird das Flavin hauptsächlich durch NADPH CYP 450 Reduktase mit NADPH oder durch die NADH-Cytochrom b₅ Reduktase zusammen mit NADH reduziert (Kato *et al.*, 1976). In denaturierten Mikrosomen wird Flavin nichtenzymatisch durch NAD(P)H reduziert. Der zweite Schritt der Reduktion aliphatischer tertiärer *N*-Oxide zum korrespondierenden Amin erfolgt nichtenzymatisch durch reduziertes Flavin als Elektronendonator, katalysiert durch die Hämgruppe des CYP 450 (Takekawa *et al.*, 2001a).

In anderen Veröffentlichungen werden weitere Enzyme diskutiert, die an der Reduktion von tertiären Amin-*N*-oxiden beteiligt sind: Beispielsweise ist die im

Cytosol der Leber von Affen enthaltene Aldehydoxidase maßgeblich für die Reduktion von Amin-*N*-oxiden verantwortlich (Kitamura *et al.*, 2001). Des Weiteren wird auch eine chinonabhängige *N*-Oxid-Reduktion angenommen, bei der in der Leber von Säugetieren sowohl endogenes als auch exogenes Chinon in einem ersten Schritt durch eine Chinonreduktase, wie die DT-Diaphorase, in Gegenwart von NAD(P)H zum Dihydrochinon reduziert wird. Im zweiten Schritt wird das tertiäre Amin-*N*-oxid katalytisch durch die Hämgruppe eines Hämoproteins in Verbindung mit Dihydrochinon als Elektronendonator zum korrespondierenden Amin reduziert (Kitamura *et al.*, 1999a). (siehe Abb. 5.1.5)

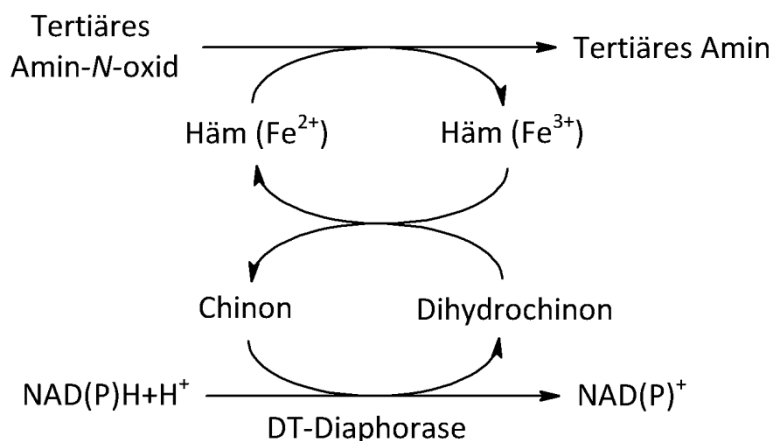


Abb. 5.1.5: Schema des Mechanismus der chinonabhängigen *N*-Oxid-Reduktion in Rattenlebercytosol (nach Kitamura *et al.*, 1999a)

5.1.3.2. Das aromatische, heterocyclische *N*-Oxid des Nicotinamids

Nicotinamid-*N*-oxid ist die am Pyridin-Stickstoff oxidierte Form des Nicotinsäureamids. Nicotinamid, auch bezeichnet als Antipellagra-Vitamin, wird zu den Vitaminen gerechnet, obwohl es sich nicht um ein Vitamin im eigentlichen Sinne handelt, da es im Organismus aus Tryptophan synthetisiert werden kann (Burger und Wachter, 1998). Nicotinamid ist eine gegen Wärme und Oxidationsmittel unempfindliche Substanz, die stets mit der Nahrung aufgenommen wird. Sie kommt

vor allem in Hefe, Nüssen, Leber, Herz, Niere, Gehirn, Eigelb und in der Milch vor (Mutschler *et al.*, 2008) und stellt die wirkungsbezogene Partialstruktur der wasserstoffübertragenden Coenzyme NAD⁺ und NADP⁺ dar (Steinhilber *et al.*, 2005). Bei oraler Gabe von Nicotinamid wird die Substanz im Dünndarm resorbiert. Die Plasmahalbwertszeit beträgt etwa eine Stunde. Als Hauptausscheidungsprodukte sind die quartären Ammoniumverbindungen *N*-1-Methylnicotinamid und *N*-1-Methyl-6-pyridon-3-carboxid zu nennen (Steinhilber *et al.*, 2005).

Ein Metabolit, der *in vivo* aus Nicotinamid durch Oxidation entstehen kann, ist das Nicotinamid-*N*-oxid (Chaykin und Bloch, 1959). Durch Studien an Ratten- und Schweineleberhomogenaten konnte gezeigt werden, dass Nicotinamid-*N*-oxid reversibel zu Nicotinamid reduziert werden kann (Murray und Chaykin, 1966a) (siehe Abb. 5.1.6).

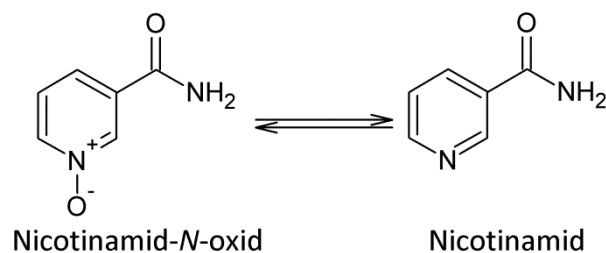


Abb. 5.1.6: Reduktion von Nicotinamid-*N*-oxid zu Nicotinamid (Murray und Chaykin, 1966a)

Aus bisherigen Veröffentlichungen geht hervor, dass die Reduktion unter anderem durch die Xanthinoxidase aus der Schweineleber katalysiert werden kann (Murray und Chaykin, 1966b). Dabei sind NADH, Hypoxanthin oder Xanthin die Reduktionsmittel für diese Reaktion (Chaykin, 1966). Kitamura *et al.* (1984) fanden heraus, dass Nicotinamid-*N*-oxid NAD(P)H-abhängig auch durch Kaninchenleberpräparationen reduziert wird. Das daran beteiligte Enzymsystem besteht aus mikrosomaler NADPH Cytochrom c Reduktase und cytosolischer Aldehydoxidase (Kitamura *et al.*, 1984). Durch Kombination der Enzyme und Zugabe von NAD(P)H konnte eine signifikante Umsetzung des Nicotinamid-*N*-oxids zu Nicotinamid gezeigt werden.

Das Schema des veröffentlichten Elektronentransfersystems ist in Abb. 5.1.7 dargestellt. Die Aldehydoxidase hat im Gegensatz zur Xanthinoxidase den größeren Anteil an der Reduktion von Nicotinamid-N-oxid in der Leber von Säugetieren (Kitamura und Tatsumi, 1984a).

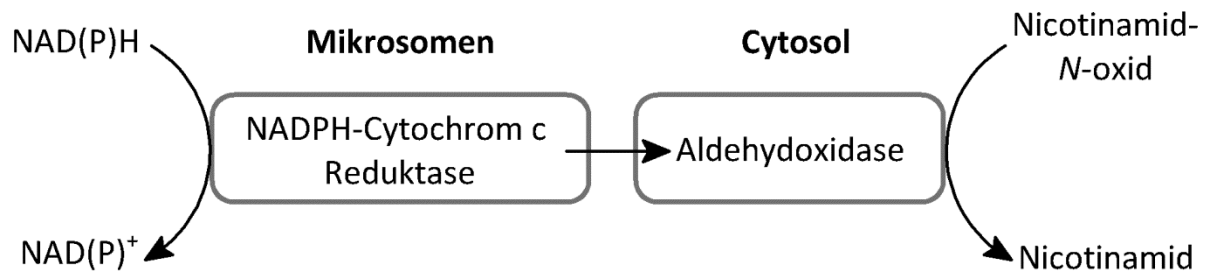


Abb. 5.1.7: Elektronentransfersystem bestehend aus mikrosomaler NADPH Cytochrom c Reduktase und cytosolischer Aldehydoxidase der Leber (nach Kitamura *et al.*, 1984)

5.2. THEMA UND ZIELSETZUNG

Im vorliegenden Kapitel sollte die enzymatische Reduktion von *N*-Oxiden näher charakterisiert werden, denn bisher konnte nicht vollständig geklärt werden, welche Enzymsysteme für die Reduktion von tertiären Amin-*N*-oxiden unter physiologischen Bedingungen verantwortlich sind (Breyer-Pfaff, 2004). Die *in vitro* Reduktionsstudien der in Kapitel 5.1.3 zitierten Veröffentlichungen wurden jeweils unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Aerobe Kontrollen zeigten in der Regel stark abgeschwächte Umsetzungsraten. Auf dieser Grundlage sollten Biotransformationsstudien mit dem hinsichtlich Enzymstöchiometrie und Inkubationsbedingungen optimierten rekombinanten humanen mARC-haltigen Dreikomponentenenzymssystem unter aeroben Bedingungen durchgeführt werden. Dadurch sollten die Fragestellungen beantwortet werden, ob mARC die Reduktion von *N*-Oxiden zu deren korrespondierenden tertiären Aminen katalysiert und wie sich dabei aliphatische und aromatische *N*-Oxide voneinander unterscheiden. Als Modellsubstrate für die *N*-reduktiven Studien wurden der Arzneistoff Amitriptylin-*N*-oxid, als Modellsubstanz für aliphatische tertiäre Amin-*N*-oxide, und Nicotinamid-*N*-oxid für aromatische heterocyclische Amin-*N*-oxide eingesetzt. Vergleichende Inkubationen mit Benzamidoxim, dem Markersubstrat zur Charakterisierung der mARC-abhängigen *N*-Reduktion, sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die spezifischen Aktivitäten der enzymatischen Umsetzung des Amidoxims von denen der *N*-Oxide unterscheiden.

5.3. METHODEN

5.3.1. Materialien und Geräte

Amitriptylin-*N*-oxid (3-(10,11-Dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yliden)-*N,N*-dimethyl-1-propanamin-*N*-oxid) wurde nach der Methode von Gunther (1983) synthetisiert. Dazu wurde die zuvor aus dem Hydrochlorid gewonnene freie Base Amitriptylin zunächst auf 50°C erwärmt. Anschließend wurde unter ständigem Rühren 1,0 g einer 30 %igen Wasserstoffperoxidlösung über einen Zeitraum von 20 min hinzugetropft. Nach einer Stunde Rühren wurden 3,0 ml Wasser hinzugefügt. Dabei kristallisierte Amitriptylin-*N*-oxid als Dihydrat aus. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde das Amitriptylin-*N*-oxid-Dihydrat abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Identität wurde mittels Schmelzpunktbestimmung (101°C) und Massenspektrometrie (ESI-MS $m/z = 294 [M+H]^+$) bestätigt. Die Reinheitsprüfung erfolgte chromatographisch per HPLC-Analyse. Alle spektroskopischen und physikalisch-chemischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.

Alle weiteren Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen und sind in Kapitel 9 zusammen mit den verwendeten Materialien aufgelistet.

5.3.2. Proteinquellen

Für *in vitro* Biotransformationsstudien wurden sowohl rekombinante humane Proteine des Dreikomponentenenzymystems mit mARC, Cyt b₅ und der NADH Cyt b₅R als auch isolierte subzelluläre Fraktionen aus porcinen Organen verwendet. Die Gewinnung und Charakterisierung der Enzymquellen ist in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Alle Untersuchungen erfolgten mit einheitlichen Enzymchargen.

5.3.3. HPLC-Analytik

5.3.3.1. Trennung von Amitriptylin-N-oxid und Amitriptylin

Die Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Amitriptylin-N-oxid und dessen Metaboliten Amitriptylin wurde mit dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenen HPLC-System durchgeführt. Es wurden folgende Bedingungen zur Trennung mittels Ionenpaarchromatographie gewählt:

Stationäre Phase:	Phenomenex Gemini NX C 18 (5 µm) 150 × 4 mm (110 Å), Vorsäule C 18 4 × 4 mm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg)	
Säulenofentemperatur:	25°C	
Mobile Phase:	20 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat, 0,1 % Trifluoressigsäure pH 2,5 / Acetonitril 65:35 (v/v)	
Flussrate:	1,0 ml/min, isokratisch	
Laufzeit:	17 min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Detektion:	UV 245 nm	
Retentionszeiten:	Amitriptylin:	7,6 ± 0,1 min
	Amitriptylin-N-oxid:	8,8 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde zuvor durch Vakuumfiltration durch einen Whatmann® Membranfilter 0,45 µm von Partikeln befreit.

Zur Validierung der HPLC-Methode wurde eine 10-Punkt-Kalibrierung mit dem synthetischen Metaboliten Amitriptylin in definierten Konzentrationen im Bereich von 0,1-100 µM durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungen in einem Lösungsmittelgemisch aus gleichen Teilen *Aqua bidest.* und Acetonitril hergestellt und per HPLC analysiert. Entsprechend der Kalibrierung wurden die gleichen Konzentra-

tionen zur Bestimmung der Wiederfindung gewählt. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 3 mM Amitriptylin-*N*-oxid angelöst in DMSO mit einer maximalen Konzentration im Endansatz von 3 % und 50 µg denaturierte Schweinelebermitochondrien, die zuvor 10 min bei 100°C im Wasserbad abgekocht wurden. Das Gesamtvolumen betrug 150 µl verdünnt in 20 mM MES-Pufferlösung pH 6,0. Nach 18-minütiger Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden die Proben zu gleichen Teilen mit eisgekühltem Acetonitril versetzt, 5 min geschüttelt und anschließend 5 min bei 22 000g zentrifugiert. Die Überstände wurden mittels HPLC vermessen.

5.3.3.2. Trennung von Nicotinamid-*N*-oxid und Nicotinamid

Die Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Nicotinamid-*N*-oxid und dessen Metaboliten Nicotinamid wurde mit dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenen HPLC-System durchgeführt. Es wurden folgende Bedingungen zur Chromatographie mit Ionenpaarreagenz gewählt:

Stationäre Phase:	Phenomenex Gemini NX C 18 (5 µm) 150 × 4 mm (110 Å), Vorsäule C 18 4 × 4 mm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg)	
Säulenofentemperatur:	25°C	
Mobile Phase:	50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 10 mM Teramethyl- ammoniumchlorid / Acetonitril 93:7 (v/v)	
Flussrate:	1,0 ml/min, isokratisch	
Laufzeit:	8 min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Detektion:	UV 262 nm	
Retentionszeiten:	Nicotinamid- <i>N</i> -oxid:	1,9 ± 0,1 min
	Nicotinamid:	3,7 ± 0,3 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde zuvor durch Vakuumfiltration durch einen Whatmann® Membranfilter 0,45 µm von Partikeln befreit.

Zur Validierung der HPLC-Methode wurde eine 10-Punkt-Kalibrierung mit dem synthetischen Metaboliten Nicotinamid in definierten Konzentrationen im Bereich von 0,1-100 µM durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungen zu gleichen Teilen mit MES-Pufferlösung pH 6,0 und Methanol hergestellt und per HPLC analysiert. Entsprechend der Kalibrierung wurden die gleichen Konzentrationen zur Bestimmung der Wiederfindung gewählt. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 2 mM Nicotinamid-*N*-oxid, 0,3 mM NADH und 50 µg denaturierte Schweinelebermitochondrien, die zuvor 10 min bei 100°C im Wasserbad abgekocht wurden. Das Gesamtvolumen betrug 150 µl verdünnt in 20 mM MES-Pufferlösung pH 6,0. Nach 18-minütiger Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden die Proben zu gleichen Teilen mit eisgekühltem Methanol versetzt, 5 min geschüttelt und anschließend 5 min bei 22 000g zentrifugiert. Die Überstände wurden mittels HPLC vermessen.

5.3.4. Zusammensetzung der *in vitro* Biotransformationsansätze

In vitro Biotransformationsstudien mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen sowie dem rekonstituierten, rekombinanten humanen Enzymsystem wurden unter standardisierten Inkubationsbedingungen mit Amitriptylin-*N*-oxid bzw. Nicotinamid-*N*-oxid zur Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität durchgeführt. Inkubiert wurde wie zuvor in Kapitel 2.3.7 beschrieben unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im 37°C Schüttelwasserbad. Die Inkubationsansätze setzten sich zusammen aus Substrat und Protein gelöst in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (für Inkubationen mit porcinen Organfraktionen) oder 20 mM MES-Puffer pH 6,0 (für Inkubationen mit rekombinanten humanen Enzymen) mit einem Gesamtvolumen von 150 µl. Nach 3-minütiger Vorinkubation bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von NADH gestartet. Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der *N*-reduktiven Aktivität wurden die Inkubationszeiten im Bereich von 5-120 min variiert, wobei als Standardinkubationszeit 15 min festgelegt wurde. Gestoppt wurde die Reaktion durch Ausfällen der Proteine mit 150 µl eisgekühltem Acetonitril (für Inkubationen mit dem Substrat Amitriptylin-*N*-oxid) oder Methanol (für Inkubationen mit dem Substrat Nicotinamid-*N*-oxid). Nach Sedimentation der Proteine durch Zentrifugation (5 min bei 22 000 g) wurden die Überstände per HPLC vermessen.

Die Inkubationsansätze mit porcinen subzellulären Fraktionen enthielten je nach eingesetztem Gewebe 50 µg Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol, des postnuklearen Überstandes oder 10 µg OMV. Die Inkubationsansätze mit rekombinanten humanen Enzymen bestanden aus 7,0 µg mARC-1 (120 pmol Mo) oder mARC-2 (105 pmol Mo), 75 pmol Häm (Cyt b₅) und 7,5 pmol FAD (Cyt b₅R).

Amitriptylin-*N*-oxid wurde im Konzentrationsbereich von 0,25 - 6,0 mM eingesetzt. Standardinkubationen wurden mit einer Substratkonzentration von 3,0 mM durchge-

führt. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Amitriptylin-*N*-oxid wurde das Substrat in DMSO gelöst und dem Reaktionsansatz in einer maximalen Lösungsmittelkonzentration von 3 % hinzugefügt. Die Reaktion mit Amitriptylin-*N*-oxid wurde durch Zusatz von 1,0 mM NADH gestartet.

Nicotinamid-*N*-oxid wurde im Konzentrationsbereich von 0,25 - 6,0 mM eingesetzt. Standardinkubationen wurden mit einer Substratkonzentration von 2,0 mM durchgeführt. Die Reaktion mit Nicotinamid-*N*-oxid wurde durch Zusatz von 0,3 mM NADH gestartet.

Die apparenten enzymkinetischen Parameter K_m und v_{max} wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse mit der wissenschaftlichen Graphik- und Datenanalyse Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) berechnet.

5.4. ERGEBNISSE

5.4.1. HPLC – Quantifizierung von Amitriptylin und Nicotinamid

5.4.1.1. Kalibrierung und Wiederfindung von Amitriptylin

Das Beispielchromatogramm der in Kapitel 5.3.3.1 beschriebenen HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Amitriptylin zeigt die Detektion von Amitriptylin-N-oxid bei einer Retentionszeit von 8,8 min. Dessen Metabolit Amitriptylin konnte bei 7,6 min detektiert werden.

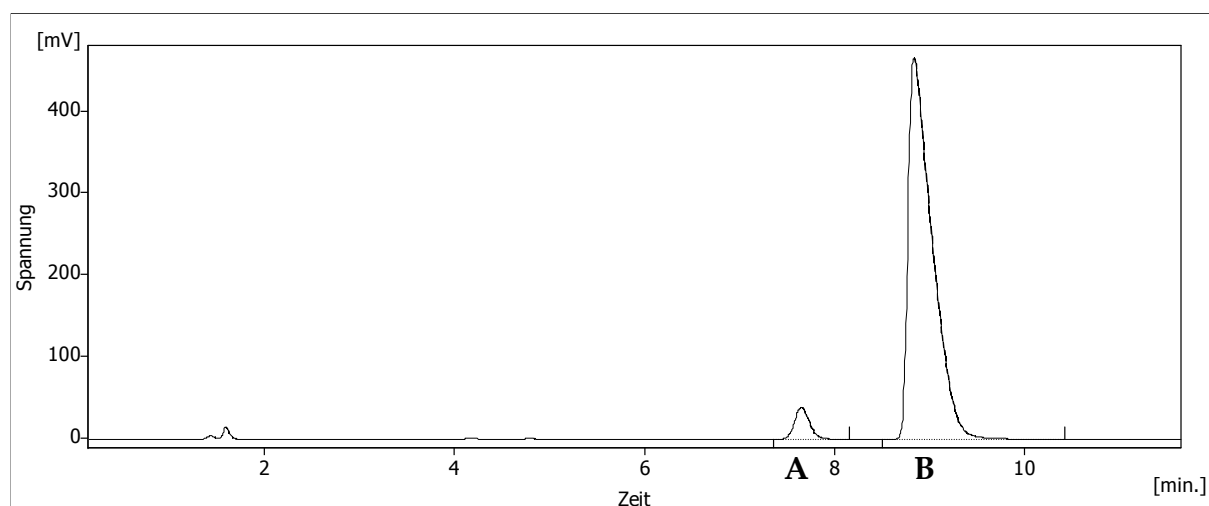


Abb. 5.4.1: Repräsentatives Chromatogramm zur Trennung und Quantifizierung von Amitriptylin und Amitriptylin-N-oxid

Dargestellt ist das HPLC-Chromatogramm der Wiederfindung bei 245 nm von 50 µM Amitriptylin (A) und 3 mM Amitriptylin-N-oxid (B)

Die Kalibrierungsgerade des Metaboliten Amitriptylin verläuft im gesamten Konzentrationsbereich von 0,1 - 100 µM linear (siehe Abb. 5.4.2). Die Wiederfindungsrate für Amitriptylin beträgt $93 \pm 8,0\%$ mit einer Bestimmungsgrenze von 1,0 µM. Zur

Berechnung der Wiederfindung wurden zuvor die Signalflächen der Verunreinigung mit Metabolit aus dem Substrat (<0,1 %) abgezogen.

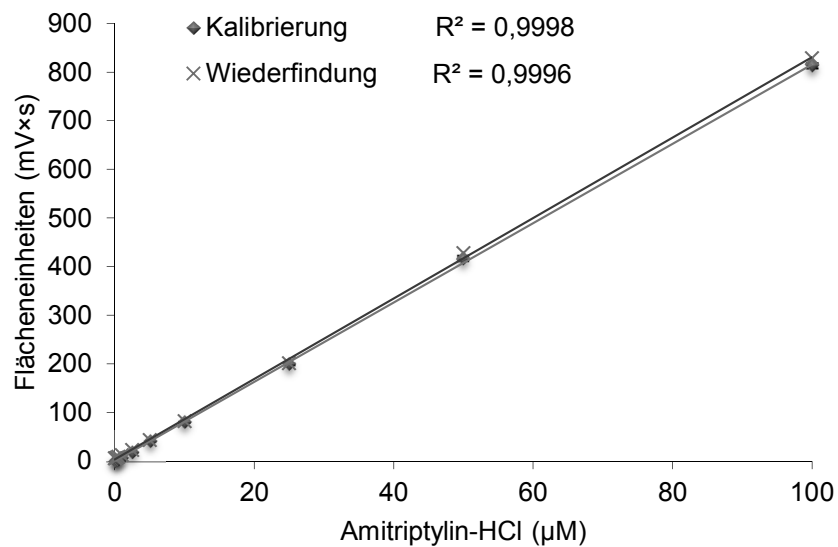


Abb. 5.4.2: Kalibrierung und Wiederfindung von Amitriptylin-HCl

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der Signalflächen und die linearen Regressionsgeraden der Kalibrierung und Wiederfindung von Amitriptylin mit dessen Bestimmtheitsmaß R^2 , die in Parallelansätzen bestimmt und jeweils doppelt vermessen wurden.

5.4.1.2. Kalibrierung und Wiederfindung von Nicotinamid

Das Beispielchromatogramm der in Kapitel 5.3.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Nicotinamid zeigt die Detektion von Nicotinamid-*N*-oxid bei einer Retentionszeit von 1,9 min. Dessen Metabolit Nicotinamid konnte bei 3,7 min detektiert werden.

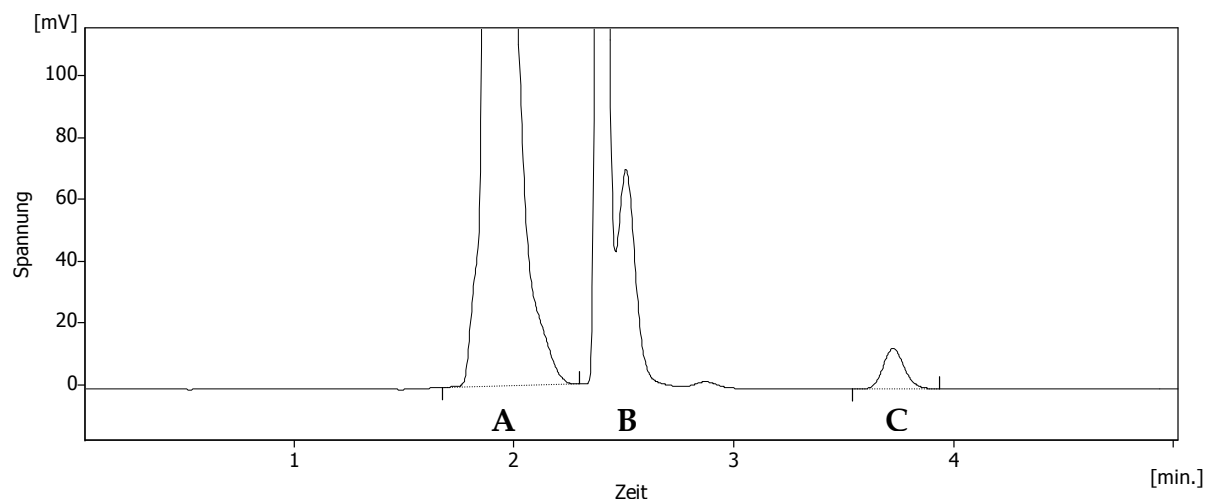


Abb. 5.4.3: Ausschnitt eines repräsentativen Chromatogramms zur Trennung und Quantifizierung von Nicotinamid und Nicotinamid-*N*-oxid

*Dargestellt ist die Detektion der Wiederfindung bei 262 nm von 50 μ M Nicotinamid (C) und 2 mM Nicotinamid-*N*-oxid (A) mit Protein und 0,3 mM NADH (B)*

Die Kalibrierungsgerade des Metaboliten Nicotinamid verläuft im gesamten Konzentrationsbereich von 0,1 - 100 μ M linear (siehe Abb. 5.4.4). Aufgrund von Verunreinigungen mit Nicotinamid aus dem Inkubationsansatz durch das Cosubstrat NADH befindet sich die Gerade der Wiederfindung oberhalb der Kalibrierung. Diese verläuft ebenfalls linear. Für die Berechnungen der Umsetzungsraten aus den *in vitro* Biotransformationsstudien wurde die lineare Regression der Wiederfindung herangezogen. Die Konzentration der Bestimmungsgrenze lag bei 1,0 μ M Nicotinamid mit einer Richtigkeit von 103 ± 5 %.

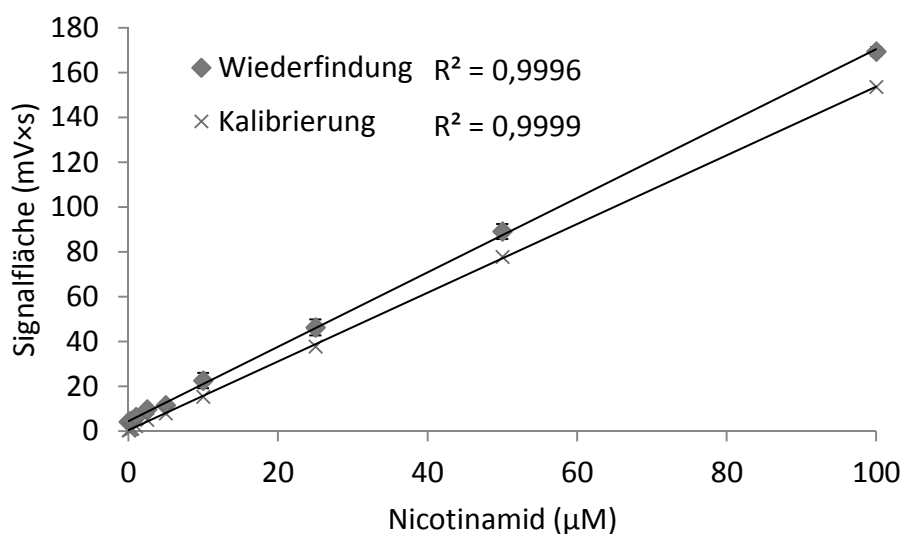


Abb. 5.4.4: Kalibrierung und Wiederfindung von Nicotinamid

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der Signalfächen und die linearen Regressionsgeraden der Kalibrierung und Wiederfindung von Nicotinamid mit dessen Bestimmtheitsmaß R^2 , die in Parallelansätzen bestimmt und jeweils doppelt vermessen wurden.

5.4.2. *In vitro* Biotransformationsstudien von Amitriptylin-N-oxid

Zur Charakterisierung der Reduktion aliphatischer N-Oxide zum korrespondierenden tertiären Amin wurde das Substrat Amitriptylin-N-oxid mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen und dem rekonstituierten, rekombinanten humanen Enzymsystem mit mARC-1 und mARC-2 inkubiert und die ermittelten Umsetzungsraten mit denen des Modellsubstrats Benzamidoxim verglichen. Es wurden der Einfluss der Inkubationszeit und der Substratabhängigkeit auf die Reduktion ermittelt.

5.4.2.1. N-Reduktion durch porcine subzelluläre Fraktionen

Die Reduktion von Amitriptylin-N-oxid durch isolierte porcine Enzymquellen wurde nach der in Kapitel 5.3.4 beschriebenen Methode durchgeführt. Tab. 5.4.1 zeigt im Vergleich die ermittelten Umsetzungsraten der Amitriptylin- und Benzamidin-Bildung.

Tab. 5.4.1: Reduktion von Amitriptylin-N-oxid zum Amitriptylin durch porcine subzelluläre Fraktionen im Vergleich zur BAO-Reduktion

porcine Enzymquelle	Amitriptylin	Benzamidin
	Spezifische Aktivität (nmol / (min × mg Protein))	
Leber Homogenat	0,2 ± 0,1	1,9 ± 0,5
Leber Mitochondrien	0,2 ± 0,1	10,0 ± 3,4
Leber Mikrosomen	0,4 ± 0,1	5,2 ± 0,6
Leber Cytosol	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Nieren Mitochondrien	0,8 ± 0,1	26,7 ± 1,2
Nieren OMV	2,8 ± 0,6	150,4 ± 15,1
ohne Protein	ND	ND

*Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw. der spezifischen Aktivitäten der Amitriptylin- und Benzamidin-Bildung aus zwei Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben. ND = nicht detektierbar
Quantifizierungslimit: 0,2 nmol Amitriptylin/(min×mg Protein)*

Die Auswertung der Inkubationsstudie zeigte, dass Amitriptylin-N-oxid durch Inkubation mit porcinen Fraktionen im Vergleich zu Benzamidoxim in nur geringem Umfang zum Amin reduziert wurde. Es konnte keine Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in den Mitochondrien der porcinen Leber detektiert werden.

Die höchste spezifische Aktivität der Amitriptylin-Bildung wurde durch Inkubation mit isolierten äußeren Membranvesikeln der Nieren gemessen. Die Umsatzrate war damit etwa um den Faktor 50 niedriger als die vergleichbare Inkubation der porcinen Nieren-OMV mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim unter identischen Bedingungen.

5.4.2.2. N-Reduktion durch das rekombinante humane Enzymsystem

5.4.2.2.1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Die Umsetzungsraten der Reduktion von Amitriptylin-N-oxid durch das rekombinante humane Enzymsystem wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelt. Abb. 5.4.5 zeigt einen proportionalen Verlauf der enzymatischen Reaktion zur Inkubationszeit im Bereich von 5 - 20 min. Längere Inkubationszeiten führten zu keiner signifikanten Steigerung der Metabolitenkonzentration. Inkubiert wurde im rekonstituierten Dreikomponentensystem mit humanem mARC-1.

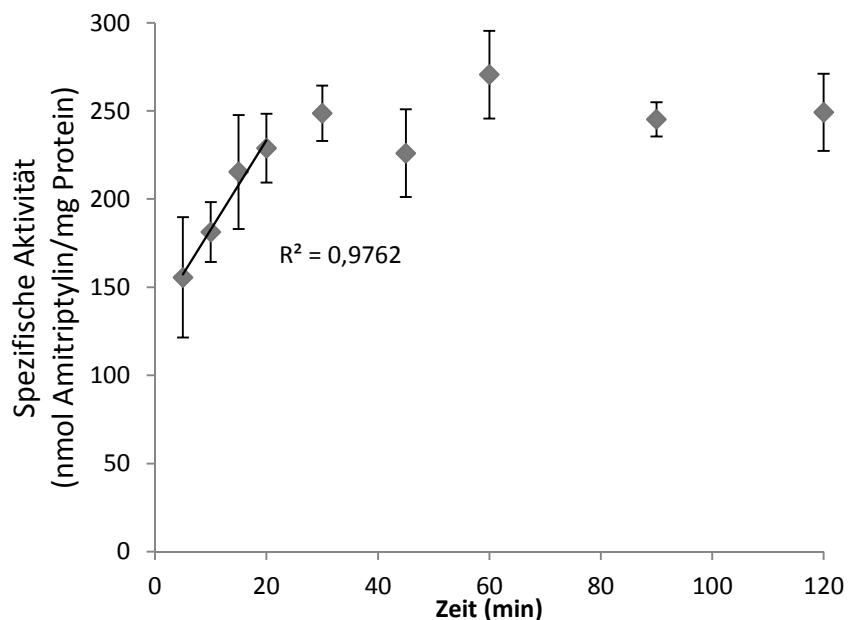


Abb. 5.4.5: Amitriptylin-N-oxid Umsetzung mit mARC-1 im rekonstituierten System in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Amitriptylin-Bildung durch Inkubation im rekombinanten Enzymsystem in Abhängigkeit von der Zeit. Inkubiert wurden Parallelansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben.

5.4.2.2.2. Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit mARC-1 und mARC-2

Zur Charakterisierung der *in vitro* Biotransformation von Amitriptylin-N-oxid mit dem rekombinanten Enzymsystem mARC-1 und mARC-2 wurden die Inkubationen wie in Kapitel 5.3.4 beschrieben durchgeführt.

Die N-Reduktion von Amitriptylin-N-oxid zum korrespondierenden tertiären Amin konnte durch Inkubation mit dem rekombinanten humanen mARC-1 im Komplettsystem mit Cyt b₅ und Cyt b₅R gezeigt werden. Jedoch verlief die Umsetzung zum Amitriptylin durch das homologe Enzym mARC-2 wesentlich langsamer und konnte mit der gemessenen Restenzymaktivität in den Kontrollansätzen, denen eine Komponente des rekonstituierten Enzymsystems fehlte, gleichgesetzt werden (Tab. 5.4.2). In Inkubationsansätzen ohne Cyt b₅ und ohne Protein konnte keine N-reduktive Aktivität detektiert werden. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die Reduktion des N-Oxids cofaktorabhängig bevorzugt mit NADH verlief.

Im Vergleich zur Umsetzung von Amitriptylin-N-oxid wurde das Modellsubstrat Benzamidoxim, unter gleichen Bedingungen inkubiert, sowohl von mARC-1 als auch von mARC-2 reduziert. Beide mARC-Homologe zeigten dabei vergleichbar hohe spezifische Aktivitäten, wobei die Umsetzung durch mARC-1 signifikant höher war. Des Weiteren ergab ein direkter Vergleich der Umsetzungsgeschwindigkeiten für die Inkubation mit mARC-1, dass Benzamidoxim um das Fünffache schneller reduziert wurde als das aliphatische N-Oxid (Tab. 5.4.2).

Tab. 5.4.2: Reduktion von Amitriptylin-N-oxid zum Amitriptylin durch das rekombinante mARC-haltige Enzymsystem im Vergleich zur BAO-Reduktion

Inkubationsansatz		Amitriptylin	Benzamidin
		Spezifische Aktivität (nmol / (min × mg Protein))	
mARC-1	Komplettansatz	37,7 ± 2,2	190,9 ± 7,4
	ohne NADH	ND	---
mARC-2	Komplettansatz	0,9 ± 0,1	168,0 ± 29,0
	ohne NADH	ND	---
ohne mARC		1,3 ± 0,1	---
Cyt b ₅		1,1 ± 0,1	---
Cyt b ₅ R		ND	---
ohne Protein		ND	---

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw. der spezifischen Aktivitäten der Amitriptylin- und Benzamidin-Bildung aus zwei Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben. Quantifizierungslimit: 0,5 nmol Amitriptylin/(min×mg Protein); ND = nicht detektierbar; --- = nicht bestimmt

5.4.2.2.3. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Es wurde die Substratabhängigkeit der Umsetzung von Amitriptylin-N-oxid zum Amitriptylin bestimmt. Die Inkubationsbedingungen wurden in Kapitel 5.3.4 beschrieben. Die von der Substratkonzentration abhängige Reduktion mit mARC-1 im Komplettansatz folgt, wie Abb. 5.4.6 zeigt, einem hyperbolen Kurvenverlauf und entspricht einer Enzymkinetik nach Michaelis-Menten. Folgende enzymkinetische Parameter wurden durch nicht-lineare Regression ermittelt: $v_{\max} = 19,3 \pm 0,9$ nmol Amitriptylin/(min \times mg Protein); $K_m = 1,37 \pm 0,15$ mM. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) lag bei $63 \text{ s}^{-1} \times \text{M}^{-1}$. Zur Berechnung wurde dabei die eingesetzte Enzymmenge auf aktives mARC (gebundenes Molybdän) bezogen.

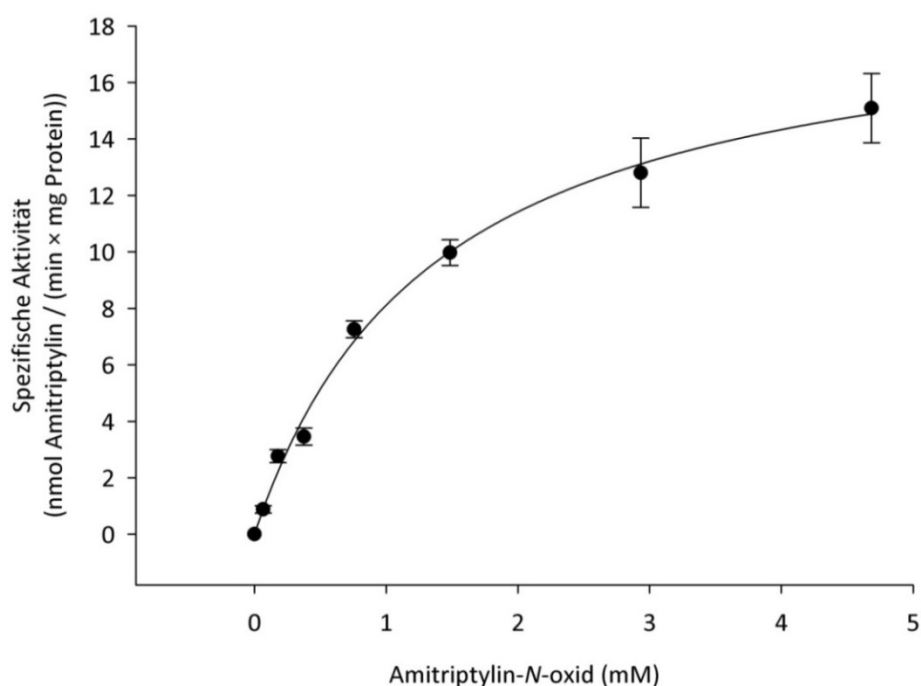


Abb. 5.4.6: Bestimmung der Substratabhängigkeit der Reduktion von Amitriptylin-N-oxid mit mARC-1 im Komplettansatz

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Amitriptylin-Bildung im rekombinanten Inkubationsansatz mit mARC-1. Inkubiert wurde in Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben. Abweichend wurden 75 pmol Mo (mARC-1) eingesetzt.

Aufgrund der in Kapitel 5.4.2.2.2 gezeigten niedrigen Umsetzungsrate des Amitriptylin-*N*-oxids durch humanes mARC-2 konnte für diese Form keine Substratabhängigkeit bestimmt werden.

5.4.3. *In vitro* Biotransformationsstudien von Nicotinamid-*N*-oxid

In dem folgenden Kapitel werden aufbauend auf den Ergebnissen zur Reduktion des aliphatischen *N*-Oxids (Amitriptylin-*N*-oxid) Untersuchungen zur *N*-Reduktion aromatischer *N*-Oxide beschrieben. Dazu wurde das Substrat Nicotinamid-*N*-oxid, wie in Kapitel 5.3.4 beschrieben, mit porcinen subzellulären Fraktionen und dem rekombinanten humanen mARC-haltigen Enzymsystem inkubiert und die ermittelten Umsetzungsraten mit den, unter vergleichbaren Bedingungen erzielten spezifischen Aktivitäten, des Modellssubstrats Benzamidoxim verglichen.

5.4.3.1. *N*-Reduktion durch porcine subzelluläre Fraktionen

In Abb. 5.4.7 sind die spezifischen Aktivitäten der enzymatischen Umsetzung der Substrate Nicotinamid-*N*-oxid und Benzamidoxim durch Inkubation mit isolierten porcinen Fraktionen aus der Leber und Niere dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das aromatische *N*-Oxid zum korrespondierenden Nicotinamid reduziert wird. Allerdings wurden nur sehr geringe Umsetzungsraten detektiert, die keine Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in Mitochondrien, wie für Benzamidoxim gezeigt, erkennen ließen. Die höchste spezifische Aktivität wurde durch Inkubation des *N*-Oxids mit den äußeren mitochondrialen Membranvesikeln aus Schweinenieren (SNOMV) bestimmt. Ein Vergleich des Ausmaßes der *N*-Reduktion von Nicotinamid-*N*-oxid mit dem Modellssubstrat Benzamidoxim zeigte unter gleichen Bedingungen, dass das *N*-Oxid um das 18-fache langsamer durch die porcine OMV-Fraktion umgesetzt wurde.

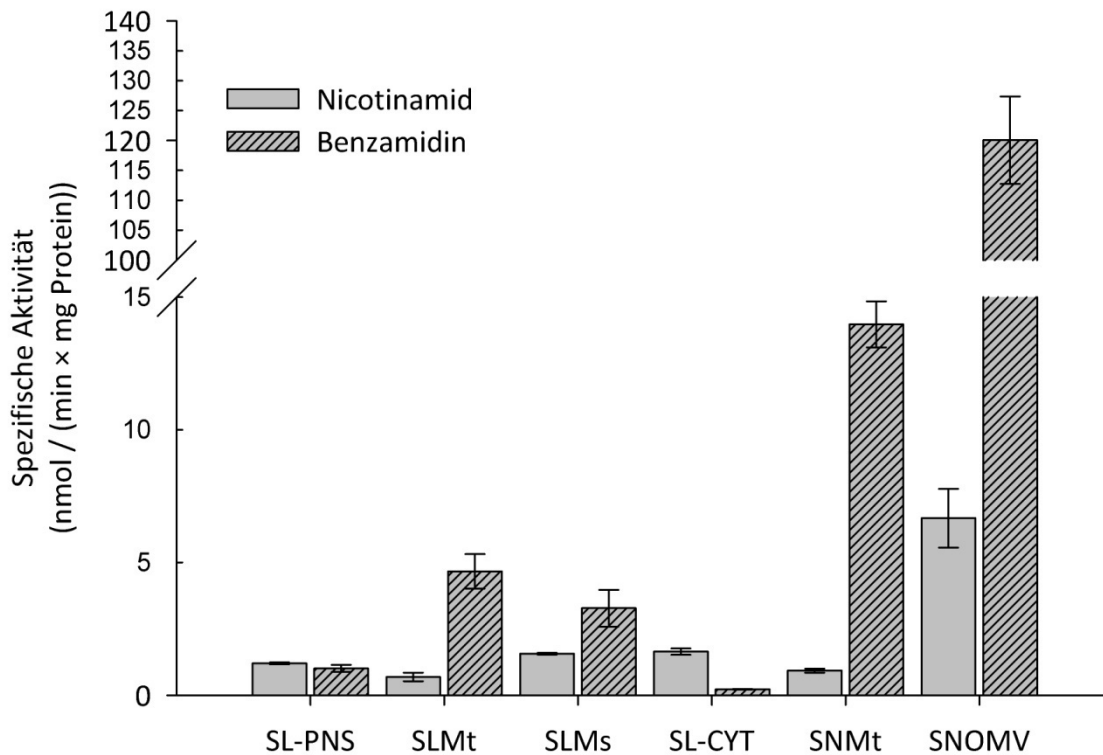


Abb. 5.4.7: Reduktion von Nicotinamid-N-oxid durch porcine subzelluläre Fraktionen und Vergleich mit Benzamidoxim

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Nicotinamid-Bildung mit porcinen subzellulären Fraktionen. Inkubiert wurde in Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben.

5.4.3.2. N-Reduktion durch das rekombinante humane Enzymsystem

5.4.3.2.1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Die Umsetzungsraten der Reduktion von Nicotinamid-N-oxid durch das rekombinante humane Enzymsystem wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelt. Abb. 5.4.8 zeigt einen proportionalen Verlauf der enzymatischen Reduktion zur Inkubationszeit im Bereich von 5 - 30 min.

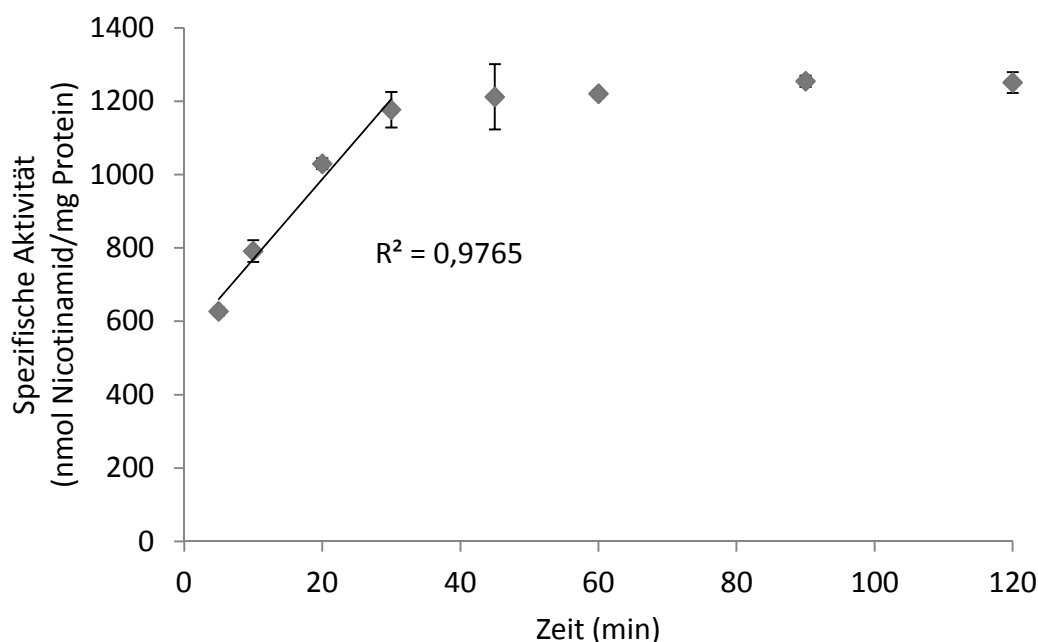


Abb. 5.4.8 Nicotinamid-N-oxid Umsetzung mit mARC-1 im rekonstituierten System in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Nicotinamid-Bildung durch Inkubation im rekombinanten Enzymsystem in Abhängigkeit von der Zeit. Inkubiert wurden Parallelansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben.

Längere Inkubationszeiten führten zu keiner signifikanten Steigerung der Metabolitenkonzentration. Inkubiert wurde im rekonstituierten Dreikomponentensystem mit humanem mARC-1. Nach einer Reaktionszeit von 15 min konnte Nicotinamid in ausreichend hoher Konzentration enzymatisch gebildet werden ($> 45 \mu\text{M}$), sodass eine valide Quantifizierung des Metaboliten ermöglicht wurde. Für alle weiteren Studien zur Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität wurde die optimierte Inkubationszeit von 15 min gewählt.

5.4.3.2.2. Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit mARC-1 und mARC-2

Zur Charakterisierung der *in vitro* Biotransformation von Nicotinamid-N-oxid mit dem rekombinanten Enzymsystem mARC-1 und mARC-2 wurden die Inkubationen unter den in Kapitel 5.3.4 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Wie in Kapitel 5.4.2.2.2 für das aliphatische N-Oxid gezeigt, wurde auch Nicotinamid-N-oxid durch Inkubation mit dem rekonstituierten humanen Enzymsystem mit mARC-1 reduziert. Für das homologe Enzym mARC-2, ebenfalls inkubiert im Komplettansatz mit den Elektronentransportproteinen Cyt b₅ und Cyt b₅R, konnten nur sehr geringe Umsatzraten ermittelt werden (Tab. 5.4.3). Kontrollansätze, denen eine oder mehrere Komponenten des Enzymsystems fehlten, zeigten keine bzw. vernachlässigbare N-reduktive Aktivität. Die *in vitro* Biotransformation von Nicotinamid-N-oxid verlief ebenfalls cofaktorabhängig mit NADH.

Vergleichsstudien wurden unter identischen Inkubationsbedingungen mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim durchgeführt. Es konnten doppelt so hohe spezifische

Aktivitäten der N-Reduktion mit humanem mARC-1 wie für das aromatische N-Oxid beobachtet werden.

Tab. 5.4.3: Reduktion von Nicotinamid-N-oxid zum Nicotinamid durch das rekombinante mARC-haltige Enzymsystem im Vergleich zur BAO-Reduktion

Inkubationsansatz	Nicotinamid	Benzamidin	
	Spezifische Aktivität (nmol / (min × mg Protein))		
mARC-1	Komplettansatz	45,2 ± 10,4	89,1 ± 2,9
	ohne NADH	ND	ND
	ohne Cyt b ₅	1,4 ± 0,1	ND
	ohne Cyt b ₅ R	ND	ND
	nur mARC	ND	ND
mARC-2	Komplettansatz	0,5 ± 0,1	62,5 ± 5,9
	ohne NADH	ND	ND
	ohne mARC	ND	ND
ohne Protein	ND	ND	

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Stabw. der spezifischen Aktivitäten der Nicotinamid- und Benzamidin-Bildung aus zwei Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben. Quantifizierungslimit: 0,5 nmol Nicotinamid/(min×mg Protein); ND = nicht detektierbar

5.4.3.2.3. *Bestimmung der Substratabhängigkeit*

Wie in Kapitel 5.4.2.2.3 für das Substrat Amitriptylin-*N*-oxid gezeigt verläuft die *N*-Reduktion von Nicotinamid-*N*-oxid ebenfalls substratabhängig nach einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Inkubationsbedingungen für die Reduktion zum Nicotinamid durch Inkubation mit mARC-1 im Komplettansatz sind in Kapitel 5.3.4 beschrieben. In Abb. 5.4.9 ist der hyperbole Kurvenverlauf der substratabhängigen enzymatischen Umsetzung gezeigt. Dazu wurden folgende enzymkinetische Parameter durch nicht-lineare Regression kalkuliert: $v_{\max} = 204,2 \pm 37,8$ nmol Nicotinamid/(min \times mg Protein); $K_m = 7,13 \pm 2,10$ mM. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) lag bei $94 \text{ s}^{-1} \times \text{M}^{-1}$. Zur Berechnung wurde dabei die eingesetzte Enzymmenge auf aktives mARC (gebundenes Molybdän) bezogen.

Aufgrund der in Kapitel 5.4.2.2.2 gezeigten niedrigen Umsetzungsrate des Nicotinamid-*N*-oxids durch humanes mARC-2 konnte keine Substratabhängigkeit bestimmt werden.

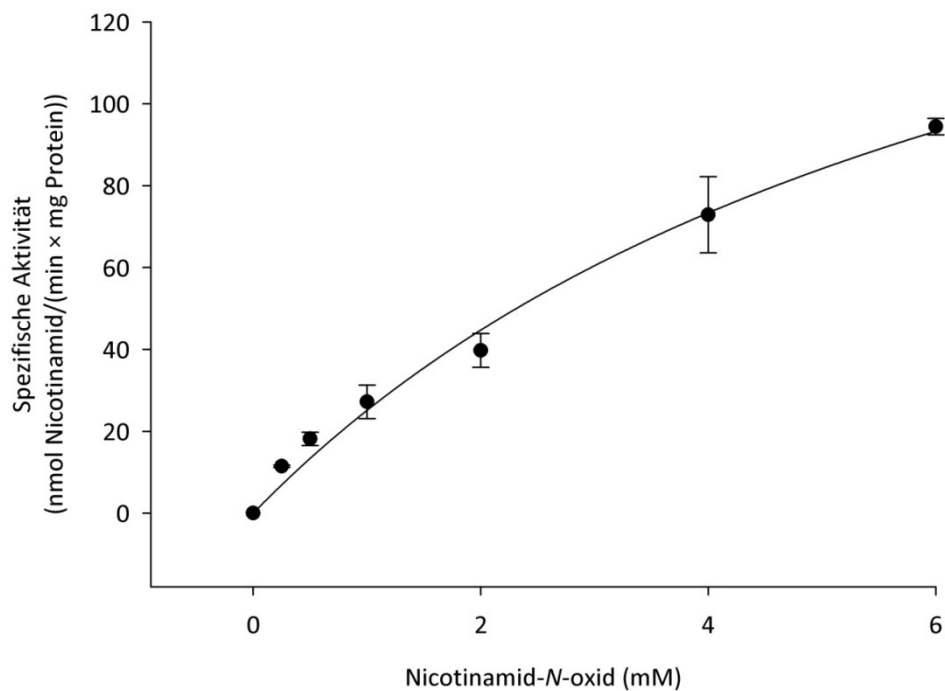


Abb. 5.4.9: Bestimmung der Substratabhängigkeit der Reduktion von Nicotinamid-N-oxid mit mARC-1 im Komplettansatz

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Nicotinamid-Bildung im rekombinanten Inkubationsansatz mit mARC-1. Inkubiert wurde in Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 5.3.4 beschrieben.

5.5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals sowohl für tertiäre aliphatische als auch für heterocyclische aromatische Amin-*N*-oxide eine enzymatische mARC-abhängige Reduktion zu den korrespondierenden Aminen nachgewiesen werden.

Bisherige literaturbeschriebene Reduktionen des Amitriptylin-*N*-oxid zum tertiären Amin durch Gewebehomogenate zeigten sich sauerstoffsensitiv und konnten überdies nur partiell durch Hitze inaktiviert werden (Bickel, 1972, Breyer-Pfaff, 2004, Takekawa *et al.*, 2001a). Ähnliche Literaturdaten bezüglich des Sauerstoffeinflusses lagen für die Reduktion von Nicotinamid-*N*-oxid zum Nicotinamid vor (Kitamura und Tatsumi, 1984). Aerobe, enzymatisch-katalysierte und damit physiologisch relevante Reduktionen von *N*-Oxiden konnten bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Interessanterweise wurde aber gezeigt, dass die Molybdoenzyme Xanthinoxidoreduktase und Aldehydoxidase *in vitro* die Reduktion von verschiedenen *N*-Oxiden katalysieren, allerdings war auch hier die Reduktion meist sauerstoffsensitiv. (Murray und Chaykin, 1966b, Kitamura und Tatsumi, 1984b, Kitamura *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 2011).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der *N*-Oxide mit anderen mARC-Substraten wurden zunächst aerobe Inkubationen mit subzellulären Fraktionen aus dem Schwein durchgeführt. Für beide Substrate konnte die NADH-abhängige Reduktion zum tertiären Amin unter aeroben Bedingungen durch porcines Leberhomogenat nachgewiesen werden. Die gebildeten tertiären Amine wurden dabei mittels neu entwickelter HPLC-Methoden quantifiziert.

Eine sonst für das molybdänabhängige Enzymsystem typische Anreicherung der Reduktaseaktivität in Mitochondrien konnte nicht nachgewiesen werden. Außerdem wurden für beide Substrate auch in den anderen getesteten subzellulären Fraktionen keine deutlichen Anreicherungen gemessen. Daher sollte beachtet werden, dass die

durchgeführten Metabolismusstudien zur N-Oxid-Reduktion mit isolierten subzellulären Fraktionen eine etwa 50-fach geringere Umsetzungsrate im Vergleich zu anderen Testsubstraten wie Benzamidoxim zeigten. Aus den gemessenen kleinen Werten ergaben sich möglicherweise Messungenauigkeiten, die eine Berechnung von Anreicherungsfaktoren erschwerten.

Es konnte allerdings für beide Substrate eine typische Anreicherung der N-Oxid-Reduktion in der äußeren mitochondrialen Membranfraktion, verglichen mit der in der mitochondrialen Fraktion, gezeigt werden. Die Anreicherungsfaktoren entsprechen dabei denen der mARC-typischen Benzamidoxim-Reduktion. Das für die NADH-abhängige N-Oxid-Reduktion verantwortliche Enzymsystem muss somit auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert sein.

Um zu verifizieren, dass es sich hierbei um das mARC-abhängige Enzymsystem handelt, wurden Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC-haltigen Enzymsystem durchgeführt. Für beide Substrate konnte die mARC-abhängige Reduktion zum Amin eindeutig nachgewiesen werden. Wie für isolierte Enzyme typisch, lagen die Umsetzungsraten des rekonstituierten Enzymsystems deutlich über den gemessenen Umsetzungsraten der subzellulären Fraktionen. Inkubationsstudien des rekonstituierten Enzymsystems mit humanem mARC-2 lieferten dabei erstaunlicherweise vernachlässigbar geringe spezifische Aktivitäten von weniger als $1 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Die Präferenz von mARC-1 für N-hydroxylierte Substrate ist bereits in vorherigen Studien gezeigt worden, allerdings wurde bisher noch nie so eindeutig eine mARC-1-spezifische Substratklasse ermittelt. Während das Amidoximderivat Benzamidoxim bisher als Markersubstrat für beide mARC-Proteine verwendet wurde, können N-Oxide somit künftig als spezifisches Markersubstrat für humanes mARC-1 verwendet werden. Sie stellen damit ein wertvolles analytisches Instrument dar, welches z.B. für die Analyse der mARC-1-spezifischen Gewebe- und

Speziesverteilungen oder für Regulationsstudien in der Zellkultur eingesetzt werden kann.

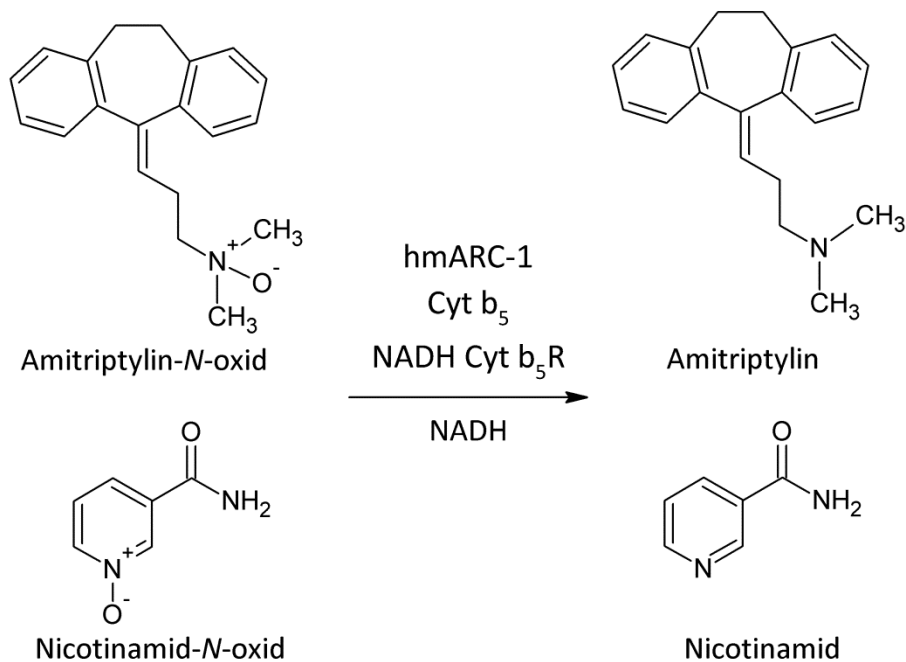


Abb. 5.5.1: Enzymatische N-Reduktion aliphatischer und aromatischer N-Oxide durch das humane Isoenzym mARC-1

Havemeyer (2006) konnte erstmals die für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen verantwortliche dritte Komponente aus der äußeren mitochondrialen Membran von Schweinelebern isolieren und durch massenspektrometrische Analyse der Proteinfragmente, mit anschließendem Abgleich in Sequenzdatenbanken, als MOSC2 (mARC-2) identifizieren. Interessanterweise konnten in Immunblotanalysen früherer Untersuchungen mit Schweinelebermitochondrien beide mARC-Formen in Mitochondrien nachgewiesen werden, aber nur die porcine mARC-2 Form wurde in der äußeren mitochondrialen Membran (OMV-Fraktion) angereichert (Gabel *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass porcines mARC-2 vorwiegend an der aeroben Reduktion der *N*-Oxide beteiligt ist. Dies steht im Widerspruch zu den mit den humanen Enzymen erhobenen Daten. Es ist daher denkbar, dass abhängig von der Spezies mARC-1 oder mARC-2 für die Reduktion von *N*-Oxiden verantwortlich

ist. Weiterführende Arbeiten mit subfraktionierten Mitochondrien aus humanem Gewebe sollten daher prüfen, ob humanes mARC-1 in der OMV-Fraktion angereichert ist. Darüber hinaus sollten sich weiterführende Studien mit der Aufklärung mARC-2-spezifischer Substrate beschäftigen.

Neben der spezifischen Reduktion beider *N*-Oxide durch nur eine mARC-Form fällt beim Vergleich der v_{\max} -Werte auf, dass die Reduktion des aromatischen, heterocyclischen *N*-Oxids ca. zehnmal schneller verläuft als die des aliphatischen *N*-Oxids. Allerdings ist der K_m -Wert für das Nicotinamid-*N*-oxid etwa fünffach höher, was für eine geringere Substrataffinität spricht. Gründe für die unterschiedlichen Umsetzungsgeschwindigkeiten können im Mechanismus der *N*-Reduktion begründet sein. Es wird eine Spaltung der *N*-*O*-Bindung postuliert (Havemeyer *et al.*, 2011). Diese könnte in einem heterocyclischen *N*-Oxid wie beim Nicotinamid-*N*-oxid leichter ablaufen als in einem tertiären *N*-Oxid.

Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die *in vitro* Reduktion mit den verschiedenen Enzymquellen durch den Ausschluss von Sauerstoff noch gesteigert werden kann, denn Veröffentlichungen zu Biotransformationsstudien von *N*-Oxiden zeigten häufig, dass die *N*-reduktive Aktivität durch Sauerstoff inhibiert wurde (Kitamura *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 2011). Geeignete Kontrollen mit hitzedenaturierten Enzymquellen sollten als Vergleich mit in die Versuchsreihen eingeschlossen werden, um nichtenzymatische Katalysen auszuschließen.

6. BIOTRANSFORMATION VON HYDROXAMSÄUREN

6.1. EINLEITUNG

Hydroxamsäuren sind chemische Verbindungen, die durch Acylierung von Carbonsäurehalogeniden, Carbonsäureestern oder Carbonsäureanhydriden mit Hydroxylamin entstehen. Sie besitzen sowohl in fester Form als auch in Lösung folgende allgemeine Struktur (Bauer und Exner, 1974):

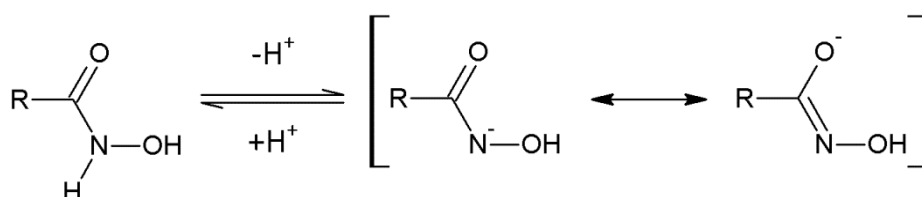


Abb. 6.1.1: Struktur der Hydroxamsäure und des gebildeten Anions nach Dissoziation (modifiziert nach Bauer und Exner, 1974)

Eine weitere Eigenschaft von Hydroxamsäuren ist die relativ hohe Acidität. Diese ist im Vergleich zu den neutralen Amiden um etwa 6 pK-Einheiten höher (Bauer und Exner, 1974). Die Dissoziation zum Hydroxamsäureanion zeigt Abb. 6.1.1. Durch säure- und basenkatalysierte Hydrolyse lassen sich Hydroxamsäuren leicht in ihre korrespondierenden Carbonsäuren überführen (Ahmad *et al.*, 1974). Anhand der chemischen Struktur werden sie in aromatische, heterocyclische und aliphatische Hydroxamsäuren eingeteilt (siehe Abb. 6.1.2).

Verbindungen mit Hydroxamsäuren als funktioneller Gruppe verfügen über ein breites Spektrum an biologischer Aktivität. Einige aliphatische Hydroxamsäuren sind als toxische Metaboliten von Arylamiden wie z.B. 2-Acetylaminofluoren und 2-Formylaminofluoren bekannt. Diese haben ein hohes carcinogenes Potential (Lotlikar *et al.*, 1965, Sugihara *et al.*, 2000).

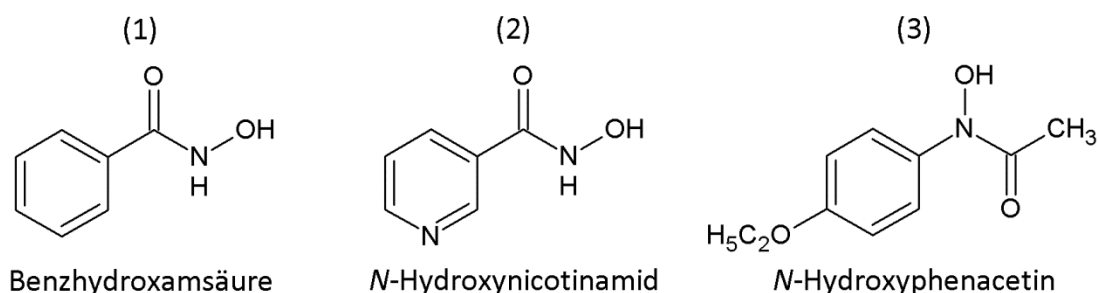


Abb. 6.1.2: Beispiele für aromatische (1), heterocyclische (2) und aliphatische (3) Hydroxamsäuren

Pharmakologisch werden Arzneistoffe mit Hydroxamsäurefunktion und deren Derivate für eine Reihe von Indikationen eingesetzt. Cycloserin, ein cyclisches Hydroxamsäurederivat, bzw. dessen Prodrug Terizidon werden in der Tuberkulose-therapie als Antibiotika verwendet (Mutschler *et al.*, 2008). Das nichtsteroidale Antiphlogistikum Bufexamac wurde bei Dermatitiden in der Lokalthherapie eingesetzt, ist aber aufgrund häufig auftretender allergischer Reaktionen seit 2010 nicht mehr in Deutschland zugelassen (AMK-Information 19/2010).

In der klinischen Entwicklung befinden sich zahlreiche Hydroxamsäurederivate mit antitumoraler Wirkung. Vertreter dieser Verbindungen gehören zu der Klasse der Matrix-Metalloproteinase- und der Histon-Desacetylase-Inhibitoren (Saban und Bujak, 2009). Die Hemmstoffe der zinkabhängigen Histon-Desacetylasen beeinflussen unter anderem die Tumorangio-genese und Metastasierung und zeigen immunmodulierende Effekte durch Aktivierung der Bildung von Oberflächenantigenen zur Erkennung von Fremdproteinen. Die Enzymhemmung wird dabei durch eine Chelatkomplexbildung mit dem im aktiven Zentrum befindlichen Zinkion vermittelt (Wagner, 2011). Bereits von der FDA zugelassen ist der Histon-Desacetylase-Inhibitor Vorinostat, der zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms eingesetzt wird (Saban und Bujak, 2009). Weitere Inhibitoren mit

Hydroxamsäurestruktur befinden sich in Phase III der klinischen Prüfungen (Wagner, 2011).

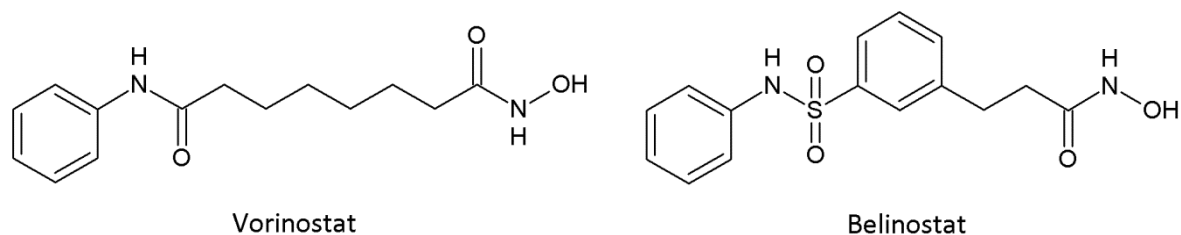


Abb. 6.1.3: Hydroxamsäuren als Vertreter der Histon-Desacetylase-Inhibitoren

Hydroxamsäuren unterliegen der Biotransformation. Sowohl die enzymatische oxidative *N*-Hydroxylierung von Arylamiden und damit die Aktivierung von Carcinogenen als auch die *N*-Reduktion zum korrespondierenden Amid sind von großem pharmakologischen und toxikologischen Interesse (Irving, 1964, Lotlikar *et al.*, 1965). Die enzymatische Reduktion spielt eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Carcinogenen. Bei der klinischen Entwicklung neuer Arzneistoffkandidaten mit Hydroxamsäuregruppen muss mit einer möglichen Inaktivierung durch enzymatische Reduktion gerechnet werden. Die Charakterisierung an der *N*-Reduktion beteiligter Enzymsysteme ist Gegenstand zahlreicher Publikationen.

So konnte bereits Lowenthal (1954) zeigen, dass Salicylhydroxamat *in vitro* durch Leberhomogenat aus der Ratte enzymatisch zum Salicylamid reduziert wird. Des Weiteren veröffentlichten Hirsch und Kaplan (1961) die Umsetzung von *N*-Hydroxynicotinamid zum Nicotinamid durch Lebermitochondrien aus der Maus und Bernheim (1965) die Reduktion von Anthranilhydroxamat durch Ratten- und Mäuseleber. Außerdem wurde berichtet, dass ein Enzymsystem aus gereinigter Kaninchenleber für die Reduktion von *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren, einer aliphatischen Hydroxamsäure, verantwortlich ist (Kitamura und Tatsumi, 1985). Ein Enzymsystem, das an der Reduktion von Hydroxamsäuren beteiligt ist, konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht identifiziert werden. Erst Studien von Kitamura, Sugihara

und Tatsumi zeigten die Fähigkeit der Aldehydoxidase in Gegenwart eines Elektronendonators zur Reduktion von verschiedenen Hydroxamsäuren, wie z.B. Salicylhydroxamat, Benzhydroxamsäure, Anthranilhydroxamat, *N*-Hydroxynicotinamid und *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (Kitamura *et al.*, 1994, Sugihara *et al.*, 1983, Sugihara und Tatsumi, 1986). Außerdem konnten sie aus dem Lebercytosol von Ratten und Kaninchen andere Hydroxamsäurereduktasen wie die *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren- und die Salicylhydroxamatreduktase isolieren (Katsura *et al.*, 1993, Kitamura und Tatsumi, 1985). Die isolierten Reduktasen zeigten eine hohe Substratspezifität. So war die *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluorenreduktase in der Lage, abhängig von den Elektronendonatoren Cystein, Glutathion, NADH oder NADPH, die Reduktion von aliphatischen Hydroxamsäuren zu katalysieren, nicht aber von aromatischen oder heterocyclischen (Kitamura und Tatsumi, 1985). Die Salicylhydroxamatreduktase war dagegen hoch spezifisch gegenüber dem Substrat Salicylhydroxamat und setzte dieses cofaktorabhängig mit NAD(P)H um (Kitamura und Tatsumi, 1985). Ein weiteres an der Reduktion von aliphatischen Hydroxamsäuren beteiligtes Enzymsystem konnte im Blut von Kaninchen identifiziert werden (Sugihara *et al.*, 2000). Die Reduktion wird katalysiert durch Hämoproteine zusammen mit NAD(P)H und FAD und verläuft dabei in zwei Schritten (siehe Abb. 6.1.4). Zunächst erfolgt die Reduktion des Flavins durch reduzierte Pyridinnukleotide. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die nichtenzymatische Reduktion der Hydroxamsäure durch den Hämrest des Kaninchen-Hämoglobins in Abhängigkeit des reduzierten Flavins (Sugihara *et al.*, 2000). Ein ähnlicher Mechanismus konnte für die Reduktion von Amin-*N*-oxiden identifiziert werden (siehe Kapitel 5.1.3.1). Eine Reduktion durch Kaninchenblut von aromatischen und heterocyclischen Hydroxamsäuren konnte nicht beobachtet werden (Sugihara *et al.*, 2000). Eine zentrale Rolle spielt auch die mikrosomale Reduktion in der Leber. Kitamura *et al.* (1999b) postulierten ebenfalls eine nichtenzymatische anaerobe Reduktion von *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren zum

korrespondierenden Amid durch CYP 450 aus Rattenlebermikrosomen (Kitamura *et al.*, 1999b). Dabei erfolgte die Reduktion auch in einem zweistufigen Mechanismus. Im ersten Schritt katalysierten die NADPH-CYP 450 Reduktase und die NADH-Cyt b₅R enzymatisch die Reduktion des Flavins FAD, das anschließend nichtenzymatisch zusammen mit der Hämgruppe des CYP 450 das *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren reduzierte. In denaturierten Mikrosomen erfolgte die Flavinreduktion durch NAD(P)H nichtenzymatisch (Kitamura *et al.*, 1999b).

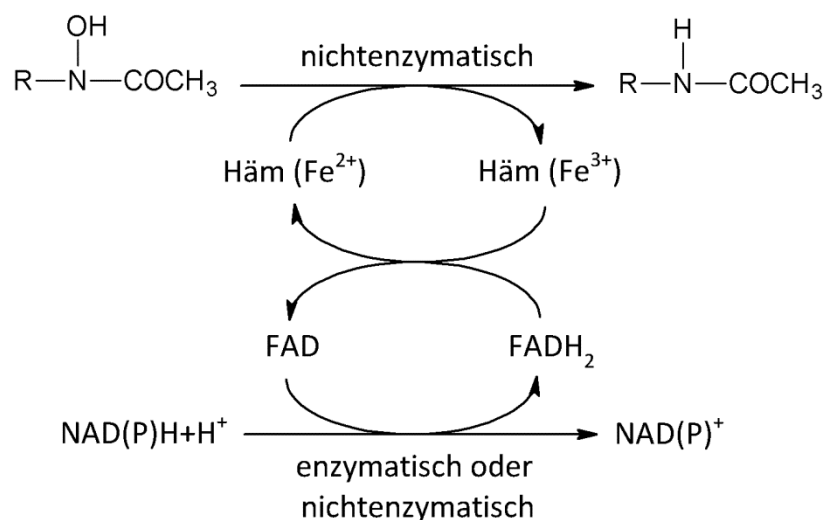


Abb. 6.1.4: Postulierter Mechanismus der Hydroxamsäure-Reduktion durch Blut (nach Sugihara *et al.*, 2000)

In neueren *in vitro* Biotransformationsstudien von Amschler (2004) konnte die Reduktion von Benzhydroxamsäure zum Benzamid bevorzugt durch mitochondriale Enzympräparationen gezeigt werden. Dabei ergab die nähere Charakterisierung der Reaktion, dass diese sauerstoffunempfindlich ablief und cofaktorabhängig mit NADH katalysiert wurde.

6.2. ZIELSETZUNG

In weiteren Studien sollte aufbauend auf den Untersuchungen von Amschler (2004) die Reduktion von Hydroxamsäuren am Beispiel der Benzhydroxamsäure näher charakterisiert werden. Die hohen Umsetzungsraten in Mitochondrien und die sauerstoffinsensitive, NADH-abhängige Reaktion gaben Anlass anzunehmen, dass die aromatische Hydroxamsäure ein Substrat des von Havemeyer (2006) vollständig aufgeklärten, molybdänhaltigen Enzymsystems ist.

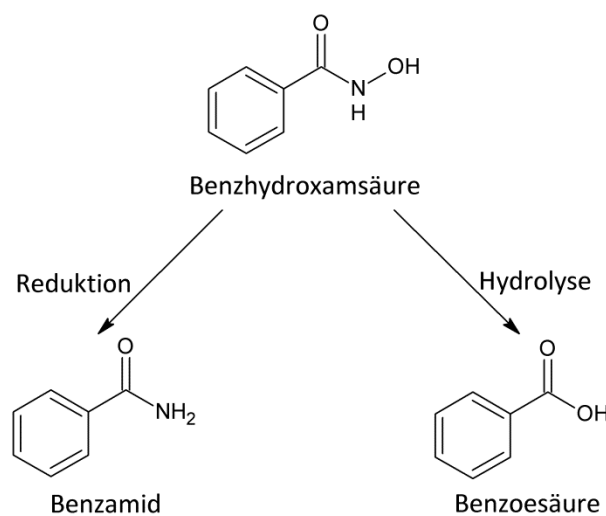


Abb. 6.2.1: Metabolismus der Benzhydroxamsäure (nach Amschler, 2004)

Die durch HPLC-Analyse bestimmten Umsetzungsraten der Hydroxamsäurereduktion sollten im Anschluss mit denen des Markersubstrats Benzamidoxim für das mARC-haltige Enzymsystem verglichen werden. Die in vorherigen Experimenten von Amschler (2004) beobachtete cofaktorunabhängige Hydrolyse von Hydroxamsäuren zur korrespondierenden Carbonsäure sollten in parallelen Inkubationen ebenfalls erfasst werden.

Weitere Studien mit dem rekonstituierten rekombinanten humanen Enzymsystem bestehend aus Cyt b₅, der NADH Cyt b₅R und mARC sollten abschließend zeigen, ob die Substanzklasse der Hydroxamsäuren Substrate für das Enzym mARC sind.

6.3. METHODEN

6.3.1. Materialien und Geräte

Eine Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Geräte befindet sich am Ende der vorliegenden Arbeit in Kapitel 9.

6.3.2. Proteinquellen

Für *in vitro* Biotransformationsstudien wurden sowohl rekombinante humane Proteine des Dreikomponentenenzymystems mit mARC, Cyt b₅ und der NADH Cyt b₅R als auch isolierte subzelluläre Fraktionen aus porcinen Organen verwendet. Die Gewinnung und Charakterisierung der Enzymquellen ist in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Alle Untersuchungen erfolgten mit einheitlichen Enzymchargen.

6.3.3. HPLC-Analytik zur Trennung von Benzhydroxamsäure, Benzamid und Benzoessäure

Die Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Benzhydroxamsäure und deren Metaboliten Benzamid und Benzoessäure wurde in Anlehnung an die Methode von Amschler (2004) mit dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenen HPLC-System durchgeführt. Es wurden folgende Bedingungen zur Chromatographie mittels Ionenpaarreagenz gewählt:

Stationäre Phase:	Phenomenex Gemini NX C 18 (5 μm) 150 \times 4 mm (110 \AA), Vorsäule C 18 4 \times 4 mm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg)	
Säulenofentemperatur:	25°C	
Mobile Phase:	50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 10 mM Tetramethylammoniumchlorid / Acetonitril 90:10 (v/v)	
Flussrate:	1,0 ml/min, isokratisch	
Laufzeit:	14 min	
Injektionsvolumen:	10 μl	
Detektion:	UV, 210 nm	
Retentionszeiten:	Benzhydroxamsäure:	5,0 \pm 0,1 min
	Benzamid:	8,0 \pm 0,1 min
	Benzoessäure:	12,1 \pm 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde zuvor durch Vakuumfiltration durch einen Whatmann® Membranfilter 0,45 μm von Partikeln befreit.

Zur Validierung der HPLC-Methode wurde eine 10-Punkt-Kalibrierung mit den synthetischen Metaboliten Benzamid und Benzoessäure in definierten Konzentrationen im Bereich von 0,1-250 μM durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungen zu gleichen Teilen in 20 mM MES-Pufferlösung pH 6,0 und Acetonitril hergestellt und per HPLC analysiert. Entsprechend der Kalibrierung wurden die gleichen Konzentrationen zur Bestimmung der Wiederfindung gewählt. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 3 mM Benzhydroxamsäure, 1 mM NADH und 50 μg denaturierte Schweinelebermitochondrien, die zuvor 10 min bei 100°C im Wasserbad abgekocht wurden. Das Gesamtvolumen betrug 150 μl . Nach 18-minütiger Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden die Proben zu gleichen Teilen mit eisgekühltem Acetonitril versetzt, 5 min geschüttelt und anschließend 5 min bei 22 000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden mittels HPLC vermessen.

6.3.4. Zusammensetzung der Inkubationsansätze

In vitro Biotransformationsstudien zur Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität der Benzhydroxamsäure wurden mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen sowie dem rekonstituierten, rekombinanten humanen Enzymsystem unter standardisierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. Inkubiert wurde wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad bei 37°C. Die Inkubationsansätze setzten sich zusammen aus Substrat und Protein gelöst in Puffer mit einem Gesamtvolumen von 150 µl. Nach dreiminütiger Vorinkubation bei 37°C wurden die Reaktionen mit 1,0 mM NADH gestartet. Die Inkubation wurde durch Ausfällen der Proteine mit 150 µl eisgekühltem Acetonitril gestoppt. Nach Sedimentation der Proteine durch Zentrifugation (22 000 *g*, 5 min) wurden die Überstände per HPLC vermessen. Die gebildeten Metabolite Benzamid und Benzoessäure wurden quantifiziert.

6.3.4.1. Inkubation mit porcinen subzellulären Fraktionen

Die Inkubationsansätze mit porcinen subzellulären Fraktionen enthielten je nach eingesetztem Gewebe 50 µg Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol sowie 50 µg des postnuklearen Überstands und 10 µg OMV. Zum Inkubationsansatz wurde die Benzhydroxamsäure, gelöst in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, in einer Endkonzentration von 3,0 mM hinzugefügt. Die Dauer der Inkubation betrug unter optimierten Bedingungen 15 min.

6.3.4.2. Inkubation mit dem rekombinanten Enzymsystem

Die Inkubationsansätze mit rekombinanten humanen Enzymen bestanden aus 7,5 µg mARC-1 (125 pmol Mo) oder mARC-2 (110 pmol Mo), 75 pmol Häm (Cyt b₅) und 7,5 pmol FAD (Cyt b₅R). Zum Inkubationsansatz wurde die Benzhydroxamsäure, gelöst in 20 mM MES-Puffer pH 6,0, in einer Endkonzentration von 3,0 mM hinzugefügt. Die Dauer der Inkubation betrug unter optimierten Bedingungen 15 min.

6.3.4.3. Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Zur Bestimmung des Einflusses der Inkubationszeit auf die *N*-reduktive Aktivität wurden 50 µg porcine Lebermitochondrien und rekombinantes humanes mARC-2 im Komplettansatz mit Cyt b₅ und Cyt b₅R unter den zuvor beschriebenen Bedingungen inkubiert. Es wurden Inkubationszeiten zwischen 5 und 120 min gewählt.

6.3.4.4. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Zur Bestimmung des Einflusses der Substratkonzentration auf die enzymatische Reduktion von Benzhydroxamsäure wurden 50 µg porcine Lebermitochondrien und rekombinantes humanes mARC-1 und mARC-2 im Komplettansatz mit Cyt b₅ und Cyt b₅R unter den zuvor beschriebenen Bedingungen inkubiert. Das Substrat wurde in Konzentrationen von 0,1 - 6,0 mM zum Inkubationsansatz hinzugefügt. Die apparenten enzymkinetischen Parameter K_m und v_{max} wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse mit der wissenschaftlichen Graphik- und Datenanalyse Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) berechnet.

6.4. ERGEBNISSE

6.4.1. HPLC - Quantifizierung von Benzamid und Benzoessäure

Das Beispielchromatogramm der in Kapitel 6.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamid und Benzoessäure zeigt die Detektion der Benzhydroxamsäure bei einer Retentionszeit von 5,0 min. Dessen Metabolit Benzamid konnte bei 8,0 min und die Benzoessäure bei 12,1 min detektiert werden.

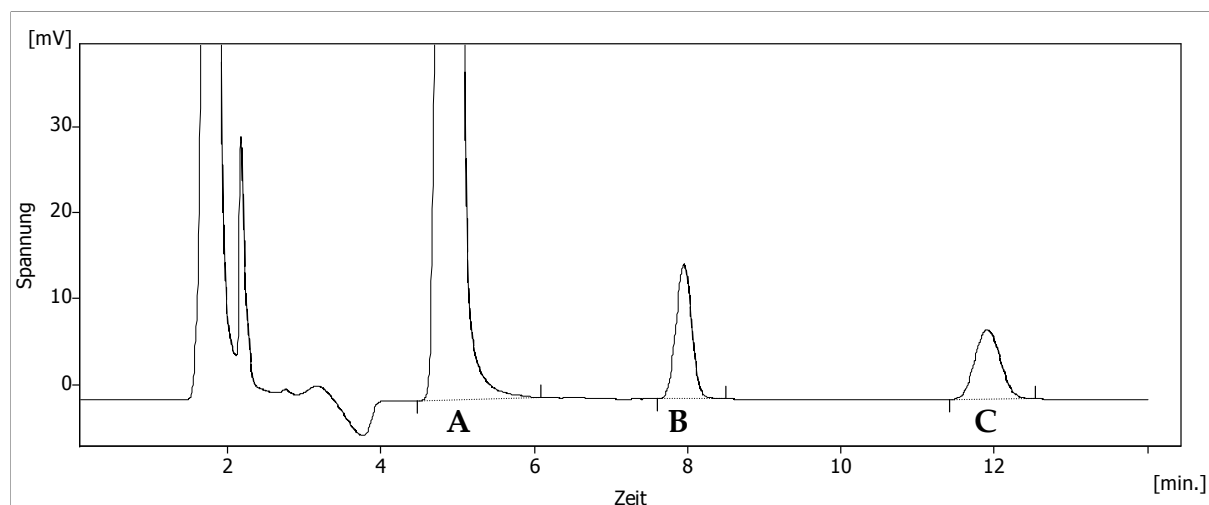


Abb. 6.4.1: Repräsentatives Chromatogramm zur Detektion von Benzhydroxamsäure, Benzamid und Benzoessäure

Dargestellt ist die Detektion der Wiederfindung bei 210 nm mit 3 mM Benzhydroxamsäure (A), 50 μ M Benzamid (B) und 50 μ M Benzoessäure (C).

Die Kalibrierungsgeraden der Metaboliten Benzamid und Benzoessäure verlaufen im gesamten Konzentrationsbereich von 0,5 - 250 μ M linear (siehe Abb. 6.4.2). Für Benzamid wurde eine Wiederfindungsrate von $105 \pm 5\%$ und eine Bestimmungsgrenze von 1,0 μ M ermittelt. Die Wiederfindungsrate für Benzoessäure betrug $94 \pm 4\%$ mit einer Bestimmungsgrenze von 2,5 μ M. Zur Berechnung der Wiederfindung für Benzoessäure wurden zuvor die Signalflächen der Verunreinigung ($<0,1\%$) mit Metaboliten aus dem Substrat subtrahiert.

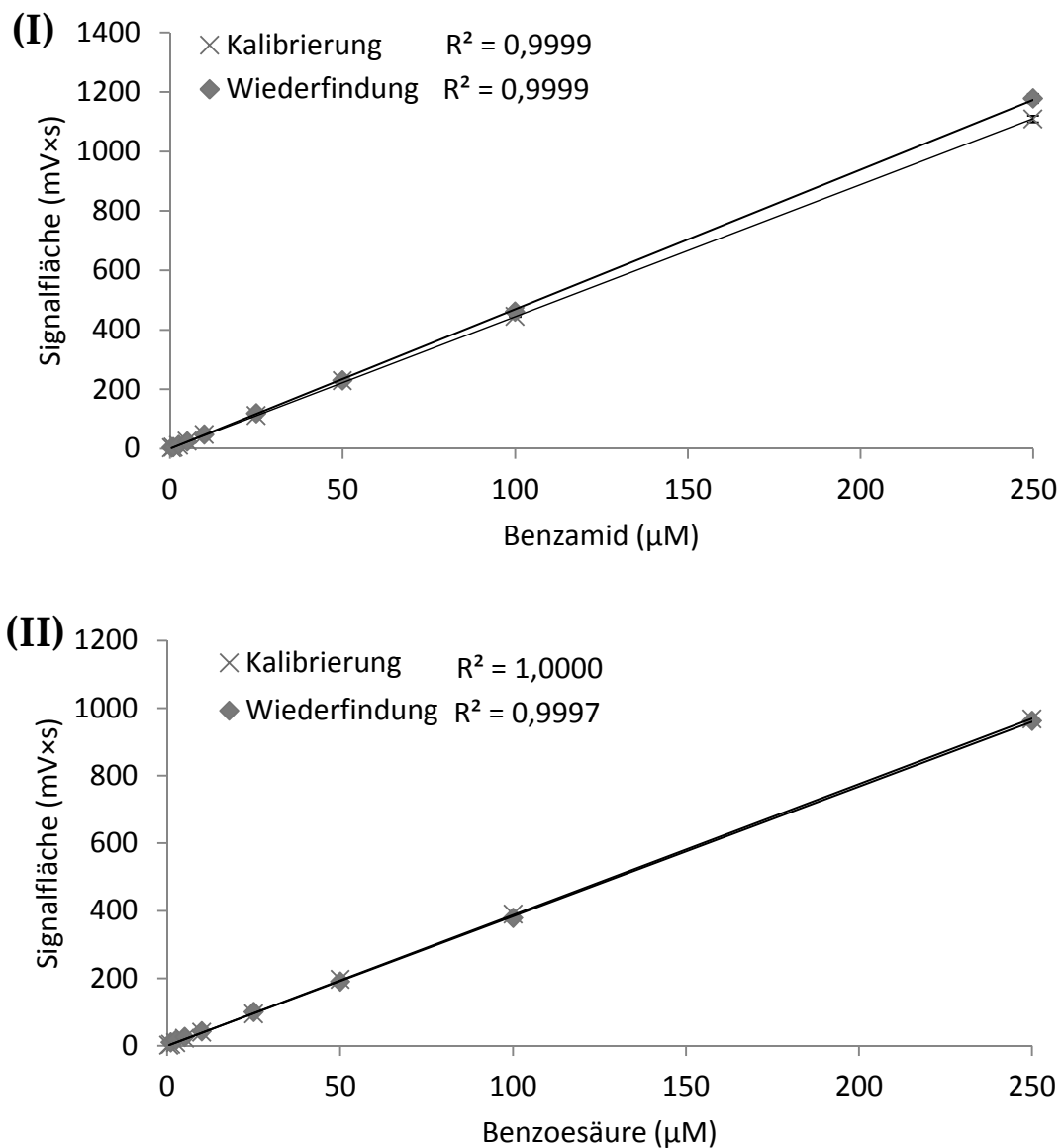


Abb. 6.4.2: Kalibrierung und Wiederfindung von Benzamid und Benzoessäure

Dargestellt sind die linearen Regressionsgeraden der Kalibrierung und Wiederfindung von Benzamid (I) und Benzoessäure (II) mit deren Bestimmtheitsmaß R^2 , die in Parallelansätzen jeweils doppelt vermessen wurden. Die Signalflächen der Benzoessäure-Wiederfindung wurden um die im Substrat enthaltenen Verunreinigungen mit Metaboliten subtrahiert.

6.4.2. N-Reduktion durch isolierte porcine subzelluläre Fraktionen

6.4.2.1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Zur Ermittlung des linearen Bereichs der N-Reduktion der Benzhydroxamsäure wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

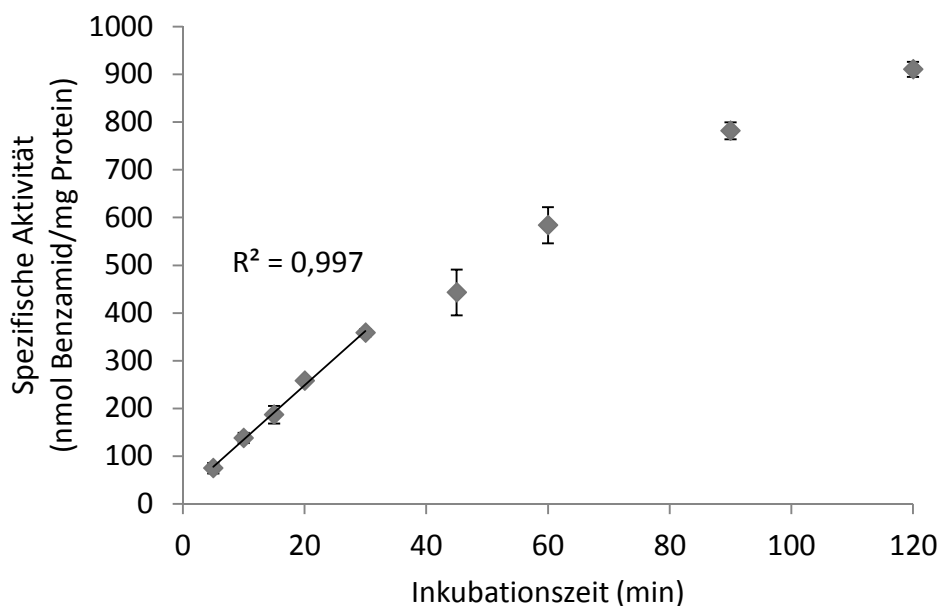


Abb. 6.4.3: Reduktion der Benzhydroxamsäure zum Benzamid durch porcine Lebermitochondrien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzamidbildung aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 6.3.4 beschrieben. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression für den Inkubationszeitraum von 5 - 30 min.

Abb. 6.4.3 zeigt die spezifische Aktivität der Benzamidbildung durch Inkubation mit isolierten porcinen Lebermitochondrien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der enzymatischen Reduktion und der Inkubationszeit über den Zeitraum bis 30 min ermittelt werden. Nach einer Reaktionszeit von 15 min konnte Benzamid in ausreichend hoher Konzentration enzymatisch gebildet werden ($> 30 \mu\text{M}$), sodass eine valide Quantifizierung des Metaboliten ermöglicht wurde. Für alle weiteren Inkubationen wurde die optimierte Inkubationszeit von 15 min gewählt.

Des Weiteren konnte auch ein linearer Zusammenhang zwischen der Benzoessäurebildung und der Inkubationszeit über einen Zeitraum bis 30 min bestimmt werden (Abb. 6.4.4). Die Umsetzungsgeschwindigkeit verlief im Gegensatz zur Benzamidbildung deutlich langsamer. Dennoch konnte der entstandene Metabolit bei einer Inkubationszeit von 15 min zuverlässig detektiert werden ($> 3,5 \mu\text{M}$).

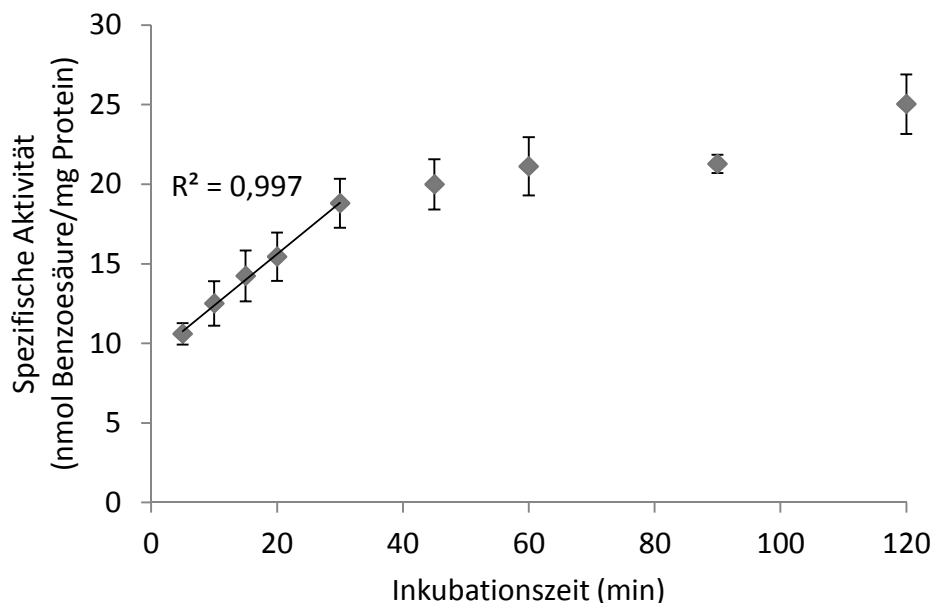


Abb. 6.4.4: Hydrolyse der Benzhydroxamsäure zur Benzoessäure durch porcine Lebermitochondrien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzoessäurebildung aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 6.3.4 beschrieben. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression für den Inkubationszeitraum von 5 - 30 min.

6.4.2.2. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Die Inkubation der Benzhydroxamsäure in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurde wie in Kapitel 6.3.4.4 beschrieben durchgeführt. Benzhydroxamsäure wird substratabhängig durch Inkubation mit Schweinelebermitochondrien zu Benzamid reduziert (Abb. 6.4.5). Dabei ist ein hyperboler Kurvenverlauf nach einer Michaelis-Menten-Kinetik zu beobachten.

Es konnten folgende enzymkinetische Parameter ermittelt werden:

$v_{\max} = 15,1 \pm 0,2$ nmol Benzamid/(min \times mg Protein); $K_m = 0,24 \pm 0,02$ mM.

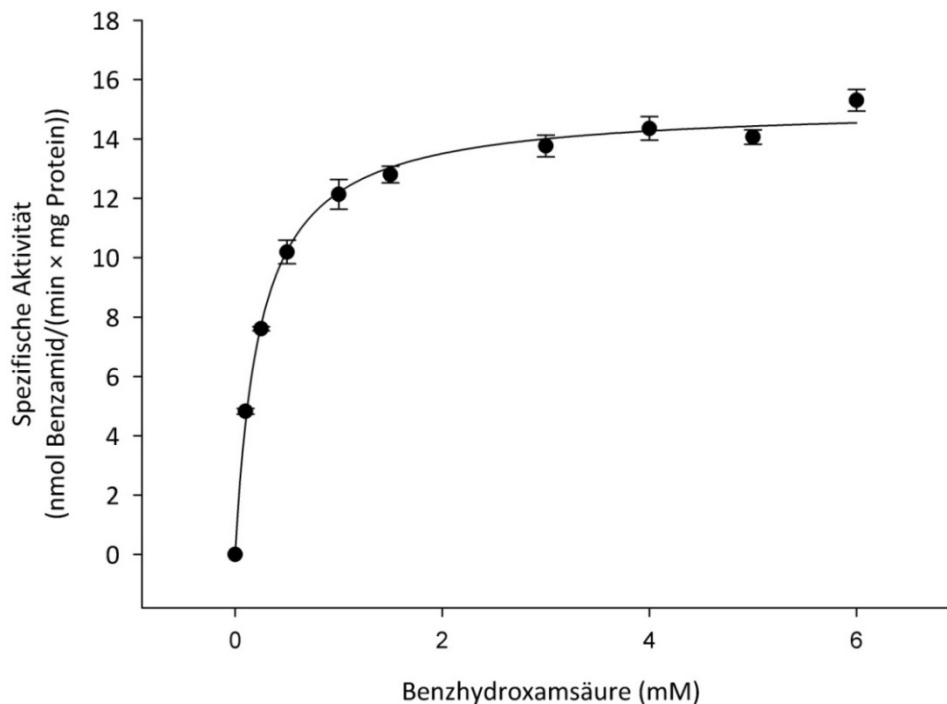


Abb. 6.4.5 Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzhydroxamsäure zum Benzamid durch porcine Schweinelebermitochondrien

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzamidbildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 6.3.4 beschrieben.

Ab einer Substratkonzentration größer als 3,0 mM kam es zu keiner Steigerung der enzymatischen Reduktion der Benzhydroxamsäure, sodass für nachfolgende Inkubationen die Sättigungskonzentration von 3,0 mM Benzhydroxamsäure gewählt wurde.

6.4.2.3. Charakterisierung der *N*-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit porcinen subzellulären Fraktionen

Die Inkubationen mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen aus Leber, Niere und Pankreas wurden wie in Kapitel 6.3.4.1 beschrieben durchgeführt. Abb. 6.4.6 zeigt die spezifischen Aktivitäten der Benzamidbildung angereichert vor allem in der OMV-Fraktion und den Mitochondrien der Niere. Ebenfalls hohe Aktivitäten wurden in Mitochondrien des Pankreas und der porcinen Leber gemessen. Nur geringe Restaktivität der Benzhydroxamsäurereduktion wurde dagegen in den Mikrosomen, Cytosol und PNS nachgewiesen. Die enzymatische Reduktion verlief cofaktorabhängig. Kontrollinkubationen ohne NADH zeigten keine oder nur eine sehr geringe *N*-Reduktion zum Benzamid.

Abb. 6.4.7 zeigt die spezifischen Aktivitäten der Benzoessäurebildung, die cofaktorunabhängig durch Hydrolyse aus dem gebildeten Benzamid entsteht. Vor allem in den Mikrosomen konnte eine Anreicherung der Aktivität gezeigt werden. In Kontrollinkubationen ohne Protein wurden keine Umsetzungen der Benzhydroxamsäure zum Benzamid oder zur Benzoessäure beobachtet.

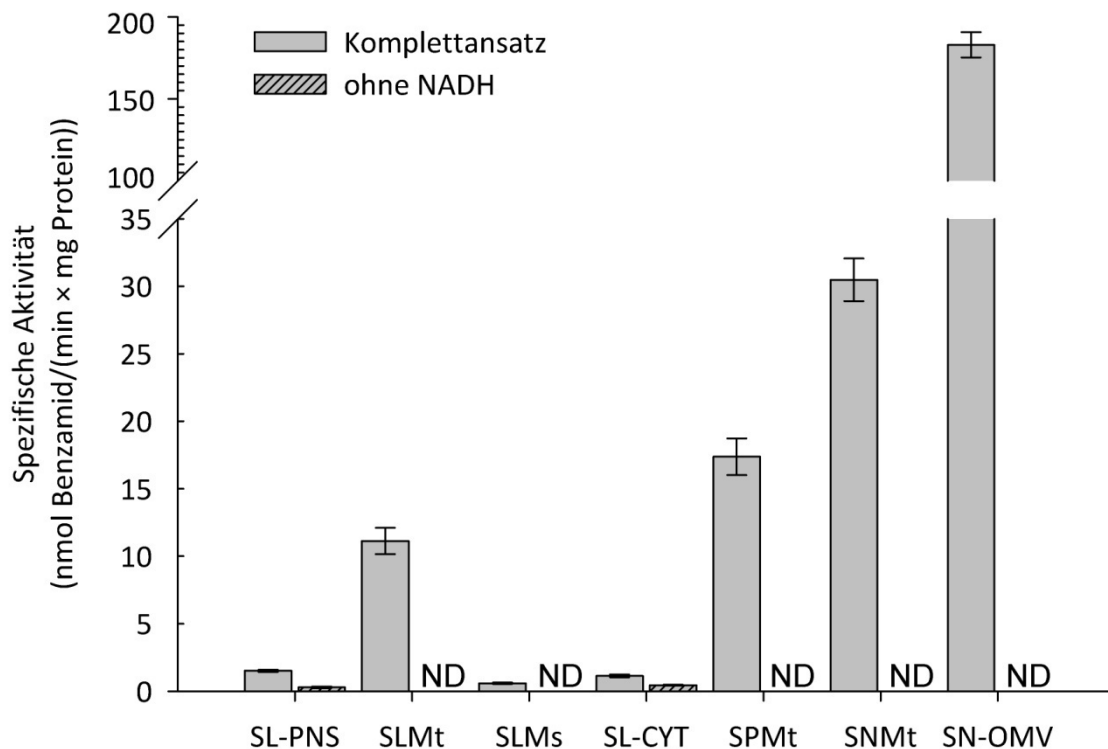


Abb. 6.4.6: N-Reduktion der Benzhydroxamsäure durch Inkubation mit porcinen subzellulären Fraktionen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzamidbildung in Abhängigkeit vom Cosubstrat NADH aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 6.3.4 beschrieben. N-Reduktion in Kontrollinkubationen ohne Protein wurde nicht detektiert. ND = nicht detektierbar

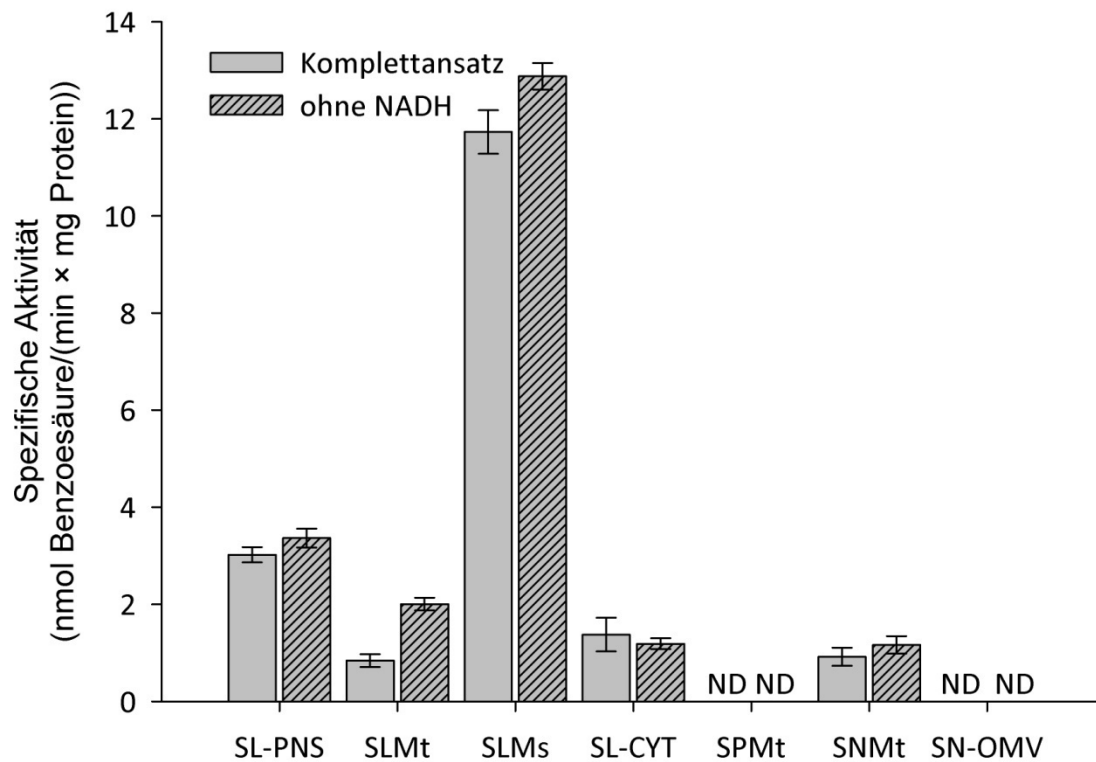


Abb. 6.4.7: N-Reduktion der Benzhydroxamsäure durch Inkubation mit porcinen subzellulären Fraktionen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzoensäurebildung in Abhängigkeit vom Cosubstrat NADH aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 6.3.4 beschrieben.

ND = nicht detektierbar

6.4.3. N-Reduktion durch das rekombinante mARC-haltige Enzymsystem

6.4.3.1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Zur Ermittlung des linearen Bereichs der N-Reduktion der Benzhydroxamsäure wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit durch Inkubation mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem bestimmt. Exemplarisch wurde die Zeitabhängigkeit durch Inkubation mit mARC-2 im Komplettansatz ermittelt (Abb. 6.4.8). Die Durchführung und Inkubationsbedingungen sind in Kapitel 6.3.4.3 beschrieben.

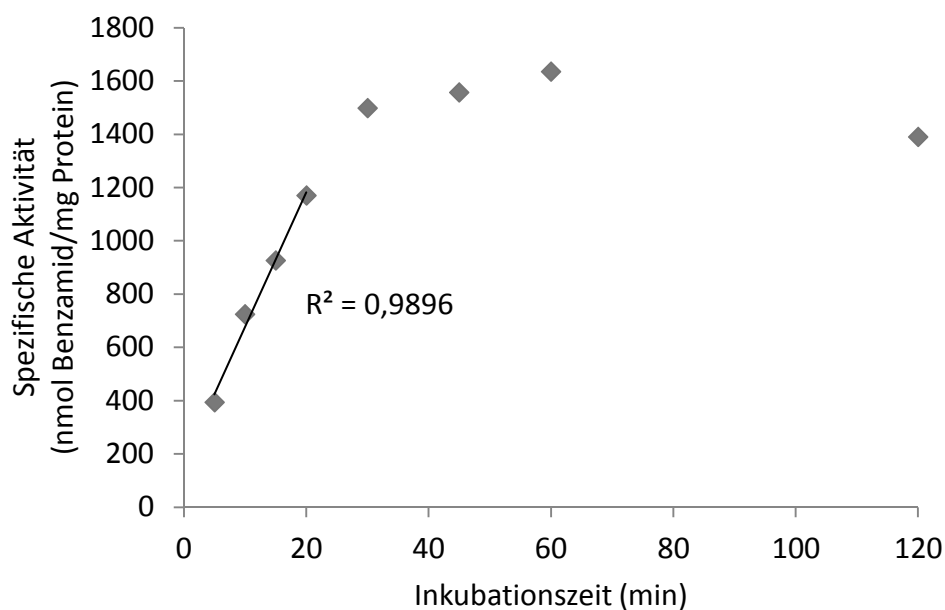


Abb. 6.4.8: Reduktion der Benzhydroxamsäure zum Benzamid durch das rekombinante humane Enzymsystem mit mARC-2 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzamidbildung aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. R^2 = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression für den Inkubationszeitraum von 5 - 20 min.

Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der enzymatischen Reduktion und der Inkubationszeit über den Zeitraum bis 20 min gezeigt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Benzhydroxamsäurereduktion nahm bei längerer Inkubationsdauer ab. Nach einer Reaktionszeit von 15 min konnte Benzamid in ausreichend hoher Konzentration enzymatisch gebildet werden ($> 60 \mu\text{M}$), sodass eine valide Quantifizierung des Metaboliten ermöglicht wurde. Für alle weiteren Inkubationen wurde die optimierte Inkubationszeit von 15 min gewählt.

6.4.3.2. Bestimmung der Substratabhängigkeit

Es wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Benzhydroxamsäurereduktion von der Substratkonzentration durch Inkubation mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem mARC-1 und mARC-2 bestimmt. Die Inkubationsbedingungen wurden in Kapitel 6.3.4.4 beschrieben. Enzymsättigung trat ab einer Benzhydroxamsäurekonzentration von 3 mM auf. Alle weiteren Inkubationen zur Charakterisierung der Reduktion durch das mARC-haltige Enzymsystem wurden mit 3 mM Substrat durchgeführt. Die von der Substratkonzentration abhängige Reduktion mit mARC-1 im Komplettansatz folgt, wie Abb. 6.4.9 zeigt, einem hyperbolen Kurvenverlauf und entspricht einer Enzymkinetik nach Michaelis-Menten. Folgende enzymkinetische Parameter für mARC-1 wurden nach nicht-linearer Regression bestimmt:

$v_{\max} = 23,7 \pm 2,2 \text{ nmol Benzamid}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$; $K_m = 0,33 \pm 0,15 \text{ mM}$. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) lag bei $220 \text{ s}^{-1} \times \text{M}^{-1}$. Zur Berechnung wurde dabei die eingesetzte Enzymmenge auf aktives mARC (gebundenes Molybdän) bezogen.

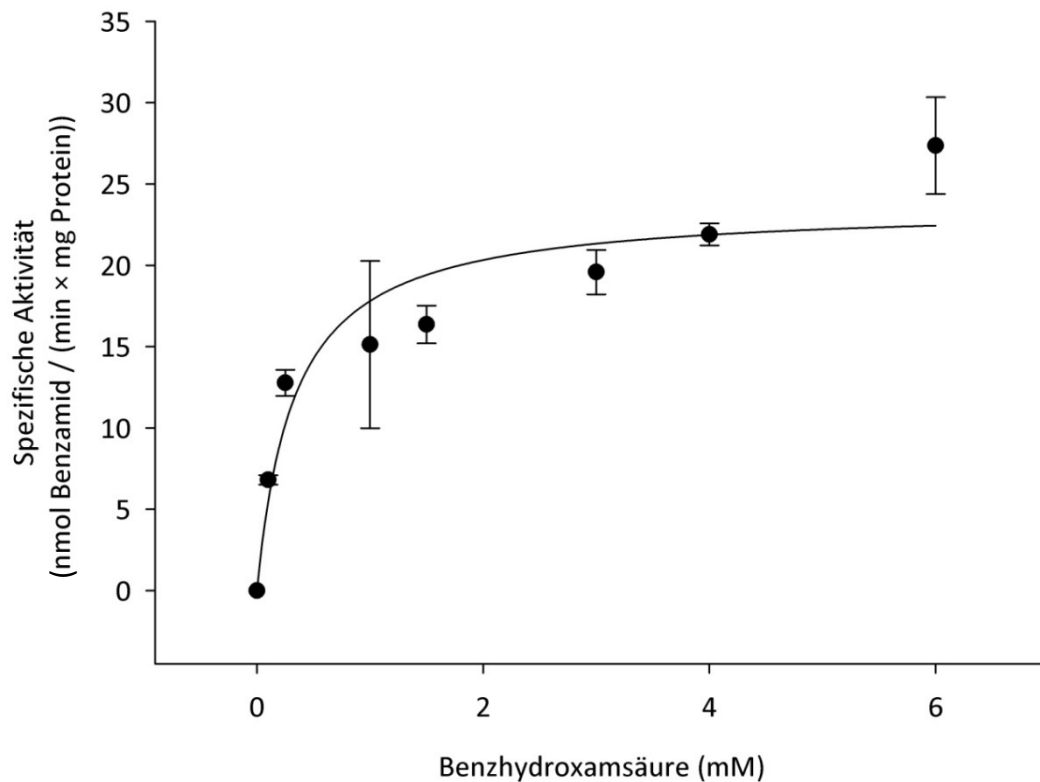


Abb. 6.4.9: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzhydroxamsäure zum Benzamid durch rekombinantes mARC-1 im Komplettansatz

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzamidbildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 6.3.4 beschrieben.

Die Bestimmung der Substratabhängigkeit durch Inkubation mit rekombinantem mARC-2 im Komplettansatz folgte ebenfalls wie für mARC-1 gezeigt einer Kinetik nach Michaelis-Menten mit den ermittelten enzymkinetischen Parametern $v_{\max} = 92,5 \pm 6,2$ nmol Benzamid/(min \times mg Protein) und $K_m = 1,95 \pm 0,32$ mM (Abb. 6.4.10). Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) betrug $161 \text{ s}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ und lag damit in etwa im Bereich der ermittelten katalytischen Effizienz von mARC-1, wobei die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit um den Faktor vier gegenüber mARC-1 erhöht war.

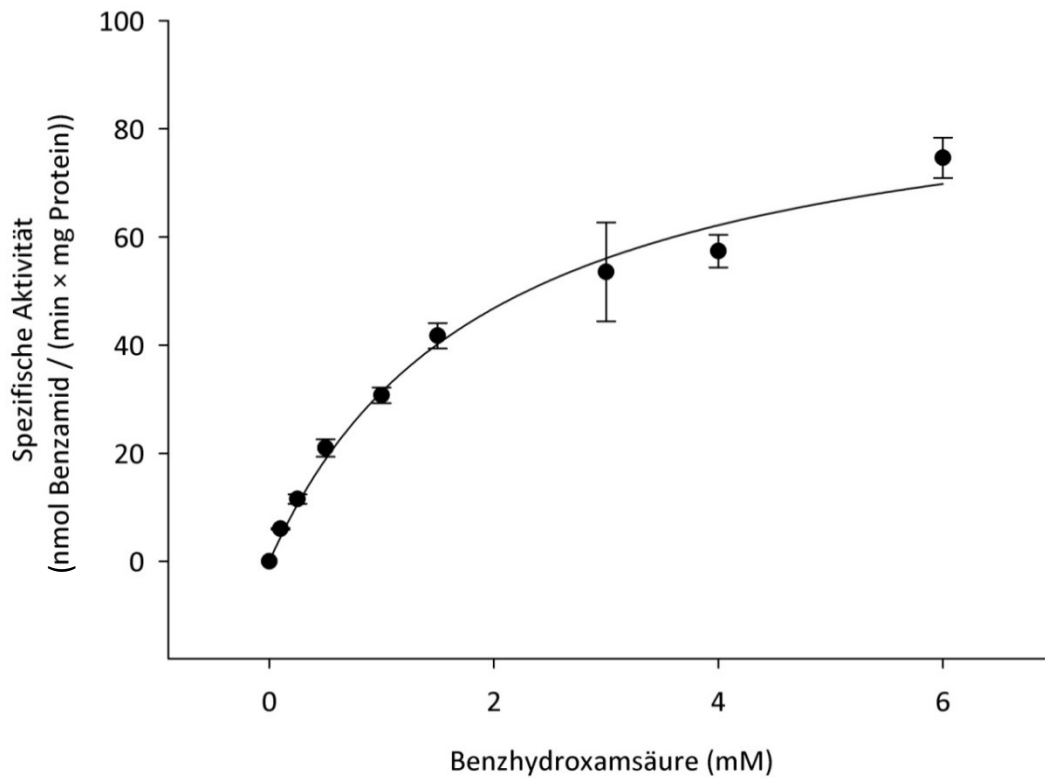


Abb. 6.4.10: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzhydroxamsäure zum Benzamid durch rekombinantes mARC-2 im Komplettansatz

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität der Benzamidbildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aus zwei unabhängigen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze, die Inkubationsbedingungen sowie deren Aufarbeitung sind in Kapitel 6.3.4 beschrieben.

6.4.3.3. Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität durch Inkubation mit humanem mARC-1 und mARC-2

Die Inkubationen mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem zur Charakterisierung der N-reduktiven Aktivität von Benzhydroxamsäure wurden, wie in Kapitel 6.3.4.2 beschrieben, unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Es wurden die Umsetzungsraten der rekonstituierten Inkubationsansätze mit mARC-1 und mARC-2 bestimmt. Die spezifische Aktivität im Komplettansatz mit mARC-1 betrug $25,8 \pm 3,3$ nmol Benzamid / (min \times mg Protein). Das Substrat wurde damit etwa um den Faktor zwei langsamer umgesetzt als mit mARC-2 unter gleichen Bedingungen ($59,7 \pm 10,9$ nmol Benzamid / (min \times mg Protein)). In Inkubationen, in denen eine Komponente des rekonstituierten Enzymsystems fehlte, konnten keine Umsetzungsraten detektiert werden. Die enzymatische N-Reduktion zum Benzamid verlief cosubstratabhängig. Inkubationen ohne NADH zeigten keine messbare Enzymaktivität.

Die hydrolytische Umwandlung zur Benzoessäure konnte in den *in vitro* Studien mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem nicht beobachtet werden.

6.5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufbauend auf den Untersuchungen von Amschler (2004) die Reduktion der Benzhydroxamsäure zu Benzamid durch das Enzym mARC untersucht. Die in vorangegangenen Studien beschriebenen angereicherten *N*-reduktiven Aktivitäten der sauerstoffunabhängigen Hydroxamsäure-Umsetzung in den Mitochondrien porciner Leber und Niere (Dissertation Amschler, 2004) gaben Anlass zur Annahme, dass die mit anderen bereits untersuchten *N*-hydroxylierten Verbindungen strukturell ähnlichen Hydroxamsäuren Substrate des von Havemeyer (2006) vollständig aufgeklärten, molybdänhaltigen Enzymsystems mARC sind. Unter aeroben Bedingungen durchgeführte Inkubationen mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen bestätigten die in früheren Arbeiten erhobenen Daten, die um Inkubationen mit extrahepatischen Mitochondrien und der äußeren mitochondrialen Membranfraktion erweitert wurden. Wie bereits für funktionelle Gruppen anderer *N*-hydroxylierter Substrate gezeigt, konnten die höchsten Umsetzungsraten in isolierten äußeren mitochondrialen Membranvesikeln der porcinen Niere ermittelt werden. Das für die NADH-abhängige *N*-reduktive Aktivität der Benzhydroxamsäure-Umsetzung verantwortliche Enzymsystem konnte damit eindeutig in den Mitochondrien lokalisiert werden.

An die erhobenen Daten der Reduktion mit porcinen subzellulären Fraktionen schlossen sich erstmals Biotransformationsstudien mit dem rekombinant hergestellten humanen Enzymsystem bestehend aus mitochondrialem Cyt b_5 , der NADH-abhängigen Cyt b_5R und mARC an, um die mARC-abhängige *N*-Reduktion von Hydroxamsäuren näher zu charakterisieren. Es konnte die substrat- und cofaktorabhängige Reduktion der Benzhydroxamsäure zum korrespondierenden Benzamid gezeigt werden (Abb. 6.5.1).

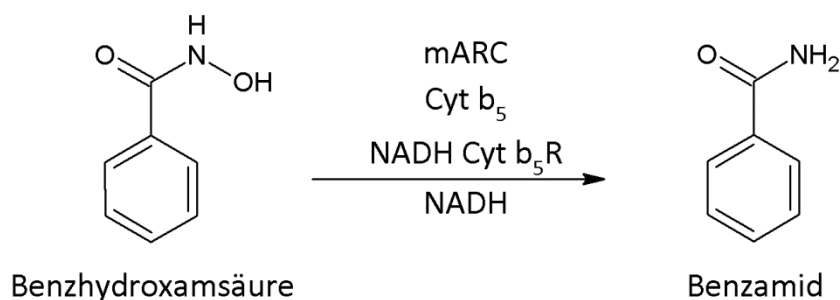


Abb. 6.5.1: mARC-abhängige Benzhydroxamsäure-Reduktion zum Benzamid

Die enzymatische Umsetzung im optimierten Inkubationssystem verlief sowohl für das Isoenzym mARC-1 als auch für mARC-2 nach einer Michaelis-Menten-Kinetik. Es wurden die enzymkinetischen Parameter der *N*-Reduktion ermittelt. Die katalytische Effizienz für die beiden Isoenzyme mARC-1 ($220 \text{ s}^{-1} \times \text{M}^{-1}$) und mARC-2 ($169 \text{ s}^{-1} \times \text{M}^{-1}$) lieferte in der Größenordnung vergleichbare Werte. Es wurden allerdings doppelt so hohe Umsetzungsraten unter optimierten Bedingungen durch Inkubation der Benzhydroxamsäure mit mARC-2 im Vergleich zu mARC-1 bestimmt (siehe Kapitel 6.4.3.3). Damit konnte erstmals, neben der untersuchten *N*-Reduktion des mARC-Substrates *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (Kotthaus *et al.*, 2011), eine bevorzugte mARC-2-abhängige Umsetzung einer *N*-oxygenierten Verbindung beobachtet werden. Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse sollten in weiterführenden Arbeiten andere Derivate mit Hydroxamsäurefunktion anhand unterschiedlicher humaner mARC-Chargen getestet werden.

Des Weiteren beschrieb Amschler (2004) eine schnelle Hydrolyse der Benzhydroxamsäure zur Benzoesäure, die unabhängig vom Cofaktor NAD(P)H vorwiegend in den Mikrosomen erfolgte. Die hydrolytische Umwandlung zur Benzoesäure konnte erwartungsgemäß in den *in vitro* Studien mit dem rekombinanten humanen Enzymsystem mARC nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte erstmals in dieser Arbeit die *N*-Reduktion von aromatischen Hydroxamsäuren zum korrespondierenden Amid durch mARC

beschrieben werden. Somit bilden Hydroxamsäuren eine weitere Substratklasse *N*-hydroxylierter Verbindungen für das mitochondriale Molybdoenzym mARC. Im Vergleich zur Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim setzt mARC die Benzhydroxamsäure etwa um den Faktor vier langsamer um. Allerdings zeigte sich zum ersten Mal eine klare Präferenz in der Umsetzung des Isoenzym 2 gegenüber mARC-1. In weiterführenden Studien sollten deshalb z.B. aliphatische und heterocyclische Hydroxamsäuren auf deren *N*-Reduktion hin untersucht werden, um mögliche strukturelle Unterschiede der Verbindungen in Bezug auf deren Substratspezifität für mARC zu ermitteln.

7. BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN O-ALKYLIERTER AMIDOXIME

7.1. EINLEITUNG

Die Reduktion *N*-oxygenierter Verbindungen durch das mARC-haltige Enzymsystem wurde bereits in den vorherigen Kapiteln ausführlich beschrieben. Ein weiteres Prinzip zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit basischer Wirkstoffe mit Amidinen als funktionelle Gruppe besteht, neben der *N*-Hydroxylierung zu Amidoximen, in der Synthese zu Methoxyamidin-Prodrugs (Ansedo *et al.*, 2005, Matsson *et al.*, 2011). Pafuramidin und das neu entwickelte Prodrug DB844 sind potentielle oral bioverfügbare Di-Amidin-Prodrugs zur Behandlung der afrikanischen Trypanosomiasis (afrikanische Schlafkrankheit) (Thuita *et al.*, 2012). Für den Arzneistoff Pafuramidin wurde die Aktivierung des Prodrugs zur Wirkform Furamidin anhand von *in vitro* Biotransformationsstudien mit Rattenhepatocyten, humanen Lebermikrosomen und rekombinanten CYP 450 Enzymen untersucht (Wang *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2004). Die Metabolisierung zum aktiven Di-Amidin erfolgte über eine Reihe von *O*-Demethylierungsreaktionen mit anschließender *N*-Dehydroxylierung (Zhou *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2006) identifizierten CYP 4F-Enzyme, die für die *O*-Demethylierung von Pafuramidin zur Amidoxim-Zwischenstufe verantwortlich sind. Für die anschließende *N*-Reduktion zum Furamidin konnte eine Beteiligung der Enzyme Cyt b₅ und Cyt b₅R nachgewiesen werden (Saulter *et al.*, 2005). Eine direkte *N*-Demethoxylierung zum Amidin wurde dennoch nicht vollständig ausgeschlossen (Midgley *et al.*, 2007).

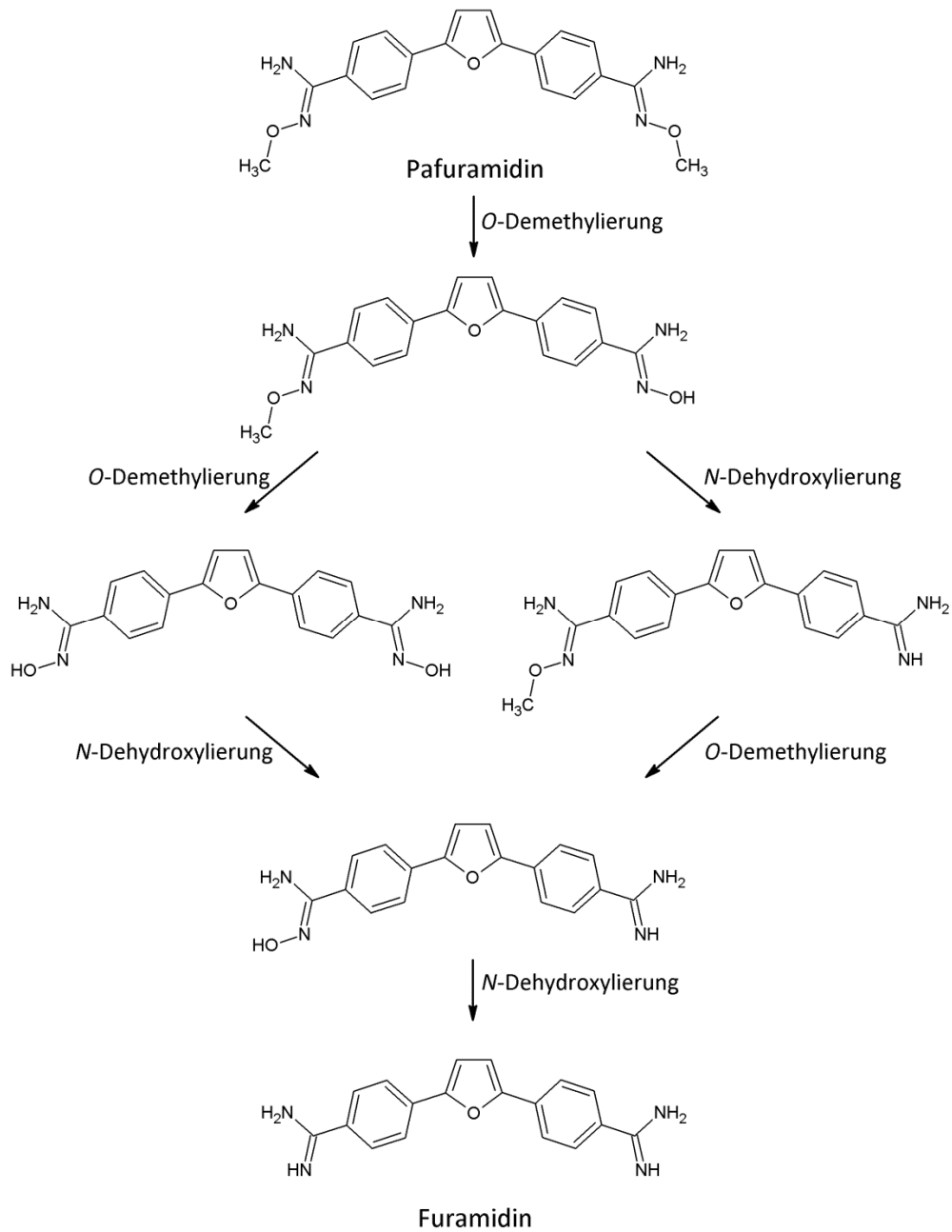


Abb. 7.1.1: Metabolische Aktivierung des Prodrugs Pafuramidin zum Diamidin Furamidin (modifiziert nach Saulter *et al.*, 2005)

Matsson *et al.* (2011) untersuchten am Schweinemodell den Metabolismus des in der klinischen Entwicklung befindlichen oralen Thrombin-Inhibitors AZD0837. Dabei beschrieben sie für das *O*-methylierte Amidoxim-Prodrug die Aktivierung zur Wirkform AR-H067637 durch einen Zweistufigen-Mechanismus. Zunächst erfolgte die Cytochrom P450-vermittelte Demethylierung und anschließend die *N*-Reduktion durch Cyt b₅ und NADH Cyt b₅R und einer dritten Enzymkomponente. Aus eigenen Studien zur Untersuchung der Reduktion von Amidoxim-Prodrugs handelt es sich bei der postulierten dritte Komponente um mARC (siehe Abb. 7.1.2).

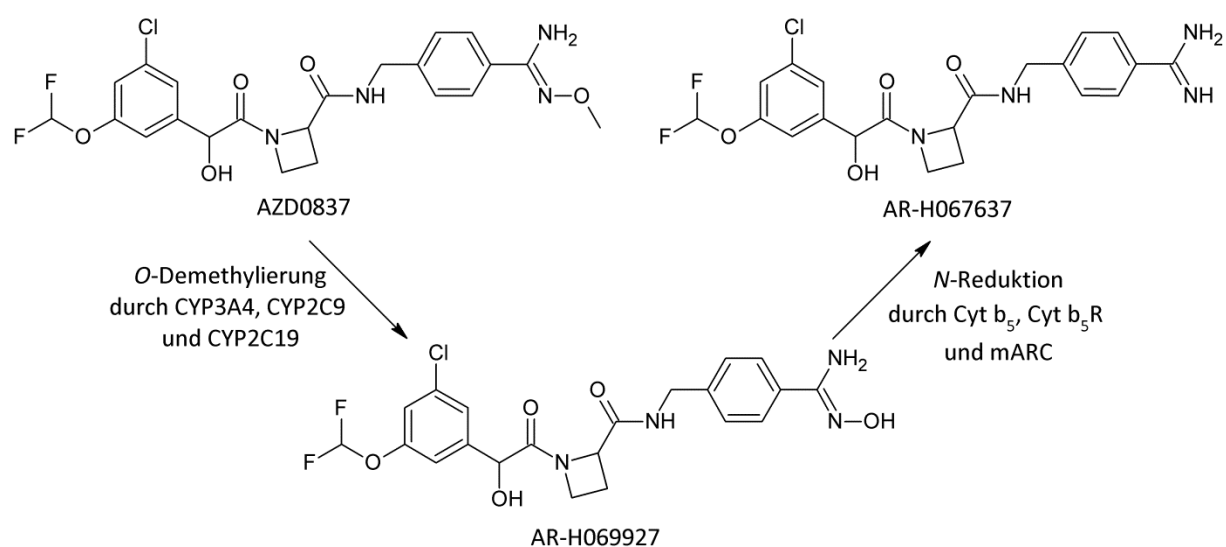


Abb. 7.1.2 Postulierte Biotransformation des Amidoxim-Prodrugs AZD0837 (modifiziert nach Matsson *et al.*, 2011)

Kürzlich durchgeführte Studien zur Metabolisierung des *O*-alkylierten Amidoxims *O*-Methylbenzamidoxim zeigten sowohl im rekonstituierten aus porciner Leber gereinigten nativen als auch im rekombinanten humanen Enzymsystem zusammen mit mARC, Cyt b₅ und Cyt b₅R die direkte Umsetzung zu Benzamidin (Grünwald, 2008). Allerdings konnte das Intermediat Benzamidoxim ebenfalls detektiert werden.

7.2. ZIELSETZUNG

Aufbauend auf den Untersuchungen von Grünewald (2008) sollte die mARC-abhängige Umsetzung O-alkylierter Amidoxime zu deren korrespondierenden Amidinen weiter charakterisiert werden. Für die *in vitro* Biotransformationsstudien wurde als Modellsubstrat das O-methylierte Amidoxim O-Methylbenzamidoxim eingesetzt. Es sollte abschließend geklärt werden, ob die direkte enzymatische Demethoxylierung durch das molybdänhaltige Enzymsystem bestehend aus Cyt b₅, NADH Cyt b₅R und mARC katalysiert wird.

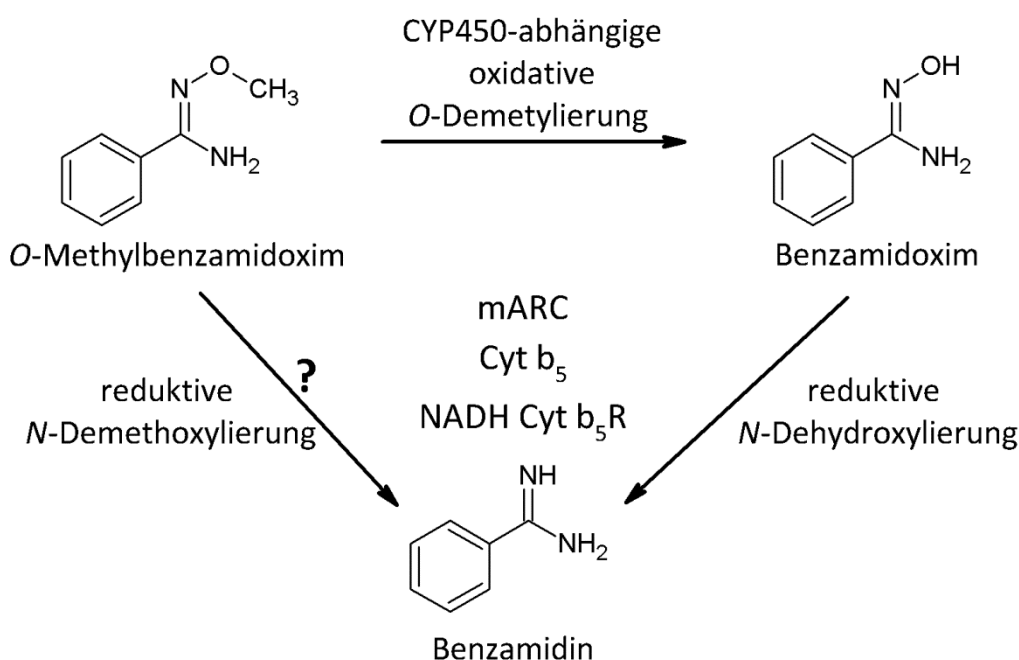


Abb. 7.2.1: Postulierter Metabolismus der enzymatischen Reduktion von O-Methylbenzamidoxim zum Benzamidin durch mARC

In den zuvor durchgeführten Studien konnte stets die Bildung des Intermediates Benzamidoxim beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass entweder durch mögliche Verunreinigungen des isolierten porcinen Enzymsystems mit CYP 450-Enzymen der erste Schritt der Umsetzung des Substrats durch oxidative O-Demethoxylierung abläuft oder dass das gebildete Amidin in einer Rückreaktion zum Benzamidoxim durch mARC entsteht (Dissertation Grünewald, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Arbeiten anhand des optimierten rekombinanten humanen Enzymsystems reproduziert werden. Havemeyer (2006) lokalisierte das mARC-haltige Enzymsystem in der äußeren mitochondrialen Membran porciner Leber, sodass außerdem vergleichende Untersuchungen mit isolierten porcinen subzellulären Fraktionen durchgeführt werden sollten. Eine Beteiligung von mARC an der direkten O-Demethoxylierung des Substrats O-Methylbenzamidoxim zum Benzamidin sollte sich in einer Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in den Mitochondrien widerspiegeln. Die spezifischen Aktivitäten der enzymatischen Umsetzung sollten durch Quantifizierung der gebildeten Metabolite Benzamidin bzw. Benzamidoxim mittels HPLC-Analyse ermittelt werden.

7.3. METHODEN

7.3.1. Materialien und Geräte

Eine Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Geräte befindet sich am Ende der vorliegenden Arbeit in Kapitel 9.

7.3.2. Synthese von *O*-Methylbenzamidoxim

O-Methylbenzamidoxim wurde in Anlehnung an das Verfahren von Hand und Jencks (1962) durch Umsetzung von Ethylbenzimidat mit *O*-Methylhydroxylamin synthetisiert.

0,835 g (10 mmol) *O*-Methylhydroxylamin HCl wurden in 15 ml demineralisiertem Wasser gelöst und mit 10 %iger (m/v) Kaliumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Eine wässrige Lösung von 0,464 g (2,5 mmol) Ethylbenzimidat wurde unter Rühren zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Während der 35-minütigen Reaktionszeit wurde der Ansatz mit Kaliumhydroxid-Lösung zwischen pH 5,9 - 6,1 konstant gehalten. Anschließend wurde die Mischung zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die separierte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und mittels Rotationsverdampfer entfernt. Das zunächst ölige *O*-Methylbenzamidoxim verfestigt sich nach kurzer Standzeit und wurde mit Diethylether-Petrolether umkristallisiert. Die Identität und Reinheit wurde per ¹H-NMR und HPLC gegen einen *O*-Methylbenzamidoxim-Vergleichsstandard überprüft und bestätigt.

7.3.3. Proteinquellen

Für *in vitro* Biotransformationsstudien wurden sowohl rekombinante humane Proteine des Dreikomponentenenzymystems mit mARC, Cyt b₅ und der NADH Cyt b₅R als auch isolierte subzelluläre Fraktionen aus porcinen Organen verwendet. Die Gewinnung und Charakterisierung der Enzymquellen ist in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Alle Untersuchungen erfolgten mit einheitlichen Enzymchargen.

7.3.4. HPLC-Analytik

Die Analytik zur Trennung und Quantifizierung von *O*-Methylbenzamidoxim und dessen Metaboliten Benzamidoxim und Benzamidin wurde in Anlehnung an die im Arbeitskreis etablierte Methode von Grünewald (2008) und Clement *et al.* (2005) mit dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenen HPLC-System durchgeführt. Es wurden die gleichen Bedingungen zur chromatographischen Trennung, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, gewählt. Es konnten folgende Retentionszeiten ermittelt werden:

Retentionszeiten:	Benzamidoxim:	6,9 ± 0,1 min
	<i>O</i> -Methylbenzamidoxim:	16,4 ± 0,2 min
	Benzamidin:	25,5 ± 0,2 min

Zur Validierung der HPLC-Methode wurden 8-Punkt-Kalibrierungen mit den synthetischen Metaboliten Benzamidoxim und Benzamidin in definierten Konzentrationen im Bereich von 0,5-250 µM durchgeführt. Dazu wurden in separaten Ansätzen die Verdünnungen der Metabolite zu gleichen Teilen in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 und Methanol hergestellt und per HPLC analysiert.

7.3.5. Zusammensetzung der Inkubationsansätze

Zur Ermittlung der enzymatischen Umsetzung von *O*-Methylbenzamidoxim zum korrespondierenden Amidin bzw. Amidoxim wurden Inkubationen mit isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren dabei wie folgt zusammengesetzt:

Als Enzymquellen wurden jeweils 100 µg Mitochondrien, Mikrosomen und der Überstand der postnuklearen Subfraktion aus porciner Leber eingesetzt. Als Substrat wurden jedem Inkubationsansatz 3,0 mM *O*-Methylbenzamidoxim, gelöst in 100 mM Phosphatpufferlösung pH 6,0 (für Inkubationen mit NADH) bzw. pH 7,4 (für Inkubationen mit NADPH), hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug 150 µl. Nach einer Vorinkubation von 3 min erfolgte der Reaktionsstart mit 1,0 mM NADH bzw. NADPH als Cosubstrat. Die Ansätze wurden 20 min unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert und mit 150 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Anschließend wurden die Proben 5 min geschüttelt, danach weitere 5 min bei 22 000 g zentrifugiert und sofort mittels HPLC vermessen.

In parallelen Inkubationen wurden die Proteinverdünnungen zuvor 3 min mit Kohlenstoffmonoxid begast. Anschließend erfolgten die Inkubation und Aufarbeitung der Proben wie zuvor beschrieben.

Zur Bestimmung der Umsetzungsraten im humanen rekombinanten Enzymsystem wurden folgende Parameter festgelegt:

Als Proteinquellen für das rekombinante humane Dreikomponentensystem wurden je Inkubationsansatz 75 pmol Molybdän (mARC-1 oder mARC-2), 75 pmol Häm (Cyt b₅) und 7,5 pmol FAD (Cyt b₅R) hinzugegeben. Abweichend vom isolierten porcinen Enzymsystem wurden die Inkubationen in 20 mM MES-Puffer bei pH 6,0 durchgeführt. Alle weiteren zuvor beschriebenen Parameter, wie Substrat- und

Cosubstrat-Konzentrationen und die Inkubationsbedingungen konnten übernommen werden.

7.4. ERGEBNISSE

7.4.1. Quantifizierung von Benzamidoxim und Benzamidin

Das Beispielchromatogramm der in Kapitel 7.3.4 beschriebenen HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamidin und Benzamidoxim zeigt die Detektion von O-Methylbenzamidoxim bei einer Retentionszeit von 16,4 min. Der Metabolit Benzamidoxim konnte bei 6,9 min und Benzamidin bei 25,1 min detektiert werden.

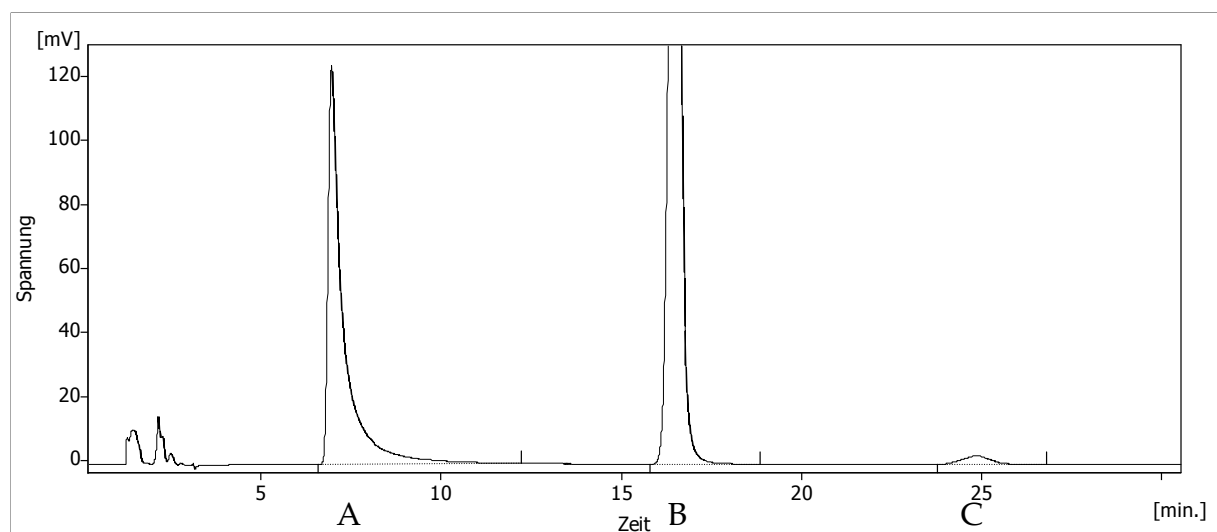


Abb. 7.4.1: Beispielchromatogramm zur Detektion von Benzamidoxim, O-Methylbenzamidoxim und Benzamidin.

Dargestellt sind die Peaks von 500 μM Benzamidoxim (A) 1,0 mM O-Methylbenzamidoxim (B) und 150 μM Benzamidin (C).

Die berechneten Kalibriergeraden von Benzamidin und Benzamidoxim im angegebenen Konzentrationsbereich von 0,5-250 μM verliefen linear. Es konnten für beide Substanzen Korrelationskoeffizienten von $r=0,9999$ ermittelt werden. Die Bestimmungsgrenze zur Detektion von Benzamidoxim lag bei einer Konzentration von 1,0 μM , die für Benzamidin bei 0,5 μM . Auf eine Bestimmung der Wiederfindung wurde verzichtet, da es sich um eine im Arbeitskreis etablierte HPLC-Methode handelte.

7.4.2. *In vitro* Biotransformation von O-Methylbenzamidoxim im isolierten porcinen und humanen rekombinanten Enzymsystem

Die Inkubationen mit O-Methylbenzamidoxim durch porcine subzelluläre Fraktionen wurden unter den in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass O-Methylbenzamidoxim zu Benzamidin und Benzamidoxim umgesetzt wird. In Abb. 7.4.2 sind die spezifischen Aktivitäten der Amidin- und Amidoximbildung dargestellt. O-Methylbenzamidoxim wurde mit porcinen Lebermitochondrien, -mikrosomen und dem Überstand der postnuklearen Subfraktion durch Zugabe von NADH oder NADPH als Cosubstrat inkubiert.

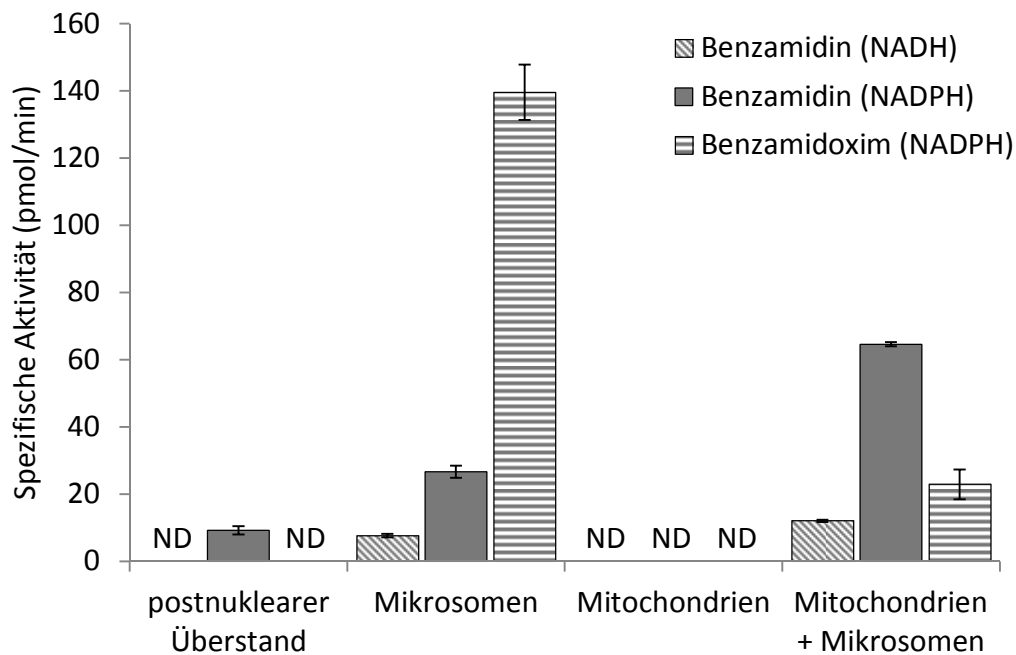


Abb. 7.4.2: Benzamidin- und Benzamidoximbildung nach Inkubation von O-Methylbenzamidoxim mit subzellulären Leberfraktionen aus dem Schwein und NAD(P)H.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. ND = nicht detektierbar

Die Auswertung der Daten zeigte, dass *O*-Methylbenzamidoxim durch Inkubation mit Mikrosomen cosubstratabhängig umgesetzt wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass die enzymatisch katalysierte Demethylierung zum Benzamidoxim NADPH-abhängig in den Mikrosomen lokalisiert ist. Inkubationen mit Mitochondrien lieferten keine detektierbaren Umsetzungsraten. Der rekonstituierte Inkubationsansatz in Kombination mit Mitochondrien und Mikrosomen zeigte die höchsten spezifischen Aktivitäten der Benzamidinbildung. Geringe Benzamidinkonzentrationen konnten auch durch Umsetzung von *O*-Methylbenzamidoxim durch Inkubation im NADPH-haltigen Ansatz mit dem Überstand der postnuklearen Fraktion bestimmt werden.

Durch paralleles Begasen der Proteinlösungen mit Kohlenmonoxid und anschließender aerober Inkubation konnte mit porcinen Mikrosomen eine Hemmung der spezifischen Aktivität beobachtet werden (Abb. 7.4.3). Die Enzymhemmung zeigte sich besonders deutlich in Ansätzen, die mit dem Cosubstrat NADPH inkubiert wurden.

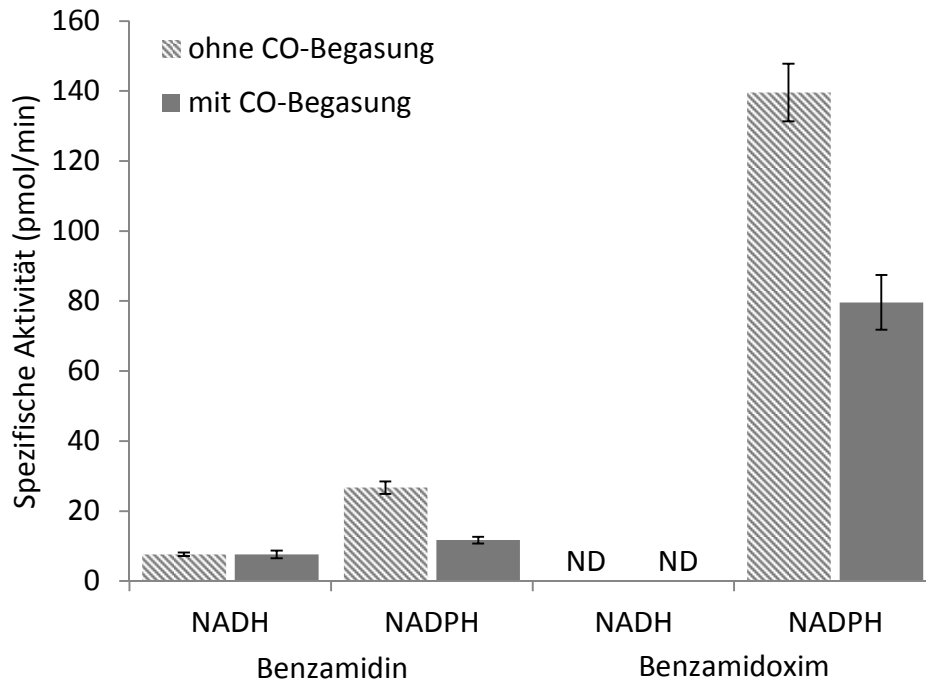


Abb. 7.4.3: Einfluss von Kohlenmonoxid auf die Benzamidin- und Benzamidoxim-bildung durch Inkubation porciner Mikrosomen mit NAD(P)H

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der spezifischen Aktivität aus zwei gleichzeitig inkubierten Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. ND = nicht detektierbar

Es wurden Studien zur Charakterisierung der mARC-abhängigen Metabolisierung von *O*-Methylbenzamidoxim durch das rekombinante humane Enzymsystem durchgeführt. Die Bildung der Metaboliten Benzamidin und Benzamidoxim konnte nicht beobachtet werden. Veränderungen der Inkubationsbedingungen (Austausch des Cosubstrats NADH gegen NADPH, Verlängerung der Inkubationszeiten und Variation der Proteinmenge) zeigten ebenfalls keine signifikanten spezifischen Aktivitäten.

7.5. DISKUSSION

Aufbauend auf den Ergebnissen der *in vitro* Studien von Grünewald (2008) zur Umwandlung *O*-substituierter Amidoxime durch das mARC-haltige, gereinigte porcine und rekombinante humane Enzymsystem, sollte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, ob eine direkte Metabolisierung zum Amidin durch mARC erfolgt oder ob eine Umwandlung zum Amidin über das Amidoxim als Intermediat stattfindet. Grünewald konnte erstmals anhand von Inkubationsstudien mit dem Modellsubstrat *O*-Methylbenzamidoxim zeigen, dass sowohl das gereinigte native als auch das rekombinante Enzymsystem mit Cyt b₅, NADH Cyt b₅R und mARC in geringem Ausmaß in der Lage war, das Substrat direkt zum Benzamidin zu metabolisieren. Allerdings konnte bei diesen Untersuchungen der Metabolit Benzamidoxim ebenfalls detektiert werden. Ob Benzamidoxim durch oxidative Rückreaktion aus dem gebildeten Benzamidin oder durch die beschriebene oxidative Demethylierung mit CYP 450-haltigen Verunreinigungen entstanden ist, sollten eigene Untersuchungen klären.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Ergänzung zu den Untersuchungen von Grünewald (2008) Inkubationen mit isolierten porcinen subzellulären Leberfraktionen durchgeführt, um die Anreicherung der Benzamidin- bzw. Benzamidoximbildung zu bestimmen. Eine Anreicherung in der Mitochondrienfraktion wäre ein Hinweis auf die Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems an der direkten reduktiven *O*-Methoxylierung. *O*-Methylbenzamidoxim wurde mit Mitochondrien, Mikrosomen und dem Überstand der postnuklearen Fraktion (PNS) inkubiert. Eine Umsetzung des Substrats zu den Metaboliten Benzamidin und Benzamidoxim konnte nur für die Reaktionsansätze mit Mikrosomen und PNS detektiert werden. Da keine Biotransformation von *O*-Methylbenzamidoxim in Mitochondrien ermittelt werden konnte, ist eine primäre Beteiligung des mitochondrialen Enzymsystems (mARC) unwahrscheinlich. Die

Umsetzung von *O*-Methylbenzamidoxim erfolgte cosubstratabhängig bevorzugt durch NADPH und konnte durch Kohlenmonoxid gehemmt werden, was auf eine Beteiligung von CYP 450-Enzymen hindeutet. Diese Ergebnisse bestätigten auch Untersuchungen von Wang, *et al.* aus 2006 und 2007 sowie Matsson *et al.* (2011) in denen *O*-methylierte Amidoxime zunächst CYP 450-abhängig durch *O*-Demethylierung zum korrespondierenden Amidoxim oxidiert wurden.

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit porcinen subzellulären Fraktionen schlossen sich *in vitro* Biotransformationsstudien unter optimierten Bedingungen mit rekombinanten humanen Enzymen an. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte keine Metabolisierung von *O*-Methylbenzamidoxim zum Benzamidin. Auch das vermutete Intermediat Benzamidoxim konnte nicht detektiert werden. Eine Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems an der Katalyse der Demethoxylierung von *O*-Methylbenzamidoxim konnte somit ausgeschlossen werden.

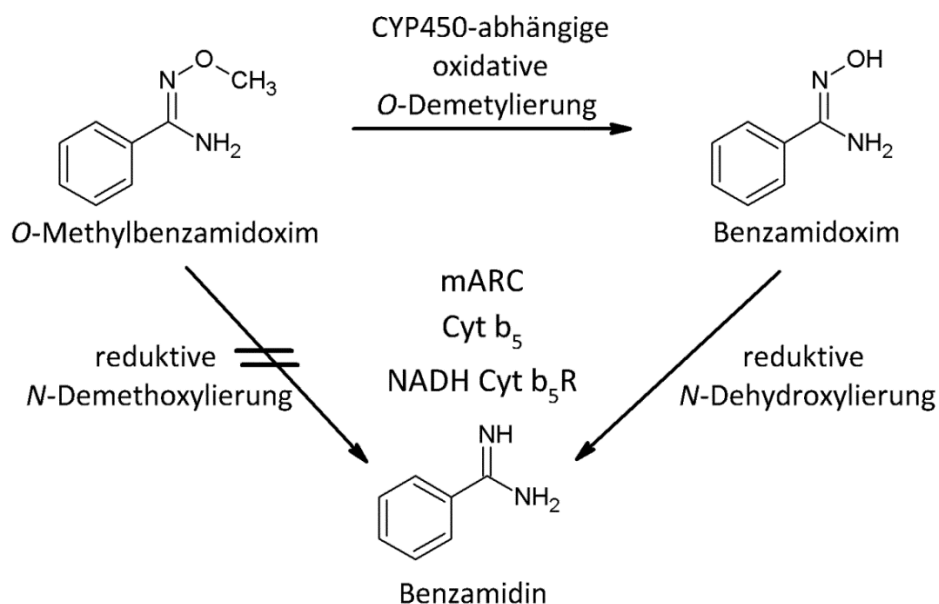


Abb. 7.5.1: Postulierter Biotransformationsweg von *O*-Methylbenzamidoxim zum Benzamidin durch CYP 450-abhängige *O*-Demethylierung und sich anschließender reduktiver *N*-Dehydroxylierung durch mARC.

Untersuchungen weiterer O-substituierter Amidoxime wie *O'*-(4-Nitrophenyl)-4-benzamidoxim und das hydrophilere *O'*-(4-Nitrophenyl)-4-carboxybenzamidoxim, die als potentielle Substrate für das N-reduktive Enzymsystem (mARC) getestet wurden, zeigten ebenfalls keine signifikante Umsetzung zum korrespondierenden Amidin. Auch eine erwartete Abspaltung von p-Nitrophenol durch Inkubation mit mARC konnte nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass O-alkylierte Amidoxim-Derivate keine direkten Substrate für das mitochondriale Dreikomponentenenzymssystem darstellen. Für die Entwicklung neuer Prodrugs mit O-substituierten Amidoximgruppen muss daher berücksichtigt werden, dass die Aktivierung zur Amidin-Wirkform zunächst CYP 450-abhängig durch Überführung in das korrespondierende Amidoxim erfolgt und erst im Anschluss daran eine reduktive Umsetzung durch mARC katalysiert wird.

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Charakterisierung der enzymatischen Reduktion von *N*-oxygenierten Verbindungen als potentielle Substrate für das kürzlich identifizierte molybdäncofaktorhaltige Enzymsystem stand im Vordergrund dieser Arbeit. Havemeyer (2006) konnte erstmals eine dritte, bis dato unbekannte Komponente eines *N*-reduktiven Enzymsystems aus der äußeren Mitochondrienmembran von Schweinelebern isolieren. Zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 und der NADH Cytochrom b_5 Reduktase katalysiert sie die Umsetzung von Amidoximen zu Amidinen und wurde aufgrund dieser Funktion als „mitochondrial Amidoxime Reducing Component“ (mARC) bezeichnet (Havemeyer *et al.*, 2006). Das Protein ist das vierte im Säugetier identifizierte Molybdoenzym und liegt in allen bisher untersuchten Spezies in zwei Homologen Proteinen, mARC-1 und mARC-2, vor. Zur Charakterisierung der *N*-reduktiven Aktivität durch *in vitro* Biotransformationsstudien konnten erstmals durch Wahl *et al.* (2010) die Komponenten des humanen Enzymsystems vollständig rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Durch erfolgreiche Rekonstitution der Proteine im Inkubationsansatz und Optimierung der Inkubationsbedingungen konnte in vorangegangenen Untersuchungen die mARC-abhängige Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen wie *N*-Hydroxyguanidinen, Sulfhydroxamsäuren, aromatischen Hydroxylaminen sowie hydroxylierten DNA-Basen-Analoga gezeigt werden (Grünewald *et al.*, 2008, Havemeyer *et al.*, 2010, Kotthaus *et al.*, 2011, Krompholz *et al.*, 2012).

Die Charakterisierung der Reduktion *N*-oxygenierter Verbindungen ist von großer Bedeutung für den Abbau von toxischen und mutagenen Metaboliten sowie bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe, in Bezug auf deren Prodrug-Aktivierung oder des Wirkverlustes durch schnelle Metabolisierung (Clement, 2002, Krompholz *et al.*, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit standen die Aufklärung der Funktion und die Substratspezifität des Molybdoenzym mARC im Vordergrund. Dazu wurden weitere Stoffklassen wie Oxime, *N*-Oxide, Hydroxamsäuren und *O*-substituierte Amidoxime hinsichtlich der mARC-abhängigen *N*-Reduktion untersucht und die enzymkinetischen Parameter bestimmt. Zur Quantifizierung der gebildeten Metaboliten wurden geeignete HPLC-Methoden entwickelt. Anhand von *in vitro* Biotransformationsstudien mit isolierten porcinen hepatischen und extrahepatischen subzellulären Fraktionen sollte zunächst die Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in den unterschiedlichen Kompartimenten ermittelt werden, um dann in anschließenden Studien gezielt die mARC-abhängige *N*-Reduktion durch das humane rekombinante Enzymsystem zu untersuchen.

Aus vorangegangenen Untersuchungen konnte für *N*-hydroxylierte Verbindungen, u.a. auch für Oxime und Hydroxamsäuren, die sauerstoffunabhängige durch NADH katalysierte Anreicherung in porcinen und humanen Mitochondrien beschrieben werden (Heberling *et al.*, 2006, Dissertation Amschler, 2004). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass das mitochondriale Enzymsystem mARC an der Reduktion von Oximen und Hydroxamsäuren beteiligt ist. Deshalb galt es zu klären, ob diese Vermutung bestätigt werden kann und welche Unterschiede sich im Vergleich zwischen porcinen und humanen Enzymsystem bezüglich der *N*-reduktiven Aktivität ergeben. Für die Modellverbindungen beider Substanzklassen konnte die angereicherte *N*-Reduktion in Schweinelebermitochondrien bestätigt und erstmals auch für extrahepatische Mitochondrien und die äußere mitochondriale Membranfraktion gezeigt werden. Zur weiteren Charakterisierung der Beteiligung von mARC an der *N*-Reduktion von Oximen und Hydroxamsäuren wurden anschließend *in vitro* Inkubationen mit dem rekombinant hergestellten humanen Enzymsystem mARC-1 und mARC-2 durchgeführt.

Als Modellverbindung für die Oxime wurde das 2,4,6-Trimethylacetophenonoxim ausgewählt. Da für diese Verbindung sowohl das (*E*)- als auch das (*Z*)-Isomer isoliert werden kann, ließ sich zusätzlich der Einfluss von sterischen Unterschieden auf die *N*-Reduktion untersuchen. So war es zum ersten Mal möglich für *N*-hydroxylierte Verbindungen die isolierten (*E*)- und (*Z*)-Isomere getrennt hinsichtlich ihrer mARC-abhängigen Metabolisierung zum stabilen Imin durch das rekombinante humane Enzymsystem zu charakterisieren und mit den zuvor gezeigten Versuchen zur Reduktion nativer porciner Proteinquellen zu vergleichen. Dabei konnten isomeren-spezifische Unterschiede der enzymatischen Aktivität aufgezeigt werden. Wie bereits Heberling (2004) beobachten konnte, ist in porcinen subfraktionierten Geweben das (*E*)-Isomer das bevorzugte Substrat, wohingegen im rekombinanten Enzymsystem mARC-1 die (*Z*)-Form des Oxims deutlich schneller gegenüber mARC-2 zum korrespondierenden Imin reduzierte. Dass mARC-1 eine deutlich erhöhte *N*-reduktive Aktivität aufweist, konnte in kürzlich veröffentlichten Studien für *N*-hydroxylierte DNA-Basenanaloga gezeigt werden (Krompholz et al., 2012). Durchgeführte Gen-Knockdown-Experimente mit siRNA gegen die mARC-Isoenzyme in humanen Zelllinien bestätigten, dass mARC-1 für die *N*-reduktive Aktivität von besonderer Bedeutung ist (Pitzko, Dissertation in Vorbereitung). In weiteren Studien sollten humane subzelluläre Fraktionen getestet werden, um speziebedingte Unterschiede der mARC-Isoformen ausschließen zu können. Des Weiteren sollten die stereoisomeren Unterschiede in der Umsetzung der (*E*)- und (*Z*)-Form von mARC-1 und mARC-2 näher charakterisiert werden. Kristallisation des Molybdoenzyms könnte einen Aufschluss darüber geben, ob sterische Unterschiede der Substrate einen Einfluss auf die Erreichbarkeit zum katalytisch aktiven Zentrum des Enzyms und damit auf die *N*-reduktive Aktivität haben.

Als Modellsubstrat für die Substanzklasse der Hydroxamsäuren wurde die Benzhydroxamsäure gewählt. Deren enzymatische Reduktion zum korrespondierenden Amid mit dem humanen rekombinanten Enzymsystem konnte sowohl für mARC-1

als auch für mARC-2 erstmalig gezeigt werden. Dabei wurde eine deutliche Präferenz in der Umsetzung durch die Isoform 2 beobachtet. In weiterführenden Studien sollten deshalb z.B. aliphatische und heterocyclische Hydroxamsäuren auf deren *N*-Reduktion hin untersucht werden, um mögliche strukturelle Unterschiede der Verbindungen in Bezug auf deren Substratspezifität für mARC zu ermitteln.

Eine weitere wichtige Substanzklasse für enzymatische Untersuchungen mit mARC sind die Amin-*N*-oxide, da viele Arzneistoffe die entsprechende funktionelle Gruppe enthalten und noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Enzymsysteme an der Reduktion von *N*-Oxiden beteiligt sind (Breyer-Pfaff, 2004, Zheng *et al.*, 2011, Alama *et al.*, 2012). Als Modellverbindungen für diese Studien wurden Amitriptylin- und Nicotinamid-*N*-oxid ausgewählt, um gleichzeitig Unterschiede zwischen tertiären aliphatischen und heterocyclischen aromatischen *N*-Oxiden zu klären. So konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals für beide Modellsubstrate eine enzymatische mARC-abhängige Reduktion zu den korrespondierenden Aminen nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine für das molybdänhaltige Enzymsystem übliche Anreicherung der Reduktaseaktivität in den porcinen subzellulären Fraktionen nicht detektiert werden. Im Vergleich zu durchgeführten Metabolismusstudien mit anderen Testsubstraten wie Benzamidoxim zeigte die *N*-Oxid-Reduktion etwa 50-fach geringere Umsetzungsraten in Mitochondrien bzw. der äußeren mitochondrialen Fraktion. Es wurden Inkubationen mit dem rekombinanten humanen mARC-haltigen Enzymsystem durchgeführt, um eine Beteiligung von mARC an der Reduktion der *N*-Oxide zu verifizieren. Für beide Substrate konnte die mARC-abhängige Reduktion zum Amin eindeutig nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung war dabei die beobachtete mARC-1 spezifische Umsetzung von Amitriptylin- und Nicotinamid-*N*-oxid. Bisherige Untersuchungen zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen durch das vollständig rekombinant hergestellte humane Enzymsystem mit mARC-1 und mARC-2 zeigten stets für beide Isoenzyme *N*-reduktive Aktivitäten (Havemeyer *et al.* 2010; Kotthaus *et al.*, 2011; Krompholz *et al.*, 2012).

Umso erstaunlicher war es, dass mARC-2 nur vernachlässigbar geringe Umsetzungs-raten lieferte. Es ist denkbar, dass abhängig von der Spezies mARC-1 oder mARC-2 die Reduktion von *N*-Oxiden katalysiert. Deshalb sollte in weiteren Arbeiten unter-sucht werden, welche mARC-Isoform an der Reduktion in humanen Mitochondrien beteiligt ist.

Von großem pharmakologischen Interesse sind Prodrugs mit verbesserter oraler Bioverfügbarkeit (Peterlin-Masic *et al.*, 2006). Aktuell befinden sich zahlreiche Arzneistoffe, auf die das Prodrugprinzip „Amidoxime anstelle von Amidinen“ angewendet werden kann, in der klinischen Entwicklung (Havemeyer *et al.*, 2011, Uchida *et al.*, 2008, Matsson *et al.*, 2010). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass mARC an der Aktivierung von Amidoximen beteiligt ist (Havemeyer *et al.*, 2006), sodass in der vorliegenden Arbeit Studien zur Aktivierung des neuentwickel-ten Amidoxim-Prodrugs Upamostat (Mesupron®), ein Serin-Protease-Inhibitor zur Therapie des Pankreas- und Brustkrebses, durchgeführt wurden. Dabei konnte erstmals dessen durch mARC katalysierte *N*-Reduktion zur Amidin-Wirkform WX-UK1 gezeigt werden.

Ein weiteres Prinzip zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit basischer Wirk-stoffe mit Amidinen als funktionelle Gruppe besteht in der Synthese zu Methoxy-amidin-Prodrugs. Deshalb befassten sich weitere Studien dieser Arbeit mit der mARC-abhängigen Reduktion *O*-substituierter Amidoxime. Dabei sollte geklärt werden, ob eine direkte Demethoxylierung des Substrats *O*-Methylbenzamidoxim zum Benzamidin durch mARC katalysiert wird. Dies konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr verläuft die Reaktion nach dem beschriebenen Mechanismus von Wang *et al.* (2006 und 2007) bzw. Matsson *et al.* (2010), indem *O*-methylierte Amidoximderi-vate CYP 450-abhängig zum Amidoxim-Intermediat *O*-demethyliert werden. In einem zweiten Schritt kann dann mARC-abhängig die *N*-Reduktion zum Amidin erfolgen.

Die Ergebnisse der *in vitro* Biotransformationsstudien bestätigen, dass auch Oxime, N-Oxide und Hydroxamsäuren Substrate des N-reduktiven Enzymsystems sind. Unterschiede im Ausmaß der spezifischen Enzymaktivität im Vergleich zum Modellsubstrat Benzamidoxim sind einerseits vermutlich durch Löslichkeitseffekte im *in vitro* Inkubationssystem, wie bei den schlecht wasserlöslichen Substraten Upamostat und den untersuchten Oximen gezeigt, und andererseits durch unterschiedliche sterische Erreichbarkeiten der funktionellen Gruppen zum katalytisch aktiven Zentrum zu erklären und sollten anhand weiterführender Studien, z.B. durch Kristallisation der mARC-Enzyme bewiesen werden. Des Weiteren sollte der Mechanismus der Elektronenübertragung vom Molybdäncofaktor auf die funktionellen Gruppen untersucht werden, um somit substratspezifische Unterschiede aufzuklären.

Die Expression von mARC in zahlreichen humanen Organen wurde bereits anhand von mRNA-Expressionsanalysen (Su *et al.*, 2004) und auf Proteinebene durch Immunblot-Analysen für isolierte porcine hepatische und extrahepatische Mitochondrienfraktionen beschrieben (Krischkowski, 2010, Krompholz *et al.*, 2012). Dabei konnten im Rahmen eigener Studien für die getesteten Verbindungen vor allem hohe N-reduktive Aktivitäten in der porcinen Leber, Niere, Schilddrüse und dem Pankreas bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem Zellkulturexperimente humaner maligner Gewebe aus Pankreas-, Mamma- und Kolonkarzinomen sowie einer Nierenzelllinie durchgeführt. Es konnte in diesen Geweben N-reduktive Aktivität sowie mARC-1- und mARC-2-Expression detektiert werden, was das ubiquitäre Vorkommen des Enzymsystems bestätigte. In weiterführenden Studien sollten die Unterschiede der mARC-1 und mARC-2 Lokalisation sowie deren bisher unbekannte physiologische Funktionen aufgeklärt werden.

9. MATERIALIEN UND GERÄTE

9.1. SUBSTANZEN UND SONSTIGE MATERIALIEN

Wenn nicht anders angegeben, stammten die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen von der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe. Alle Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen.

Substanz / Material	Hersteller / Lieferant
96-Well Microplate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Acetonitril (HPLC-Grade)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin Standard (2 mg/ml)	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Anti-GAPDH antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-MOSC1 Peptide Affinity Purified Rabbit Polyclonal Antibody	Abgent Europe, Oxfordshire, (UK)
Anti-MOSC2 antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-MOSC2 (L-13) goat polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
BCA Protein Assay Kit Pierce®	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Benzamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Benzamidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Benzamidoxim	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

9. MATERIALIEN UND GERÄTE

Substanz / Material	Hersteller / Lieferant
Benzhydroxamsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Benzoessäure	Merck KGaA, Darmstadt
Cellstar® Gewebekulturplatte (6, 24 Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Serological Pipette (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Compat Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Complete® Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Donkey-anti- Goat (gekoppelt an POD)	Jackson Research, Suffolk, (UK)
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Gewebekulturflaschen (75 cm ² mit Filter im Deckel für adherent wachsende Zellen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glutamin (200 mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Fetales Bovines Serum Standard Qualität EU zugelassen	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Goat-anti-Rabbit (gekoppelt an POD)	Jackson Research, Suffolk, (UK)
HBSS (Hanks' Balanced Salt solution) mit Natriumbicarbonat, steril	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol (HPLC Grade)	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
NADH Dinatriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
NADPH	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumoctylsulfonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin
Nonidet® P40	AppliChem GmbH, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Substanz / Material	Hersteller / Lieferant
Phosphorsäure 85 %	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
Plastibrand UV-Küvette mikro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Polyclonal Antibody to Calnexin-Serum	Acris Antibodies GmbH, Herford
Polyclonal Antibody to VADC-2 – Aff - Purified	Acris Antibodies GmbH, Herford
PVDF Transfer Membrane Amersham Hybond™-P	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Flüssigmedium mit 2,0 g/l NaCO ₃	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure 36 %	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
Stripping Buffer	Candor Bioscience GmbH, Wangen
Trifluoressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1x) 0,05 %/0,02 % in D-PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Whatmann® Polyamidmembranfilter 0,45 µm	Whatmann® GmbH, Dassel

9.2. GERÄTE

Geräte	Hersteller
Agilent 1100 Series HPLC-System: G1316A ColCom Säulenofen G1329A ALS temperierter Autosampler G1322A Entgaser G1312A binäre Pumpe	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara (USA)
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
Cawomat 2000 IR	CAWO, Schrobenhausen
Clarity Lite HPLC-Software	DataApex™, Prag (Tschechische Republik)
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E Rotor JA10	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Messer-Homogenisator	Eigenbau der Universität Austin, Texas
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
Olympus CK2 Inverses Phasenkontrast- Mikroskop	Olympus GmbH, Hamburg
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
Sterilbank Klasse 2 Herasafe, Typ HS 12	Heraeus, Hanau

Geräte	Hersteller
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Ultraschallbad, Sonorex, Super RK 510H	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortex Genie® 2	Scientific Industries Inc., Bohemia (USA)
Vortexer IKA-Vibrax-VXR	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage Satorius CP 225D	Satorius AG, Göttingen
Waage Satorius L 2200P	Satorius AG, Göttingen

10. 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(5): 2020-2026.
- ACKERMANN, D.; POLLER, K.; LINNEWEH, W. (1926). Das Trimethylamin-oxyd als biologischer Wasserstoff-Acceptor. *Ber Dtsch Chem Ges* 59B(II): 2750-2751.
- AHMAD, A.; SOCHA, J.; VEČEŘA, M. (1974). Hydrolysis of benzhydroxamic acids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 39: 3293-3303.
- ALAMA, A.; ORENGO, A. M.; FERRINI, S.; GANGEMI, R. (2012). Targeting cancer-initiating cell drug-resistance: a roadmap to a new-generation of cancer therapies? *Drug Discov Today* 17(9-10): 435-442.
- AMSCHLER, J. (2004) Reduktiver Arzneistoffmetabolismus von *N*-Hydroxyamidinen, Hydroxylaminen und Hydroxamsäuren. *Dissertation*. Kiel.
- 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(1): 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(4): 570-578.

- ANSEDE, J. H.; VOYKSNER, R. D.; ISMAIL, M. A.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E. (2005). *In vitro* metabolism of an orally active O-methyl amidoxime prodrug for the treatment of CNS trypanosomiasis. *Xenobiotica* 35(3): 211-226.
- AXELROD, J. (1955). The enzymatic deamination of amphetamine (benzedrine). *J Biol Chem* 214(2): 753-763.
- BALZARINI, J.; STEVENS, M.; DE CLERCQ, E.; SCHOLS, D.; PANNECOUQUE, C. (2005). Pyridine N-oxide derivatives: unusual anti-HIV compounds with multiple mechanisms of antiviral action. *J Antimicrob Chemother* 55(2): 135-138.
- BAUER, L.; EXNER, O. (1974). Die Chemie der Hydroxamsäuren und N-Hydroxyimide. *Angew Chem* 86(12): 419-458.
- BERGSTRÖM, M. A.; ANDERSSON, S. I.; BROO, K.; LUTHMAN, K.; KARLBERG, A. T. (2008). Oximes: metabolic activation and structure-allergenic activity relationships. *J Med Chem* 51(8): 2541-2550.
- BERNHEIM, M. L. (1969). The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 134(2): 408-413.
- BERNHEIM, M. L.; HOCHSTEIN, P. (1968). Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 124(1): 436-442.
- BERNHEIM, M. L. C. (1965). Metabolism of Anthranilic Hydroxamic Acid by Rat Liver. *Arch Biochem Biophys* 112: 191-195.

-
- BEWLEY, M. C.; MAROHNIC, C. C.; BARBER, M. J. (2001). The structure and biochemistry of NADH-dependent cytochrome b₅ reductase are now consistent. *Biochemistry* 40(45): 13574-13582.
- BICKEL, M. H. (1969). The pharmacology and biochemistry of N-oxides. *Pharmacol Rev* 21(4): 325–355.
- BICKEL, M. H. (1972). Liver metabolic reactions: tertiary amine N-dealkylation, tertiary amine N-oxidation, N-oxide reduction, and N-oxide N-dealkylation. I. Tricyclic tertiary amine drugs. *Arch Biochem Biophys* 148(1): 54-62.
- BICKEL, M. H.; WEDER, H. J. (1969). Buccal absorption and other properties of pharmacokinetic importance of imipramine and its metabolites. *J Pharm Pharmacol* 21(3): 160-168.
- BITTNER, F. (2012) MOSC Family of MO Enzymes. IN KRETSINGER, R. H., UVERSKY, V. N. & PERMYAKOV, E. A. (Eds.) *Springer Reference*.
- BITTNER, F.; OREB, M.; MENDEL, R. R. (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276(44): 40381-40384.
- BORDET, T.; BUISSON, B.; MICHAUD, M.; DROUOT, C.; GALEA, P.; DELAAGE, P.; AKENTIEVA, N. P.; EVERS, A. S.; COVEY, D. F.; OSTUNI, M. A.; LACAPERE, J. J.; MASSAAD, C.; SCHUMACHER, M.; STEIDL, E. M.; MAUX, D.; DELAAGE, M.; HENDERSON, C. E.; PRUSS, R. M. (2007). Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 322(2): 709-720.

- BORGESE, N.; D'ARRIGO, A.; DE SILVESTRIS, M.; 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 Lett* 325(1-2): 70-75.
- BOUCHER, J. L.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D. (1994). Dehydration of Alkylaldoxime and Arylaldoxime as a New Cytochrome-P450 Catalyzed Reaction - Mechanism and Stereochemical Characteristics. *Biochemistry* 33(25): 7811-7818.
- BREYER-PFAFF, U. (2004). The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man. *Drug Metab Rev* 36(3-4): 723-746.
- BURGER, A.; WACHTER, H. (1998) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. *Record-Number: 53*. 8. Auflage ed. Berlin, Walter de Gruyter.
- 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. *Eukaryot Cell* 10(10): 1270-1282.
- CHAYKIN, S. (1966). Nicotinamid-*N*-oxid, ein biologisches Oxidationsmittel. *Angew Chem* 10(79): 476.
- CHAYKIN, S.; BLOCH, K. (1959). The metabolism of nicotinamide-*N*-oxide. *Biochim Biophys Acta* 31(1): 213-216.
- CLEMENT, B. (1998) Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: importance of the reduction of genotoxic *N*-hydroxylated functional groups.

-
- CLEMENT, B. (2002). Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* 34(3): 565–579.
- CLEMENT, B.; JUNG, F. (1994). *N*-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. Possible relationship to the biological oxidation of arginine to *NG*-hydroxyarginine, citrulline, and nitric oxide. *Drug Metab Dispos* 22(3): 486–497.
- CLEMENT, B.; KUNZE, T. (1990). Hepatic microsomal *N*-hydroxylation of adenine to 6-*N*-hydroxylaminopurine. *Biochem Pharmacol* 39(5): 925-933.
- CLEMENT, B.; KUNZE, T. (1992). The reduction of 6-*N*-hydroxylaminopurine to adenine by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 44(8): 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(31): 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(5): 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-piperidinyloxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* 33(11): 1740-1747.
- CLEMENT, B.; RAETHER, W. (1985). Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittelforschung* 35(7): 1009-1014.
- DA CRUZ, S.; XENARIOS, I.; LANGRIDGE, J.; VILBOIS, F.; PARONE, P. A.; MARTINOU, J. C. (2003). Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 278(42): 41566-41571.
- DAMBROVA, M.; UHLEN, S.; WELCH, C. J.; WIKBERG, J. E. (1998). Identification of an *N*-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur J Biochem* 257(1): 178-184.
- DICK, R. A.; KANNE, D. B.; CASIDA, J. E. (2006). Substrate specificity of rabbit aldehyde oxidase for nitroguanidine and nitromethylene neonicotinoid insecticides. *Chem Res Toxicol* 19(1): 38-43.
- DUNER, K.; HULTHE, J.; TRANBERG, M. (2012). Determination of the thrombin inhibitor AZD0837 and its metabolites in human bile using mixed mode solid phase extraction and LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 904: 29-34.
- DUNSTAN, W. R.; GOULDING, E. (1899). The action of alkyl haloids on hydroxylamine. Formation of substituted hydroxylamines and oxamines *J Chem Soc Trans* 75(0): 792-807.
- ECKARDT, N. A. (2001). New Insights into Auxin Biosynthesis. *Plant Cell* 13(1): 1-3.

- ERTONGUR, S.; LANG, S.; MACK, B.; WOSIKOWSKI, K.; MUEHLENWEG, B.; GIRES, O. (2004). Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* 110(6): 815-824.
- 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(10): 2393-2404.
- FUCCELLA, L. M.; GOLDANIGA, G.; LOVISOLO, P.; MAGGI, E.; MUSATTI, L.; MANDELLI, V.; SIRTORI, C. R. (1980). Inhibition of lipolysis by nicotinic acid and by acipimox. *Clin Pharmacol Ther* 28(6): 790-795.
- GABEL, S.; ISLINGER, M.; SCHRADER, M.; BITTNER, F.; MENDEL, R. R.; CLEMENT, B.; HAVEMEYER, A. (2012). The Mammalian Molybdoenzyme mARC – Localized In Peroxisomes? *9th MDO and 12th European ISSX meeting Noordwijk aan Zee, the Netherlands* P207.
- GOBBINI, M.; ARMAROLI, S.; BANFI, L.; BENICCHIO, A.; CARZANA, G.; FEDRIZZI, G.; FERRARI, P.; GIACALONE, G.; GIUBILEO, M.; MARAZZI, G.; MICHELETTI, R.; MORO, B.; POZZI, M.; SCOTTI, P. E.; TORRI, M.; CERRI, A. (2008). Novel analogues of istaroxime, a potent inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase: synthesis and structure-activity relationship. *J Med Chem* 51(15): 4601-4608.
- GORROD, J. W.; CHRISTOU, M. (1986) Metabolic N-hydroxylation of substituted acetophenone imines. I. Evidence for formation of isomeric oximes.

- GREER, F.; PEARSON, D. E. (1955). The Beckmann Rearrangement . VII. The Isolation and Rearrangement of 2,4,6-Trimethylacetophenone Oxime. *J Am Chem Soc* 77(24): 6649-6650.
- GRÜNEWALD, S. (2008) Studien zur Biotransformation N-hydroxylierter Verbindungen durch molybdäncofaktorabhängige Enzymsysteme. *Dissertation*. Kiel.
- GRÜNEWALD, 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(24): 8173-8177.
- GUENGERICH, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14(6): 611–650.
- GUSTAFSSON, D.; ELG, M. (2003). The pharmacodynamics and pharmacokinetics of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran and its active metabolite melagatran: a mini-review. *Thromb Res* 109 Suppl 1: S9-15.
- HACKETT, C. S.; STRITTMATTER, P. (1984). Covalent cross-linking of the active sites of vesicle-bound cytochrome b₅ and NADH-cytochrome b₅ reductase. *J Biol Chem* 259(5): 3275-3282.
- HALL, J. E.; KERRIGAN, J. E.; RAMACHANDRAN, K.; BENDER, B. C.; STANKO, J. P.; JONES, S. K.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R. (1998). Anti-Pneumocystis activities of aromatic diamidoxime prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* 42(3): 666-674.

- HAND, E. S.; JENCKS, W. P. (1962). Mechanism of Reaction of Imido Esters with Amines. *J Am Chem Soc* 84(18): 3505-3514.
- HAUSER, C. R.; HOFFENBERG, D. S. (1955). Formation of Certain Mesityl Ketoximes from Ketimines - Beckmann Rearrangements. *Journal of the American Chemical Society* 77(18): 4885-4887.
- 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(46): 34796-34802.
- 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(11): 1917-1921.
- HAVEMEYER, A.; LANG, J.; CLEMENT, B. (2011). The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab Rev* 43(4): 524-539.
- HEBERLING, S. (2004) Neue Reduktionen von Oximen und Derivaten durch mikrosomale und mitochondriale Enzyme. *Dissertation*. Kiel.
- HEBERLING, S.; GIRRESER, U.; WOLF, S.; CLEMENT, B. (2006). Oxygen-insensitive enzymatic reduction of oximes to imines. *Biochem Pharmacol* 71(3): 354-365.

- HEINEMANN, V.; EBERT, M.; PINTER, T.; MALA, C.; NEVILLE, N.; BEVAN, P. (2010). Randomized Phase II Trial with an uPA Inhibitor (WX-671) in Patients with Locally Advanced Non-Metastatic Pancreatic Cancer. *Ann. Oncol.* 21: 226-226.
- HES, J.; STERNSON, L. A. (1974). The metabolism of acetophenone oxime in rat liver homogenates. *Drug Metab Dispos* 2(4): 345-350.
- HILLE, R.; NISHINO, T. (1995). Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J* 9(11): 995-1003.
- HIRSCH, P. F.; KAPLAN, N. O. (1961). The conversion of pyridine hydroxamic acids to amides by mouse liver mitochondria. *J Biol Chem* 236: 926-930.
- HOVIUS, R.; LAMBRECHTS, H.; NICOLAY, K.; DE KRUIJFF, B. (1990). Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1021(2): 217-226.
- HUCKER, H. B. (1973). Phenylacetone oxime - an intermediate in amphetamine deamination. *Drug Metab Dispos* 1(1): 332-336.
- HUCKER, H. B.; MICHNIEWICZ, B. M.; RHODES, R. E. (1971). Phenylacetone oxime - an intermediate in the oxidative deamination of amphetamine. *Biochem Pharmacol* 20(8): 2123-2128.
- ICHIDA, K.; MATSUMURA, T.; SAKUMA, R.; HOSOYA, T.; NISHINO, T. (2001). Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem Biophys Res Commun* 282(5): 1194-1200.

- IRVING, C. C. (1964). Enzymatic *N*-Hydroxylation of the Carcinogen 2-Acetylaminofluorene and the Metabolism of *N*-Hydroxy-2-Acetylaminofluorene-9-¹⁴C *in vitro*. *J Biol Chem* 239: 1589-1596.
- 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(1): 83-92.
- KALIA, J.; RAINES, R. T. (2008). Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(39): 7523-7526.
- KALISIAK, J.; RALPH, E. C.; ZHANG, J.; CASHMAN, J. R. (2011). Amidine-oximes: reactivators for organophosphate exposure. *J Med Chem* 54(9): 3319-3330.
- KATAOKA, H.; HORIYAMA, S.; YAMAKI, M.; OKU, H.; ISHIGURO, K.; KATAGI, T.; TAKAYAMA, M.; SEMMA, M.; ITO, Y. (2002). Anti-inflammatory and anti-allergic activities of hydroxylamine and related compounds. *Biol Pharm Bull* 25(11): 1436-1441.
- KATO, R.; IWASAKI, K.; NOGUCHI, H. (1976). Stimulatory effect of FMN and methyl viologen on cytochrome P-450 dependent reduction of tertiary amine *N*-oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 72(1): 267-274.
- KATSURA, H.; KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1993). Purification and characterization of salicylhydroxamic acid reductase from rat liver. *Arch Biochem Biophys* 302(2): 356-361.

KEISU, M.; ANDERSSON, T. B. (2010). Drug-induced liver injury in humans: the case of ximelagatran. *Handb Exp Pharmacol* (196): 407-418.

KINDMARK, A.; JAWAID, A.; HARBRON, C. G.; BARRATT, B. J.; BENGTSSON, O. F.; ANDERSSON, T. B.; CARLSSON, S.; CEDERBRANT, K. E.; GIBSON, N. J.; ARMSTRONG, M.; LAGERSTROM-FERMER, M. E.; DELLSSEN, A.; BROWN, E. M.; THORNTON, M.; DUKES, C.; JENKINS, S. C.; FIRTH, M. A.; HARROD, G. O.; PINEL, T. H.; BILLING-CLASON, S. M.; CARDON, L. R.; MARCH, R. E. (2008). Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *Pharmacogenomics J* 8(3): 186-195.

KITAMURA, S.; OHASHI, K. N. K.; SUGIHARA, K.; HOSOKAWA, R.; AKAGAWA, Y.; OHTA, S. (2001). Extremely high drug-reductase activity based on aldehyde oxidase in monkey liver. *Biol Pharm Bull* 24(7): 856-859.

KITAMURA, S.; SUGIHARA, K.; TATSUMI, K. (1994). Reductase activity of aldehyde oxidase toward the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene and the related hydroxamic acids. *Biochem Mol Biol Int* 34(6): 1197-1203.

KITAMURA, S.; SUGIHARA, K.; TATSUMI, K. (1999a). A unique tertiary amine *N*-oxide reduction system composed of quinone reductase and heme in rat liver preparations. *Drug Metab Dispos* 27(1): 92-97.

KITAMURA, S.; TAKEKAWA, K.; SUGIHARA, K.; TATSUMI, K.; OHTA, S. (1999b). Pseudo-enzymatic reduction of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to 2-acetylaminofluorene mediated by cytochrome P450. *Carcinogenesis* 20(2): 347-350.

- KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1984a). Involvement of liver aldehyde oxidase in the reduction of nicotinamide *N*-oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 120(2): 602-606.
- KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1984b). Reduction of tertiary amine *N*-oxides by liver preparations: function of aldehyde oxidase as a major *N*-oxide reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 121(3): 749–754.
- KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1985). Purification of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene reductase from rabbit liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 133(1): 67-74.
- KITAMURA, S.; WADA, Y.; TATSUMI, K. (1984). NAD(P)H-dependent reduction of nicotinamide *N*-oxide by an unique enzyme system consisting of liver microsomal NADPH-cytochrome c reductase and cytosolic aldehyde oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 125(3): 1117–1122.
- KOTTHAUS, J.; WAHL, B.; HAVEMEYER, A.; KOTTHAUS, J.; 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(2): 383-391.
- 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(1): 51-65.
- 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(1-2): 41-50.

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(8): 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-SCHONBERG, 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(11): 2443-2450.

KROON, A. I.; DOLIS, D.; MAYER, A.; LILL, R.; KRUIJFF, B. (1997). Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* 1325(1): 108–116.

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(3): 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(10): 1366-1373.
- LIN, J.; CASHMAN, J. R. (1997). Detoxication of tyramine by the flavin-containing monooxygenase: stereoselective formation of the trans oxime. *Chem Res Toxicol* 10(8): 842-852.
- LIU, L.; NAM, S.; TIAN, Y.; YANG, F.; WU, J.; WANG, Y.; SCUTO, A.; POLYCHRONOPOULOS, P.; MAGIATIS, P.; SKALTSOUNIS, L.; JOVE, R. (2011). 6-Bromoindirubin-3'-oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells. *Cancer Res* 71(11): 3972-3979.
- LÖFFLER, G.; PETRIDES, P. E. (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin, Springer Verlag.
- LOTLIKAR, P. D.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A.; MARGRETH, A. (1965). The enzymatic reduction of the N-hydroxy derivatives of 2-acetylaminofluorene and related carcinogens by tissue preparations. *Cancer Res* 25(10): 1743-1752.
- LOWENTHAL, J. (1954). Enzymatic conversion of salicylhydroxamic acid to salicylamide. *Nature* 174(4418): 36-37.
- 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(1): 237-244.
- MATSSON, E. M.; PALM, J. E.; ERIKSSON, U. G.; BOTTNER, P.; LUNDAHL, A.; KNUTSON, L.; LENNERNAS, H. (2011). Effects of ketoconazole on the in vivo biotransformati-

- on and hepatobiliary transport of the thrombin inhibitor AZD0837 in pigs. *Drug Metab Dispos* 39(2): 239-246.
- MCKEOWN, S. R.; COWEN, R. L.; WILLIAMS, K. J. (2007). Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19(6): 427-442.
- MENDEL, R. R.; BITTNER, F. (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta* 1763(7): 621-635.
- MENDEL, R. R.; KRUSE, T. (2012). Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim Biophys Acta* 1823(9): 1568-1579.
- MEYER, J. E.; BROCKS, C.; GRAEFE, H.; MALA, C.; THANS, N.; BURGLE, M.; REMPEL, A.; ROTTER, N.; WOLLENBERG, B.; LANG, S. (2008). The Oral Serine Protease Inhibitor WX-671 - First Experience in Patients with Advanced Head and Neck Carcinoma. *Breast Care* 3(s2): 20-24.
- MIDGLEY, I.; FITZPATRICK, K.; TAYLOR, L. M.; HOUCHEM, T. L.; HENDERSON, S. J.; WRIGHT, S. J.; CYBULSKI, Z. R.; JOHN, B. A.; MCBURNEY, A.; BOYKIN, D. W.; TRENDLER, K. L. (2007). Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2,5-bis[4-(N-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride). *Drug Metab Dispos* 35(6): 955-967.
- MIHARA, K.; SATO, R. (1978). Detergent-solubilized NADH-cytochrome b₅ reductase. *Methods Enzymol* 52: 102-108.

MONDER, C. (1967). Discussion: effect of DMSO on enzyme activity. *Ann N Y Acad Sci* 141(1): 300-301.

MURRAY, K. N.; CHAYKIN, S. (1966a). The enzymatic reduction of nicotinamide *N*-oxide. *J Biol Chem* 241(9): 2029-2034.

MURRAY, K. N.; CHAYKIN, S. (1966b). The reduction of nicotinamide *N*-oxide by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 241(15): 3468-3473.

MUTLIB, A. E.; CHEN, S. Y.; ESPINA, R. J.; SHOCKCOR, J.; PRAKASH, S. R.; GAN, L. S. (2002). P450-mediated metabolism of 1-[3-(aminomethyl)phenyl]-*N*-[3-fluoro-2'-(methylsulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl]-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (DPC 423) and its analogues to aldoximes. Characterization of glutathione conjugates of postulated intermediates derived from aldoximes. *Chem Res Toxicol* 15(1): 63-75.

MUTSCHLER, E.; GEISSLINGER, G.; KROEMER, H. K.; RUTH, P.; SCHÄFER-KORTING, M. (2008) *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

NEVE, E. P.; NORDLING, A.; ANDERSSON, T. B.; HELLMAN, U.; DICZFALUSY, U.; JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. (2012). An amidoxime reductase system in adipocyte mitochondria containing cytochrome *b*₅ type B (CYB5B) and molybdenum cofactor sulfurase C-terminal containing 2 (MOSC2) of importance for lipid synthesis. *J Biol Chem* 287(9): 6307-6317.

OTT, H.; BERGSTROM, M. A.; HEISE, R.; SKAZIK, C.; ZWADLO-KLARWASSER, G.; MERK, H. F.; BARON, J. M.; KARLBERG, A. T. (2009). Cutaneous metabolic activation of

- carvoxime, a self-activating, skin-sensitizing prohapten. *Chem Res Toxicol* 22(2): 399-405.
- PARLI, C. J.; WANG, N.; MCMAHON, R. E. (1971a). The enzymatic N-hydroxylation of an imine. A new cytochrome P-450-dependent reaction catalyzed by hepatic microsomal monooxygenases. *J Biol Chem* 246(22): 6953–6955.
- PARLI, C. J.; WANG, N.; MCMAHON, R. E. (1971b). Mechanism of Oxidation of d-Amphetamine by Rabbit Liver Oxygenase. Oxygen-18 Studies. *Biochem Biophys Res Commun* 43(5): 1204-1209.
- PARMAR, D.; BURKA, L. T. (1991). Metabolism and disposition of cyclohexanone oxime in male F-344 rats. *Drug Metab Dispos* 19(6): 1101-1107.
- PETERLIN-MASIC, L.; CESAR, J.; ZEGA, A. (2006). Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr Pharm Des* 12(1): 73-91.
- PICKARD, P. L.; TOLBERT, T. L. (1961). Improved Method of Ketimine Synthesis. *J Org Chem* 26(12): 4886-4888.
- PILLAY, V.; DASS, C. R.; CHOONG, P. F. (2007). The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer. *Trends Biotechnol* 25(1): 33-39.
- PLITZKO, B. (2010) Optimierung der *in vitro* Rekonstitution des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems. *Diplomarbeit*. Kiel.
- POWIS, G.; DEGRAW, C. L. (1980). N-Oxide reduction by hemoglobin, cytochrome C and ferrous ions. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 30(1): 143-150.

- POWIS, G.; WINCENTSEN, L. (1980) Pyridine nucleotide cofactor requirements of indicine *N*-oxide reduction by hepatic microsomal cytochrome P-450.
- PRYDE, D. C.; DALVIE, D.; HU, Q.; JONES, P.; OBACH, R. S.; TRAN, T. D. (2010). Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem* 53(24): 8441-8460.
- RAD, M. N. S.; KHALAFI-NEZHAD, A.; KARIMITABAR, F.; BEHROUZ, S. (2010). An Efficient One-Pot Synthesis of Oxime Ethers from Alcohols Using Triphenylphosphine/Carbon Tetrachloride. *Synthesis-Stuttgart* (10): 1724-1730.
- RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; OH, D.; JARVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. (2008). Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* 7(3): 255-270.
- SABAN, N.; BUJAK, M. (2009). Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 64(2): 213-221.
- 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 dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b₅ and NADH cytochrome b₅ reductase. *Drug Metab Dispos* 33(12): 1886-1893.
- SCHMITZ, S. (2009) *Der Experimentator: Zellkultur*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R. (2006). Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annu Rev Plant Biol* 57: 623-647.

- SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R.; RIBBE, M. W. (2009). Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 460(7257): 839-847.
- SCHWERING, U. (2010) Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs. *Dissertation*. Kiel.
- SETYONO-HAN, B.; STURZEBECKER, J.; SCHMALIX, W. A.; MUEHLENWEG, B.; SIEUWERTS, A. M.; TIMMERMANS, M.; MAGDOLEN, V.; SCHMITT, M.; KLIJN, J. G.; FOEKENS, J. A. (2005). Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumour growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK1. *Thromb Haemost* 93(4): 779-786.
- SHIMADA, S.; MISHIMA, H.; KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1987). Nicotinamide N-oxide reductase activity in bovine and rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(7): 1204-1206.
- SIPOS, B.; MOSER, S.; KALTHOFF, H.; TOROK, V.; LOHR, M.; KLOPPPEL, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an *in vitro* research platform. *Virchows Arch* 442(5): 444-452.
- STEINHILBER, D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; ROTH, H. J. (2005) *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe*, Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag.
- 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.; HOGENSECH, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16): 6062-6067.

- SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; OHTA, S.; TATSUMI, K. (2000). Reduction of hydroxamic acids to the corresponding amides catalyzed by rabbit blood. *Xenobiotica* 30(5): 457-467.
- SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1983). Evidence for reduction of hydroxamic acids to the corresponding amides by liver aldehyde oxidase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 31(9): 3366-3369.
- SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1996). S-(-)-nicotine-1'-N-oxide reductase activity of rat liver aldehyde oxidase. *Biochem Mol Biol Int* 40(3): 535-541.
- SUGIHARA, K.; TATSUMI, K. (1986). Participation of liver aldehyde oxidase in reductive metabolism of hydroxamic acids to amides. *Arch Biochem Biophys* 247(2): 289-293.
- SUGIURA, M.; IWASAKI, K.; KATO, R. (1976). Reduction of tertiary amine N-oxides by liver microsomal cytochrome P-450. *Mol Pharmacol* 12(2): 322-334.
- SUGIURA, M.; IWASAKI, K.; NOGUCHI, H.; KATO, R. (1974). Evidence for the involvement of cytochrome P-450 in tiaramide N-oxide reduction. *Life Sciences* 15(8): 1433-1442.
- TAKEKAWA, K.; KITAMURA, S.; SUGIHARA, K.; OHTA, S. (2001a). Non-enzymatic reduction of aliphatic tertiary amine N-oxides mediated by the haem moiety of cytochrome P450. *Xenobiotica* 31(1): 11-23.

- TAKEKAWA, K.; SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; OHTA, S. (2001b). Enzymatic and non-enzymatic reduction of brucine N-oxide by aldehyde oxidase and catalase. *Xenobiotica* 31(11): 769-782.
- TAKEKAWA, K.; SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; TATSUMI, K. (1997). Nonenzymatic reduction of brucine N-oxide by the heme group of cytochrome P450. *Biochem Mol Biol Int* 42(5): 977-981.
- TATSUMI, K.; ISHIGAI, M. (1987). Oxime-Metabolizing Activity of Liver Aldehyde Oxidase. *Arch Biochem Biophys* 253(2): 413-418.
- TERAYAMA, H. (1963). Aminoazo Dye Amine-N-Oxide as a Possible Intermediate Metabolite Preceding N-Demethylation and Ortho-Hydroxylation, as Well as Azo Dye-Protein Binding. *Gann* 54: 195-203.
- TESTAI, E. (2001). The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for in vitro toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol* 17(4-5): 271-285.
- THUITA, J. K.; WANG, M. Z.; KAGIRA, J. M.; DENTON, C. L.; PAINE, M. F.; MDACHI, R. E.; MURILLA, G. A.; CHING, S.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E.; BRUN, R. (2012). Pharmacology of DB844, an orally active aza analogue of pafuramidine, in a monkey model of second stage human African trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7): e1734.
- TOMATSU, H.; TAKANO, J.; TAKAHASHI, H.; WATANABE-TAKAHASHI, A.; SHIBAGAKI, N.; FUJIWARA, T. (2007). An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate trans-

- porter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(47): 18807-18812.
- UCHIDA, M.; OKAZAKI, K.; MUKAIYAMA, H.; ISAWA, H.; KOBAYASHI, H.; SHIOHARA, H.; MURANAKA, H.; KAI, Y.; KIKUCHI, N.; TAKEUCHI, H.; YOKOYAMA, K.; TSUJI, E.; OZAWA, T.; HOYANO, Y.; KOIZUMI, T.; MISAWA, K.; HARA, K.; NAKANO, S.; MURAKAMI, Y.; OKUNO, H. (2008). Orally active factor Xa inhibitors: investigation of a novel series of 3-amidinophenylsulfonamide derivatives using an amidoxime prodrug strategy. *Bioorg Med Chem Lett* 18(16): 4682-4687.
- UEDA, O.; SUGIHARA, K.; OHTA, S.; KITAMURA, S. (2005). Involvement of molybdenum hydroxylases in reductive metabolism of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian skin. *Drug Metab Dispos* 33(9): 1312-1318.
- VAISEY, E. B. (1956). The non-enzymic reduction of trimethylamine oxide to trimethylamine, dimethylamine, and formaldehyde. *Can J Biochem Physiol* 34(6): 1085-1090.
- VERGERES, G.; WASKELL, L. (1995). Cytochrome b₅, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* 77(7-8): 604-620.
- VICENTE, E.; VILLAR, R.; PEREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; GOLDMAN, R. C.; MONG, A. (2011). Quinoxaline 1,4-di-N-oxide and the potential for treating tuberculosis. *Infect Disord Drug Targets* 11(2): 196-204.
- WAGNER, J. (2011) Zelluläre Charakterisierung von Hemmstoffen der Histon-Acetyltransferasen und -Desacetylasen. *Dissertation*. Freiburg.

- WAHL, B. (2010) Grundlegende Charakterisierung des neuen Molybdo-Enzyms 'Mitochondrial Amidoxime Reducing Component' mARC in *Homo sapiens* und *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation*. Braunschweig.
- 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(48): 37847-37859.
- 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* 2010.
- WANG, M. Z.; SAULTER, J. Y.; USUKI, E.; CHEUNG, Y.-L.; HALL, M.; BRIDGES, A. S.; LOEWEN, G.; PARKINSON, O. T.; STEPHENS, C. E.; ALLEN, J. L.; ZELDIN, D. C.; BOYKIN, D. W.; TIDWELL, R. R.; PARKINSON, A.; PAINE, M. F.; HALL, J. E. (2006). CYP4F enzymes are the major enzymes in human liver microsomes that catalyze the O-demethylation of the antiparasitic prodrug DB 289 [2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxime]. *Drug Metab Dispos* 34(12): 1985–1994.
- WANG, M. Z.; WU, J. Q.; BRIDGES, A. S.; ZELDIN, D. C.; KORNBLUTH, S.; TIDWELL, R. R.; HALL, J. E.; PAINE, M. F. (2007). Human enteric microsomal CYP4F enzymes O-demethylate the antiparasitic prodrug pafuramidine. *Drug Metab Dispos* 35(11): 2067–2075.

- WHITBY, L. G. (1953). A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem J* 54(3): 437-442.
- YANG, Z. Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. (2011). Molybdenum nitrogenase catalyzes the reduction and coupling of CO to form hydrocarbons. *J Biol Chem* 286(22): 19417-19421.
- ZAREPOUR, M.; KASPARI, K.; STAGGE, S.; RETHMEIER, R.; MENDEL, R. R.; BITTNER, F. (2010). Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Mol Biol* 72(3): 301-310.
- ZHAO, Y. D. (2010). Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu Rev Plant Biol* 61: 49-64.
- ZHENG, M.; JIANG, J.; WANG, J.; TANG, X.; OUYANG, M.; DENG, Y. (2011). The mechanism of enzymatic and non-enzymatic N-oxide reductive metabolism of cyadox in pig liver. *Xenobiotica* 41(11): 964-971.
- ZHOU, L.; THAKKER, D. R.; VOYKSNER, R. D.; ANBAZHAGAN, M.; BOYKIN, D. W.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R. (2004). Metabolites of an orally active antimicrobial prodrug, 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxime, identified by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39(4): 351-360.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Themas und die mir gewährte Unterstützung möchte ich meinem Doktorvater herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Bei Frau Dr. Antje Havemeyer möchte ich mich ganz herzlich für die engagierte Betreuung und Hilfsbereitschaft, die unverzichtbaren Ratschläge sowie das sorgfältige und zügige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Dr. Florian Bittner und Debora Reichmann (TU Braunschweig) danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Bereitstellung der rekombinanten Proteine. Dem Arbeitskreis von Prof. Kalthoff (UK-SH Kiel) möchte ich ebenfalls danken für die humanen Zelllinien, die mir für die Testungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Für die technische Unterstützung im Labor bedanke ich mich bei Petra und Lena. Vor allem für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei HPLC-Problemen jeglicher Art möchte ich Sven danken. Ein Dankeschön geht auch an Carmen, die mir für meine Studien porcine Enzymquellen zur Verfügung gestellt hat.

Mein Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts, insbesondere der „mARC-Gruppe“ für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Vor allem möchte ich Heyka und Eva für das gründliche und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

DANKSAGUNG

Bei Ina, Annika, Jie, Sonja und Felix möchte ich mich außerdem für die schöne und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Semesterbetreuung bedanken.

Nina danke ich besonders für die hervorragende Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima während der gemeinsamen vierjährigen Bürogemeinschaft.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Michaela, die immer an mich geglaubt hat, immer für mich da war und einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat. Vielen Dank für das unermüdliche Durchforsten nach Tippfehlern.

Zuletzt danke ich meinen Eltern sowie der ganzen Familie, die stets ein großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt und mich in allem unterstützt haben.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name	Danilo Froriep
Geburtsdatum	13.05.1983
Geburtsort	Schwerin
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

Juni 2002	Abitur, Ernst-Barlach-Gymnasium, Güstrow
-----------	--

Studium und Ausbildung

WS 2003 bis SS 2007	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Januar bis Juni 2008	Pharmaziepraktikum am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Juli bis August 2008	Pharmaziepraktikum, Belvedere Apotheke, Kiel
Januar 2009	Erteilung der Approbation

Diplom

Oktober 2008	Diplomarbeit zum Thema „Reduktion von N-Oxiden durch die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente“ am Pharm. Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
--------------	--

Promotion und Weiterbildung

seit Februar 2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharm. Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
seit März 2009	Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

Erklärung zu § 7 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag:

Froriep, D.; Reichmann, D.; Bittner, F., Mendel, R.R., Clement, B., Havemeyer, A. (2012) mARC-dependent Enzymatic N-Reduction Of Oximes To Imines; 9th MDO and 12th European ISSX meeting; Noordwijk aan Zee.

Publikation:

Froriep, D., Clement, B., Bittner F., Mendel, R. R., Reichmann, D., Schmalix, W., und Havemeyer, A. (2013) Activation of the anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica*. (eingereicht und akzeptiert)

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, im Januar 2013

Danilo Froriep

Kurzfassung

Die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte im menschlichen Organismus identifizierte Molybdoenzym. Es ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle in der sauerstoffunabhängigen *N*-Reduktion. Zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom *b*₅ und der NADH Cytochrom *b*₅ Reduktase katalysiert mARC die Reduktion einer Vielzahl *N*-hydroxylierter Verbindungen wie z.B. Amidine, Guanidine, Amidinohydrazone, aromatische Amine und *N*-hydroxylierte Nucleoside und Nucleobasen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von *in vitro* Biotransformationsstudien mit porcinen isolierten subzellulären Fraktionen sowie mit dem humanen rekombinanten Enzymsystem die Reduktion neuer potentieller Substrate für mARC untersucht. Es konnte erstmals für Verbindungen aus der Gruppe der Oxime, *N*-Oxide und Hydroxamsäuren die mARC-abhängige *N*-Reduktion zu deren korrespondierenden Metaboliten beschrieben werden. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in der Substratspezifität zwischen den beiden homologen Enzymen mARC-1 und mARC-2.

Des Weiteren wurde die enzymatische Aktivierung des neuen Amidoxim-Prodrugs Upamostat zur Wirkform WX-UK1 näher charakterisiert. Eine Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems an der *N*-Reduktion des Serin-Protease-Inhibitors konnte erstmalig bestätigt werden.

Dem Enzymsystem kann somit eine entscheidende Beteiligung an der Metabolisierung von Fremdstoffen zugesprochen werden. Bei der klinischen Entwicklung neuer Arzneistoffkandidaten mit *N*-oxygenierten funktionellen Gruppen kann daher sowohl mit einer Aktivierung von Prodrugs als auch mit einer Inaktivierung durch die mARC-abhängige *N*-Reduktion gerechnet werden.

Abstract

The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is the fourth mammalian molybdenum-containing enzyme. It is localized in the outer mitochondrial membrane where it plays an important role in the oxygen insensitive reduction. Together with the electron transport proteins cytochrome b₅ and NADH cytochrome b₅ reductase electrons are transmitted to the molybdenum cofactor (Moco) of the mARC protein and reductions of a number of *N*-hydroxylated compounds such as amidines, guanidines, amidinohydrazones, aromatic amines, and *N*-hydroxylated nucleosides and nucleobases are performed.

In this thesis the reduction of new potential substrates for mARC was investigated by *in vitro* biotransformation studies with purified porcine subcellular fractions as well as with the human recombinant enzyme system. The mARC-dependent *N*-reduction of compounds with functional groups such as oximes, *N*-oxides and hydroxamic acids are described for the first time. Significant differences in substrate specificity could be demonstrated between the two homologues mARC-1 and mARC-2.

Furthermore, the enzymatic activation of the new amidoxime-prodrug Upamostat to the active form WX-UK1 was characterized. The involvement of the mARC-containing enzyme system in the *N*-reduction of the serine protease inhibitor was confirmed for the first time.

Thus mARC contributes both to the activation of prodrugs and to the metabolism of xenobiotics. In conclusion it could be demonstrated that *N*-oxygenated compounds can be easily reduced to their corresponding metabolites by the mitochondrial enzyme system. This has to be considered in clinical development of new drug candidates. Their reduction could mean a fast loss of activity.