

**Untersuchungen zu  
genetischen Variationen  
im mARC-haltigen  
N-reduktiven Enzymsystem**



DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON

**Gudrun Ott**

KIEL, 2013

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Tag der mündlichen Prüfung:

06. Juni 2013

Zum Druck genehmigt:

06. Juni 2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

„...IUCUNDI ACTI LABORES.“

*Cicero, de finibus 2,105*



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1.	DAS HUMANE GENOM .....	1
1.2.	EINZELNUKLEOTID-POLYMORPHISMEN .....	2
1.2.1.	Definition.....	2
1.2.2.	Arten von SNPs .....	3
1.2.2.1.	SNPs im codierenden Bereich der DNA .....	3
1.2.2.1.1.	Nonsynonymous missense SNPs.....	4
1.2.2.1.2.	Nonsynonymous nonsense SNPs .....	4
1.2.2.1.3.	Synonymous SNPs.....	5
1.2.2.2.	SNPs im nicht-codierenden Bereich der DNA.....	6
1.3.	AUSWIRKUNGEN VON POLYMORPHISMEN AUF DEN ARZNEISTOFFMETABOLISMUS. .....	6
1.4.	DAS <i>N</i> -REDUKTIVE DREIKOMPONENTENSYSTEM.....	9
1.4.1.	Mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente.....	10
1.4.2.	Cytochrom b <sub>5</sub> Typ B.....	12
1.4.3.	NADH-Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase.....	14
1.4.4.	Assoziationsstudien zu SNPs .....	15
1.5.	SULFAMETHOXAZOL UND XIMELAGATRAN .....	16
1.6.	THEMA DER ARBEIT .....	17

<b>2.</b>	<b>GENOTYPISIERUNG.....</b>	<b>19</b>
2.1.	EINLEITUNG .....	19
2.2.	ZIELSETZUNG.....	22
2.3.	METHODEN.....	22
2.3.1.	Datenbankrecherche und Auswahl der SNPs in <i>MARC1</i> und <i>MARC2</i> ....	22
2.3.2.	Probanden .....	23
2.3.3.	DNA-Isolierung .....	23
2.3.4.	Genotypisierung.....	23
2.4.	ERGEBNISSE.....	26
2.4.1.	Datenbankrecherche und Auswahl der SNPs.....	26
2.4.2.	Genotypisierung.....	27
2.5.	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.....	29
<b>3.</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN UND NATIVEN ENZYMQUELLEN .....</b>	<b>31</b>
3.1.	EINLEITUNG .....	31
3.2.	ZIELSETZUNG.....	32
3.3.	METHODEN.....	33
3.3.1.	Rekombinant hergestellte humane Proteine .....	33
3.3.1.1.	Klonierung, Expression und Aufreinigung der Proteine .....	34
3.3.1.2.	Bestimmung des Proteingehalts .....	34
3.3.1.3.	Bestimmung des Molybdängehalts in den mARC-Proteinen .....	35
3.3.1.4.	Bestimmung des FormA-dephospho-Gehalts der mARC-Proteine.....	37
3.3.1.5.	Bestimmung des Hämgehalts im Cytochrom b <sub>5</sub> Typ B .....	37

3.3.1.6.	Bestimmung des FAD-Gehalts der NADH-Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase .....	38
3.3.1.7.	Kontrolle der Reinheit der rekombinanten Proteine mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese .....	38
3.3.2.	Native porcine Enzymquellen .....	39
3.3.2.1.	Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus porcinen Organen .....	39
3.3.2.2.	Charakterisierung der gewonnenen Zellfraktionen .....	39
3.3.2.2.1.	Bestimmung des Proteingehalts .....	39
3.3.2.2.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	39
3.3.2.2.3.	Westernblot.....	40
3.4.	ERGEBNISSE.....	41
3.4.1.	Charakterisierung der rekombinant hergestellten humanen Proteine .....	41
3.4.2.	Überprüfung der Notwendigkeit des Umpufferns der mARC-Proteine vor der Mo-Bestimmung mittels ICP-MS.....	42
3.4.3.	Molybdänsättigung der mARC-Varianten im Vergleich zum Wildtypprotein .....	43
3.4.4.	Prüfung auf Korrelation zwischen FormA-dephospho- und Mo-Gehalt....	44
3.4.5.	Hämgehalte der Cytochrom b <sub>5</sub> Typ B-Proteine.....	46
3.4.6.	Charakterisierung der nativen porcinen Enzymquellen.....	46
3.5.	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.....	49
<b>4.</b>	<b>FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG GENETISCHER VARIANTEN AM SUBSTRAT BENZAMIDOXIM.....</b>	<b>51</b>
4.1.	EINLEITUNG .....	51
4.2.	ZIELSETZUNG.....	52
4.3.	METHODEN.....	52
4.3.1.	Materialien und Geräte .....	52
4.3.2.	Enzymquellen .....	52

## INHALTSVERZEICHNIS

4.3.3.	<i>In vitro</i> Biotransformation von Benzamidoxim zu Benzamidin .....	53
4.3.3.1.	Inkubationsansatz.....	53
4.3.3.2.	HPLC-Analytik .....	53
4.3.3.3.	Ermittlung der kinetischen Parameter .....	54
4.3.4.	Statistische Auswertung .....	55
4.4.	ERGEBNISSE.....	55
4.4.1.	Sicherstellung geeigneter Inkubationsbedingungen .....	55
4.4.2.	Auswirkungen eines Chargenwechsels der Wildtypproteine .....	56
4.4.3.	Untersuchung der mARC-Einfachvarianten.....	59
4.4.4.	Untersuchung der mARC-Mehrfachvarianten.....	60
4.4.5.	Untersuchung der Cytochrom b <sub>5</sub> TypB-Varianten.....	63
4.5.	DISKUSSION.....	64
4.6.	ZUSAMMENFASSUNG .....	69
<b>5.</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN AM SUBSTRAT</b>	
	<b>SULFAMETHOXAZOLHYDROXYLAMIN.....</b>	<b>70</b>
5.1.	EINLEITUNG .....	70
5.1.1.	Der Arzneistoff Sulfamethoxazol.....	70
5.1.2.	Wirkungen von Sulfamethoxazol auf die Schilddrüse .....	72
5.1.3.	Hypersensitivitätsreaktionen durch Sulfamethoxazol.....	73
5.2.	ZIELSETZUNG.....	76
5.3.	METHODEN.....	77
5.3.1.	Materialien und Geräte .....	77
5.3.2.	Enzymquellen .....	77
5.3.3.	<i>In vitro</i> Biotransformation von Sulfamethoxazolhydroxylamin zu Sulfamethoxazol .....	77



## INHALTSVERZEICHNIS

5.3.3.1.	Zusammensetzung der Inkubationsansätze .....	77
5.3.3.2.	HPLC-Analytik .....	78
5.4.	ERGEBNISSE.....	80
5.4.1.	Untersuchung subzellulärer porciner Fraktionen .....	80
5.4.1.1.	Sicherstellung geeigneter Inkubationsbedingungen .....	80
5.4.1.2.	Prüfung auf Beteiligung des <i>N</i> -reduktiven Enzymsystems an der Reduktion .....	81
5.4.1.3.	Kinetische Parameter .....	83
5.4.2.	Untersuchung der humanen rekombinant hergestellten mARC-Proteine	84
5.4.2.1.	Sicherstellung geeigneter Inkubationsbedingungen .....	84
5.4.2.2.	Ermittlung der für die Reduktion notwendigen Komponenten.....	85
5.4.2.3.	Auswirkungen eines Chargenwechsel der Wildtypproteine .....	87
5.4.2.4.	Einfluss von Zusätzen zum Inkubationsansatz auf die Aktivität .....	90
5.4.2.5.	Kinetische Parameter .....	92
5.4.3.	Untersuchung der Kombination von mARC- mit Cytochrom $b_5$ Typ B- Varianten .....	95
5.5.	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.....	98
<b>6.</b>	<b>BIOMARKERTEST.....</b>	<b>101</b>
6.1.	EINLEITUNG .....	101
6.2.	ZIELSETZUNG.....	105
6.3.	METHODEN.....	106
6.3.1.	HLA-Typisierung .....	106
6.3.2.	<i>Capture</i> -Versuche.....	107
6.4.	ERGEBNISSE.....	108
6.4.1.	HLA-Typisierung .....	108

6.4.2.	Prüfung der rekombinant hergestellten löslichen HLA-Moleküle auf Reinheit .....	109
6.4.3.	<i>Capture</i> -Versuche mit rekombinant hergestellten löslichen HLA-Molekülen .....	109
6.5.	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.....	111
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>117</b>
8.1.	ANHANG ZU KAPITEL 2.....	117
8.1.1.	Abbildungen.....	117
8.2.	ANHANG ZU KAPITEL 3.....	118
8.2.1.	Abbildungen.....	118
8.2.2.	Tabellen.....	122
8.3.	ANHANG ZU KAPITEL 4.....	127
8.3.1.	Abbildungen.....	127
8.3.2.	Tabellen.....	131
8.3.3.	Substratabhängigkeiten der mARC-Proteine mit Benzamidoxim.....	133
8.4.	ANHANG ZU KAPITEL 5.....	153
8.4.1.	Abbildungen.....	153
8.4.2.	Tabellen.....	159
8.4.3.	Substratabhängigkeiten der mARC-Proteine mit Sulfamethoxazol- hydroxylamin.....	161

<b>9.</b>	<b>GERÄTE UND MATERIALIEN .....</b>	<b>181</b>
9.1.	SUBSTANZEN .....	181
9.2.	MATERIALIEN .....	183
9.3.	GERÄTE .....	185
<b>10.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>186</b>
<b>11.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>201</b>
11.1.	ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN .....	201
11.2.	ABKÜRZUNGEN DER NUKLEINBASEN.....	203
11.3.	SYMBOLE FÜR AMINOSÄUREN.....	203
	Danksagung .....	206
	Lebenslauf .....	207
	Erklärung zu § 8 der Promotionsordnung .....	208
	Kurzfassung.....	211
	Abstract.....	213



## 1. EINLEITUNG

### 1.1. DAS HUMANE GENOM

Das Genom des Menschen stellt die Gesamtheit vererbbarer Informationen dar und besteht aus zwei Komponenten, dem Kerngenom und dem mitochondrialen Genom (Brown 2007).

Im Zellkern jeder humanen Zelle befindet sich das sogenannte Kerngenom. Es besteht aus insgesamt 46 Chromosomen, jeweils zwei Kopien der 22 Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen (Brown 2007). Eine Kopie stammt vom Vater und die andere von der Mutter (Bickeböller und Fischer 2007). 2001 wurde die Entschlüsselung des humanen Genoms verkündet (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001) und 2004 die endgültige Sequenz bekannt gegeben (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Circa. 3,2 Milliarden Basenpaare bilden das Kerngenom, in dem etwa 23.000 Gene enthalten sind (Brown 2007).

Das mitochondriale Genom liegt in einfacher Kopie als zirkuläre DNA in den Mitochondrien vor. Es besteht aus 16.569 Basenpaaren, die 37 Gene enthalten, und wird ausschließlich über die mütterliche Keimbahn weitergegeben (Brown 2007; Bickeböller und Fischer 2007).

Die Sequenz eines Gens besteht aus einem Promotor, einem Startsignal, Exons, Introns, einem Stoppsignal sowie den nicht translatierten Regionen (*untranslated regions*, UTR) am Anfang und Ende eines Gens (5'- und 3'-UTR). Im Verlauf der Proteinbiosynthese wird der Bereich zwischen Start- und Stoppsignal zunächst in RNA transkribiert, anschließend werden die Introns durch den Spleißvorgang herausgeschnitten. Es entsteht mRNA, deren Information abschließend in die Proteinsequenz translatiert wird (Bickeböller und Fischer 2007; Brown 2007; Berg *et al.* 2013).

Die Stelle eines spezifischen Abschnitts auf einem Chromosom bezeichnet man auch als Genort oder Locus. Über die Allel- und Genotypenfrequenzen an einzelnen Loci können die genetischen Strukturen in Populationen beschrieben werden. Sie werden

u.a. durch Transmission, Migration, Selektion, Mutation und Veränderungen der Populationsgröße sowie des Paarungsverhaltens beeinflusst. Von einer Generation zur nächsten tauchen in kleinen, endlichen Populationen Schwankungen in den Allel- und Genotypenfrequenzen auf, wobei der Zufall entscheidet, welches Allel in der Population verbleibt (Bickeböller und Fischer 2007).

2002 wurde das *International HapMap Project* ins Leben gerufen mit dem Ziel, eine Karte mit den Mustern genetischer Variationen im menschlichen Genom zu erstellen. Es wurden 270 DNA-Proben aus verschiedenen Populationen untersucht, und zwar jeweils 30 Elternpaare mit einem erwachsenen Kind aus den USA (europäischer Abstammung) und aus Afrika sowie jeweils 45 nicht verwandte Chinesen und Japaner. Die gefundenen Veränderungen wurden in der öffentlichen Datenbank *Database of Single Nucleotide Polymorphisms* (dbSNP) hinterlegt und laufend neue Daten aus dem Projekt veröffentlicht (International HapMap Consortium 2003; International HapMap Consortium 2005; Frazer *et al.* 2007; Altshuler *et al.* 2010).

### 1.2. EINZELNUKLEOTID-POLYMORPHISMEN

#### 1.2.1. Definition

Die DNA enthält die für die Vererbung von Eigenschaften und Merkmalen erforderliche Information, welche in der Sequenz der einzelnen Nukleotide hinterlegt ist. Während manche Organismen an bestimmten Stellen des Genoms ein bestimmtes Nukleotid besitzen, besitzen andere dort ein anderes. Dies bezeichnet man als Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP, ausgesprochen „snip“) (Brown 2007). Während frühere Definitionen eine Frequenz des varianten Allels von 1% forderten (Brookes 1999), lassen aktuell veröffentlichte Frequenzdaten erkennen, dass diese Definition mittlerweile weniger dogmatisch interpretiert wird. Mittlerweile sind mehr als 52 Millionen SNPs in der Datenbank dbSNP ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_summary.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi)) veröffentlicht, die in den etwa 3,2 Milliarden Basenpaaren des humanen Genoms enthalten sind. SNPs stellen die am häufigsten auftretende Art genetischer Sequenzvariation dar (International HapMap Consortium 2003).

Da theoretisch an jeder Stelle des Genoms jedes der vier Nukleotide vorkommen kann, könnte man annehmen, dass jeder SNP alle vier Allele zeigen müsste. In der

Praxis bestehen die meisten SNPs aber nur aus zwei Allelen. Dies hängt mit der Entstehung der SNPs zusammen. Sie entstehen durch Punktmutationen im Genom, wodurch ein Nukleotid in ein anderes überführt wird. Wenn diese Mutation die Keimzelle eines Individuums betrifft, kann diese Mutation an die Nachkommen vererbt werden und der SNP kann sich nach mehreren Generationen in der Population etablieren. Zu diesem Zeitpunkt gibt es allerdings nur zwei Allele. Ein drittes Allel kann nur entstehen, wenn das Genom eines anderen Individuums an genau der gleichen Stelle erneut mutiert und über Vermehrung das neue Allel in der Population etabliert wird. Dies ist aus rein statistischen Gründen nicht ausgeschlossen, jedoch sehr unwahrscheinlich (Brown 2007).

### **1.2.2. Arten von SNPs**

SNPs kommen in allen Abschnitten des Genoms vor. Man unterscheidet SNPs, die im codierenden Bereich der DNA liegen, von denen die im nicht-codierenden Bereich liegen (Schaaf und Zschocke 2013).

#### **1.2.2.1. SNPs im codierenden Bereich der DNA**

Auswirkungen von SNPs im codierenden Bereich der DNA sind leicht nachvollziehbar. Der genetische Code ist degeneriert, d.h. ein Codon aus drei Nukleotiden codiert für eine Aminosäure. Für 18 der 20 Aminosäuren gibt es zwei oder mehr Codons; einzig Tryptophan und Methionin werden von einem Triplet codiert. Wird die Sequenz eines Tripletcodons verändert, so kann das direkte Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins haben. Daher besitzt die Untersuchung von SNPs im codierenden Bereich der DNA eine große Bedeutung, weil eine Änderung der biologischen Funktion der resultierenden Proteinvariante entstehen kann (Berg *et al.* 2013). Bemerkenswert ist, dass der codierende Bereich der DNA nur etwa 2 Prozent der menschlichen Genomsequenz umfasst (Schaaf und Zschocke 2013).

Im codierenden Bereich der DNA können drei Arten von SNPs auftreten, die im internationalen Sprachgebrauch als *nonsynonymous missense* SNPs, *nonsynonymous nonsense* SNPs und *synonymous* SNPs bezeichnet werden.

### 1.2.2.1.1. *Nonsynonymous missense SNPs*

Verändert eine Mutation das Triplettcodon so, dass es für eine andere Aminosäure codiert, spricht man von einem *nonsynonymous missense* SNP (nsSNP).

**ACC ⇒ GCC T [Thr] ⇒ A [Ala]**

Das mutierte Gen codiert dann für ein Protein, das eine veränderte Aminosäure besitzt. Solche Veränderungen können entweder toleriert werden oder Auswirkungen auf die Funktion des Proteins haben.

Als Beispiel sei hier auf die hepatische Metabolisierung der Statine verwiesen. Die Statine Pravastatin (Pravasin<sup>®</sup>), Atorvastatin (Sortis<sup>®</sup>), Rosuvastatin (Crestor<sup>®</sup>), Simvastatin (Zocor<sup>®</sup>) und Lovastatin (Mevinacor<sup>®</sup>) werden über das *organic anion transporting polypeptide C* (OATP1B1) in die Hepatozyten transportiert. OATP1B1 wird durch das *SLCO1B1*-Gen codiert. Patienten mit den SNPs 1118G>A, 388A>G und 521T>C zeigen unter Pravastatin eine 130% höhere *area under the curve* (AUC) im Vergleich zu Patienten ohne Polymorphismen. Der SNP 521T>C (rs4149056) stört die Lokalisierung des Transporters in der Hepatozytenmembran und ruft dadurch pharmakokinetische Veränderungen hervor. Heterozygote Träger der resultierenden Proteinvariante V174A haben eine *odds ratio* von 4,5 für eine Myopathie, homozygote Träger eine von 16,9 (Ghatak *et al.* 2010).

### 1.2.2.1.2. *Nonsynonymous nonsense SNPs*

Die Mutation kann ein Codon, das für eine Aminosäure steht, auch in ein Stoppcodon umwandeln.

**CGA ⇒ TGA R [Arg] ⇒ stopp**

Diese sogenannten *nonsense* SNPs kommen sehr viel seltener vor als zum Aminosäureaustausch führende SNPs. Es wird daher vermutet, dass sie größere Auswirkungen auf die Funktion des Proteins haben als ein Aminosäureaustausch. Die Mutation kann entweder zu einem verkürzten Protein führen oder zu einer funktionsunfähigen RNA, die nicht mehr translatiert werden kann. Umgekehrt kann ein Stoppcodon auch in ein Codon, das für eine Aminosäure codiert, umgewandelt werden. Dann spricht man von einer so genannten *readthrough* Mutation, durch die das Stoppcodon überlesen wird. Das resultierende Protein ist verlängert (Yamaguchi-Kabata *et al.* 2008).



### 1.2.2.1.3. *Synonymous SNPs*

Der genetische Code wird als degeneriert bezeichnet, da mehrere Codons für die gleiche Aminosäure codieren. Der Austausch des Nukleotids kann auch dazu führen, dass das Codon nach wie vor für die gleiche Aminosäure codiert. Man spricht in diesen Fällen von synonymen SNPs, *silent* SNPs oder auch stillen Mutationen.

**TTT ⇒ ATT    I [Ile] ⇒ I [Ile]**

Mittlerweile ist akzeptiert, dass diese stillen Mutationen Veränderungen in der Proteinexpression, -konformation und -funktion verursachen können (Sauna und Kimchi-Sarfaty 2011).

Die erste wichtige Publikation auf diesem Gebiet zeigte, dass ein synonymer SNP im *MDR1*-Gen (C3435T) gemeinsam mit einem (C1236T oder G2677T) oder zwei (C1236T und G2677T) weiteren synonymen SNPs das Genprodukt P-Glykoprotein so verändert, dass die Inhibitoren Ciclosporin A und Verapamil eine verminderte Effektivität zeigen (Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007). Erklärt wird dieses mit dem Wechsel eines häufig benutzten Codons zu einem nicht so häufig benutzten Codon, der die Translationsgeschwindigkeit der Ribosomen in den entsprechenden mRNA-Regionen verringert, wodurch die Faltung und somit Funktion des Proteins beeinflusst werden (Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007; Komar 2007).

Während der Proteinbiosynthese werden die Introns aus der transkribierten *precursor* mRNA mit Hilfe sogenannter Spliceosomen entfernt. Dies wird durch das Binden an sogenannte *exon splicing enhancer* (ESEs) erreicht. Das sind kurze exonische Nukleotidsequenzen, die die Spliceosomen an die korrekten Exon-Intron-Grenzen dirigieren. Stille Mutationen in diesen ESEs verhindern die korrekte Bindung der Spliceosomen und beeinflussen somit den *Splice*-Vorgang. Dadurch können Exons während der Translation übersprungen werden (*exon skipping*) und das Protein ist nicht mehr funktionsfähig. Ein Beispiel hierfür ist die c.3612A>C Mutation im *TCOF1*-Gen, die neben anderen Mutationen zum autosomal-vererbten Treacher-Collins Syndrom führt, einer erblichen Erkrankung, die Gesichtsfehlbildungen verursacht (Macaya *et al.* 2009).

Im *CFTR*-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sind über 1.500 Mutationen bekannt, die zu Cystischer Fibrose führen (Merk und Schubert-Zsilavec 2013). Die häufigste ist eine Deletion des Phenylalanins in Position 508, der sogenannten  $\Delta F508$ -Mutation, aus der eine stille Mutation resultiert. Im *CFTR*-Wildtypen folgt dem Codon 507 für Isoleucin das Codon 508 für Phenylalanin.

Dahinter verbirgt sich die Basensequenz ATC TTT. Durch Deletion des Cs des Isoleucincodons und der ersten beiden Ts des Phenylalanincodons entsteht das Codon ATT, das auch für Isoleucin codiert, aber einen synonymen SNP im Vergleich zu Codon 507 darstellt (Sauna und Kimchi-Sarfaty 2011). Dieser synonyme Austausch verändert die mRNA-Struktur und führt zu fehlerhaft gefaltetem, nicht funktionsfähigem Protein. Stellt man rekombinantes  $\Delta F508$  CFTR-Protein mit dem Wildtypcodon für Isoleucin her, so ist die mRNA korrekt gefaltet und die Funktion des Proteins wiederhergestellt (Bartoszewski *et al.* 2010).

### 1.2.2.2. SNPs im nicht-codierenden Bereich der DNA

SNPs im nicht-codierenden Bereich der DNA können funktionelle Konsequenzen für das Protein haben. Die Transkription ist in Eukaryoten komplex reguliert. In verschiedenen Bereichen der DNA finden sich Elemente zur Regulation der Transkription, z.B. Promotor- und Enhancerelemente (Berg *et al.* 2013). Regulatorische SNPs im Promotor können Einfluss auf die Transkription nehmen, intronische SNPs auf das Spleißen der RNA und SNPs in den nicht translatierten Regionen (*untranslated regions*, UTRs) auf die mRNA-Stabilität und die Translationseffizienz (Dingermann und Zündorf 2013).

Intronische SNPs werden vor allem in genomweiten Assoziationsstudien genannt, in denen Zusammenhänge zwischen Krankheitsbildern oder Arzneimittelnebenwirkungen und intronischen SNPs hergestellt werden (Aberg *et al.* 2010; Teslovich *et al.* 2010; Uhl *et al.* 2008).

### 1.3. AUSWIRKUNGEN VON POLYMORPHISMEN AUF DEN ARZNEISTOFFMETABOLISMUS

Treten SNPs in für den Arzneistoffmetabolismus relevanten Genen auf, so können Träger bestimmter Genotypen Veränderungen in der Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik zeigen (Sim und Ingelman-Sundberg 2011). Dies kann zu vermehrten Nebenwirkungen oder auch einem schlechteren Ansprechen auf das Arzneimittel führen und sollte unter optimalen Bedingungen im Sinne der stratifizierten Arzneimitteltherapie in den Therapieleitlinien entsprechend umgesetzt sein (Dingermann und Zündorf 2013).

Bekannte Arzneistoffe, bei denen das Vorliegen eines bestimmten Genotyps Einfluss auf die Therapie hat, sind u.a. Azathioprin, Clopidogrel, Irinotecan, Tamoxifen und Warfarin (Sim und Ingelman-Sundberg 2011).

Die Pharmakokinetik von **Azathioprin** (Imurek<sup>®</sup>) und **6-Mercaptopurin** (Puri-Nethol<sup>®</sup>) wird durch die Funktionsfähigkeit der Thiopurin-S-methyltransferase beeinflusst. Azathioprin wird im Körper nicht-enzymatisch zu 6-Mercaptopurin aktiviert, das Zellmembranen passieren kann und im Weiteren intrazellulär u.a. zu Thioinosinsäure umgewandelt wird. Die Thiopurin-S-methyltransferase inaktiviert 6-Mercaptopurin und Thioinosinsäure. Im *TPMT*-Gen können nichtsynonyme SNPs auftreten, die zu den defekten *TPMT*\*2, \*3A, \*3B und \*3C-Allelen führen. Diese Allele führen zu verstärkten Nebenwirkungen, insbesondere zu einer Knochenmarksdepression mit lebensbedrohlichen Infektionen, Anämie und starken Blutungen (Sim und Ingelman-Sundberg 2011). Ein Mangel an Enzymaktivität ist in Erythrozyten nachweisbar. Etwa 10% der Europäer zeigen eine deutlich reduzierte Enzymaktivität, bei 0,2% ist sie sogar kaum nachweisbar (Graefe *et al.* 2011). Nach der Fachinformation zu Imurek<sup>®</sup> (Stand: Juli 2009) wird eine Testung auf diese defekten *TPMT*-Allele prätherapeutisch bei einer hochdosierten Azathioprin-Therapie und bei rascher Verschlechterung des Blutbildes empfohlen.

Der Thrombozytenaggregationshemmer **Clopidogrel** (Plavix<sup>®</sup>) ist ein Prodrug, das u.a. über Cytochrom P450 2C19 zu seinem aktiven Metaboliten umgewandelt werden muss. Das *CYP2C19*-Gen ist polymorph und besitzt neben dem funktionsfähigen *CYP2C19*\*1-Allel zwei häufige Allele, *CYP2C19*\*2 und \*3, die eine deutlich verminderte Funktion zeigen (*loss of function*), während die *CYP2C19*-Allele \*4 bis \*8 nur eine leicht verringerte Funktion zeigen und nicht so häufig vorkommen. Dieses entspricht dem Status eines langsamen Metabolisierers. Daneben gibt es das *CYP2C19*\*17-Allel, dessen Träger Clopidogrel schneller metabolisieren (*gain of function*). Die *CYP2C19*\*2 und \*3 Allele kommen bei 2-5% der Europäer vor. Es existiert umfangreiche Literatur zur Wirksamkeit von Clopidogrel bei Trägern der beiden defekten *CYP2C19*-Allele. In einer Meta-Analyse (Mega *et al.* 2010) wurde ein signifikant höheres Risiko kardiovaskulärer Nebenwirkungen für die langsameren Metabolisierer herausgearbeitet. Prospektive randomisierte kontrollierte Studien zum *CYP2C19*-Genotyp gibt es bislang nicht. Darauf weist die Fachinformation zu Plavix<sup>®</sup> (Stand: Mai 2011) hin. Außerdem wird erwähnt, dass bei den Langsam-Metabolisierern ein nicht ausreichend aktiver Metabolit gebildet wird, was eine

verminderte Thrombozytenfunktionshemmung zur Folge hat. Auf entsprechende Testverfahren zur Bestimmung des *CYP2C19*-Genotyps wird hingewiesen. Diese Unsicherheit im Ansprechen auf Clopidogrel führte zur Entwicklung neuer Arzneimittel wie Prasugrel (Efient<sup>®</sup>) und Ticagrelor (Brilique<sup>®</sup>), deren Kinetik unabhängig von dem *CYP2C19*-Genotyp ist (Sim und Ingelman-Sundberg 2011).

**Irinotecan** (Campto<sup>®</sup>) ist ein Topoisomerase-1-Inhibitor, der zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Nach Aktivierung durch Carboxylesterase entsteht der chemotherapeutisch aktive Metabolit SN-38, der über die UDP-glucuronosyltransferase 1A1 inaktiviert wird (Marsh und Hoskins 2010). Träger des *UGT1A1\*28*-Allels besitzen in der TATA-Box des Promotors sieben statt sechs sogenannter *TA-repeats*. Dies verursacht eine verminderte Transkription und eine reduzierte Clearance des aktiven Metaboliten, wodurch das Risiko einer Neutropenie unter Irinotecan-Gabe steigt (Schulz *et al.* 2009). Nach der Fachinformation zu Campto<sup>®</sup> (Stand: Mai 2011) sollten homozygote Träger dieses Allels nach Auftreten hämatologischer Nebenwirkungen unter Standardtherapiedosis im Folgenden mit einer geringeren Dosis therapiert werden.

**Tamoxifen** (Novaldex<sup>®</sup>) wird als Estrogenrezeptorantagonist zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt. Tamoxifen ist ein Prodrug, das durch Cytochrom P450 2D6 zum aktiven Metaboliten Endoxifen aktiviert wird. Träger der *CYP2D6*-Allele *CYP2D6\*4* und *CYP2D6\*10* haben ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv und verkürzte rezidivfreie Überlebensraten. Diese Patienten würden eher von einer Therapie mit Aromataseinhibitoren profitieren (Sim und Ingelman-Sundberg 2011). Entsprechend ist in der Fachinformation zu Novaldex<sup>®</sup>20 (Stand: September 2011) vermerkt, dass die Wirksamkeit bei homozygoten Trägern des defekten *CYP2D6*-Allels reduziert ist. Es wird unter dem Punkt „pharmakokinetischen Eigenschaften“ darauf hingewiesen, dass die Konzentrationen an Endoxifen um etwa 75% erniedrigt sind, und zwar sowohl bei Trägern der inaktiven *CYP2D6*-Allelen als auch nach Gabe von starken *CYP2D6*-Inhibitoren.

**Warfarin** (Coumadin<sup>®</sup>) hemmt die Vitamin-K abhängige Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X in der Leber, indem es den Vitamin K-Konversionszyklus unterbricht. Die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren erfolgt über eine  $\gamma$ -Carboxylierung unter Verbrauch von reduziertem Vitamin K, dieses kann durch die Vitamin-K-Epoxidreduktase wieder regeneriert werden und steht der Aktivierung von Gerinnungsfaktoren erneut zur Verfügung. Warfarin hemmt die

Vitamin-K-Epoxidreduktase, allerdings wirkt es bei Patienten unterschiedlich stark. 25% dieser Wirksamkeitsunterschiede liegen im Bereich der Pharmakodynamik und können durch Polymorphismen v.a. im intronischen Bereich des *VKORC1*-Gens, das für die Vitamin-K-Epoxidreduktase codiert, erklärt werden. Daneben spielen Polymorphismen im codierenden Bereich des *CYP2C9*-Gens eine Rolle, die sich auf die Pharmakokinetik auswirken. Aufgrund der starken interindividuellen Variabilität in der wirksamen Dosis sind regelmäßige Tests auf Blutgerinnungswerte zur Abstimmung der Dosis notwendig (Jonas und McLeod 2009; Li 2006).

#### 1.4. DAS *N*-REDUKTIVE DREIKOMPONENTENSYSTEM

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC), Cytochrom  $b_5$  Typ B und die NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase bilden ein *N*-reduktives Enzymsystem, das in der Lage ist, *N*-hydroxylierte Verbindungen in Gegenwart von NADH zu reduzieren (Abb. 1.1).

Die physiologische Funktion dieses Enzymsystems ist noch weitgehend ungeklärt. Die Fähigkeit, *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-Arginin zu L-Arginin zu reduzieren, deutet auf eine Rolle in der Regulation der NO-Biosynthese hin (Kotthaus *et al.* 2011). Eine weitere Funktion könnte das Enzymsystem in der Entgiftung spielen. So ist es beispielsweise in der Lage, *N*-hydroxylierte DNA-Basen-Analoga zu reduzieren (Krompholz *et al.* 2012).

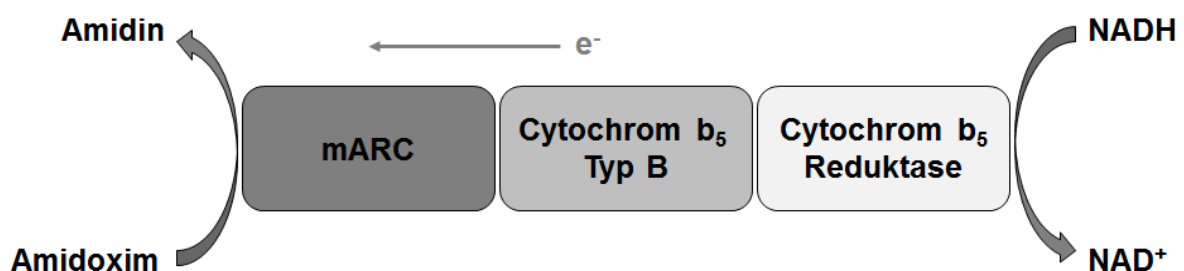


Abb. 1.1: Aufbau des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems

Einen wichtigen Platz hat das Enzymsystem in der Entwicklung von Prodrugs. Amidoxime (*N*-Hydroxyamide) können als Prodrugs von Amidinen eingesetzt werden. Dadurch wird die Basizität der Amidine herabgesetzt, eine positive Ladung und eine schwache Permeabilität werden vermieden. *In vivo* werden die Amidoxime

durch das *N*-reduktive Enzymsystem zu Amidinen reduziert und somit aktiviert (Clement 2002). Arzneistoffe, die dieses Prodrugprinzip tragen, sind Ximelagatran (Clement und Lopian 2003) und eine große Anzahl anderer Arzneistoffkandidaten, die sich in der Entwicklung befinden (Peterlin-Masic *et al.* 2006). Benzamidoxim wird als Modellsubstrat für dieses Prodrugprinzip genutzt.

### 1.4.1. Mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) ist ein molybdänhaltiges Enzym, das als dritte Komponente des *N*-reduktiven Dreikomponentensystems 2006 identifiziert worden ist (Havemeyer *et al.* 2006). Es stellt nach Aldehydoxidase, Xanthinoxidoreductase und Sulfitoxidase das vierte molybdänhaltige Enzym im Menschen dar.

Das humane Genom enthält zwei mARC-Gene, *MARC1* (NM\_022746.3) und *MARC2* (NM\_017898.3), die auf Chromosom 1 (1q41) lokalisiert sind. Sie weisen eine Tandemorientierung auf und ihre offenen Leseraster besitzen eine Sequenzidentität von 66% und eine Sequenzähnlichkeit von 80% (Wahl *et al.* 2010).

Die beiden mARC-Proteine, mARC-1 und mARC-2, enthalten einen Molybdäncofaktor (Moco) als prosthetische Gruppe, in dem Molybdän als Zentralatom mit fünf Liganden koordiniert ist (Abb. 1.2 (A)). Eukaryoten synthetisieren ihren Molybdäncofaktor in einer vierstufigen Reaktionskaskade: ausgehend vom Guanosintriphosphat (GTP) entsteht über cyclisches Pyranopterin Monophosphat (cPMP), Metallbindendes Pterin (MPT) und MPT-Adenosinmonophosphat (MPT-AMP) der Molybdäncofaktor (Moco). Prokaryoten können in einem anschließenden fünften Schritt das Molybdän bis-MPT Guanidinukleotid (Mo-bis-MGD) bilden (Schwarz *et al.* 2009). Molybdänhaltige Enzyme allgemein werden anhand ihrer Liganden im Molybdäncofaktor in zwei Familien unterteilt (Hille *et al.* 2011). In der Xanthinoxidase-Familie, zu denen die Xanthinoxidoreduktase und die Aldehydoxidase zählen, enthält der Molybdäncofaktor einen anorganischen Schwefel (Abb. 1.2. (B)). In der Sulfitoxidase-Familie, zu der die Sulfitoxidase, die pflanzliche Nitratreduktase und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch mARC gehören (Rajapakshe *et al.* 2011; Chamizo-Ampudia *et al.* 2011), enthält der Molybdäncofaktor einen Schwefel, der aus einem Cysteinrest des Proteins selbst stammt (Abb. 1.2. (C)).

Die Struktur der mARC-Proteine enthält eine mitochondriale Targeting-Sequenz, eine  $\beta$ -barrel Domäne und eine sogenannte MOSC-Domäne, die durch ein sehr stark konserviertes Cystein charakterisiert ist, das sich in mARC-1 in Position 273 und in mARC-2 in Position 272 befindet (Anantharaman und Aravind 2002; Hille *et al.* 2011).

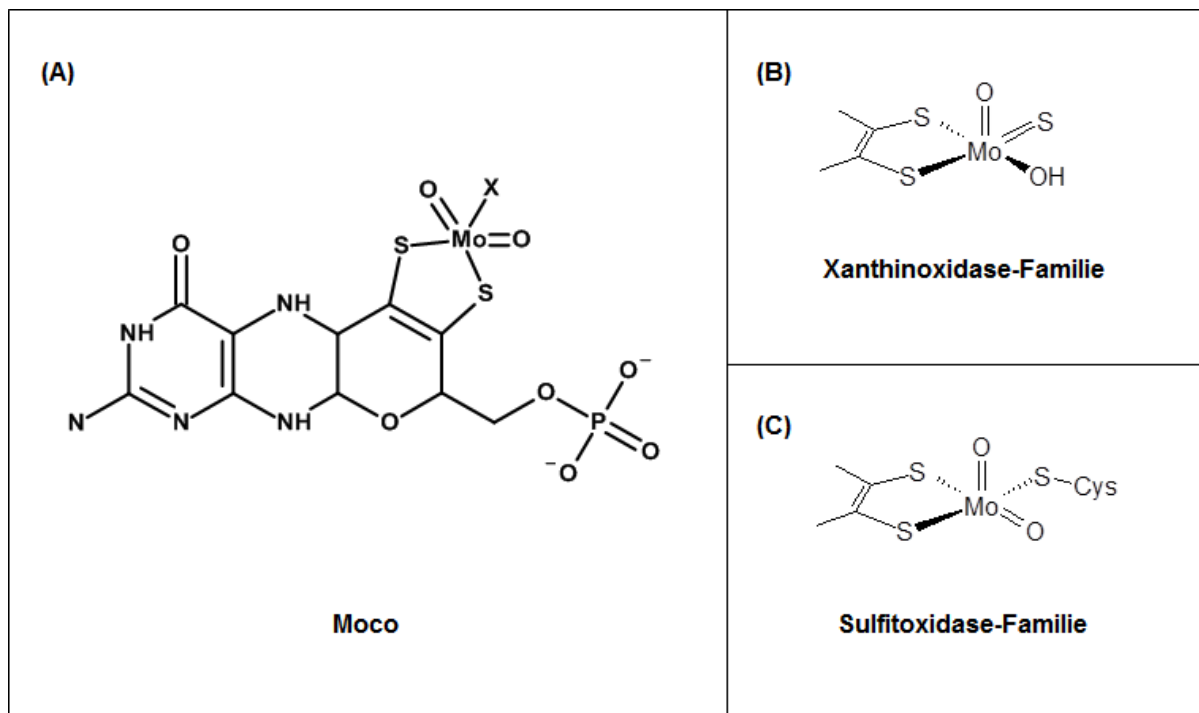


Abb. 1.2: Struktur des Molybdäncofaktors (Moco) allgemein (A) und detailliert in der Xanthinoxidase- (B) bzw. Sulfitoxidase-Familie (C)

Die subzelluläre Lokalisation der mARC-Proteine ist noch nicht vollständig geklärt (Hille *et al.* 2011). In verschiedenen Spezies ist für mindestens eine Isoform gezeigt worden, dass sie in den Mitochondrien lokalisiert ist. Im Schwein wurde mARC-2 aus der äußeren mitochondrialen Membran der Leber als dritte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems isoliert und identifiziert (Havemeyer *et al.* 2006). Hohe Konzentrationen wurden in den mitochondrialen subzellulären Fraktionen der porcinen Leber, Niere, Schilddrüse und Pankreas gefunden (Havemeyer *et al.* 2011; Krompholz *et al.* 2012). In der Maus wurden mARC-1 und mARC-2 aus der inneren mitochondrialen Membran der Leber isoliert (Da Cruz *et al.* 2003). Die mitochondriale Lokalisation konnte für mARC-2 durch Immunfluoreszenzstudien an murinen embryonalen Fibroblastenzellen bestätigt werden (Wahl *et al.* 2010). Außerdem ist mARC-2 an der *N*-reduktiven Aktivität muriner 3T3-L1-Zellen beteiligt (Neve *et al.*

2012). Darüber hinaus ist für mARC-2 eine Lokalisation in Peroxisomen sowohl nach Reinigung aus der Mäuseniere (Wiese *et al.* 2007) als auch aus der Rattenleber (Islinger *et al.* 2007) nachgewiesen worden. Aus Lebern weiblicher Ratten konnte mARC-2 ebenfalls aus der äußeren mitochondrialen Membran isoliert werden (Neve *et al.* 2012).

In humane Zelllinien (HEK-293, HepG2 und HeLa) wurde dagegen eine Lokalisation von mARC-1 in der äußeren mitochondrialen Membran nachgewiesen. Die katalytische Domäne am C-Terminus des Proteins ragt ins Cytosol, was einer sogenannten  $N_{(in)}-C_{(out)}$ -Membranorientierung entspricht. Für diese Lokalisation ist der N-Terminus des Proteins verantwortlich, der zwei unabhängige Sequenzmotive enthält, die den Einbau von mARC-1 in die Mitochondrien steuern. Eine transmembranäre Domäne (Reste 21-40) beinhaltet ein ausreichend großes mitochondriales Targeting-Signal und der N-Terminus (Reste 1-20) fungiert als supportiver Rezeptor für die äußere mitochondriale Membran. Der Einbau erfolgt auch in Abwesenheit des Molybdäncofaktors. Nach der Integration in die äußere mitochondriale Membran wird mARC-1 vermutlich in oligomere Proteinkomplexe eingebaut, die größer als 350 kDa sind. Für diesen Nachweis wurde mARC-1 am C-Terminus mit einem *myc-tag* versehen und in HEK-293-Zellen exprimiert. Nach Isolierung der Mitochondrien konnten Proteinkomplexe dieser Größe anschließend in Western Blot Analysen mit einem gegen den *myc-tag* gerichteten Antikörper nachgewiesen werden. (Klein *et al.* 2012).

### 1.4.2. Cytochrom $b_5$ Typ B

Das humane Genom codiert für zwei Isoformen des Cytochrom  $b_5$ : eine mikrosomale (CYB5A, NM\_148923.3) und eine mitochondriale Form (CYB5B, NM\_030579.2). Das Gen für die mikrosomale Form ist auf Chromosom 18 (18q23) lokalisiert, das für die mitochondriale Form auf Chromosom 16 (16q22.1). Am N-reduktiven Enzymsystem ist die mitochondriale Form des Cytochrom  $b_5$ , das Cytochrom  $b_5$  Typ B, beteiligt (Neve *et al.* 2012, Pnitzko *et al. in preparation*).

Cytochrom  $b_5$  Typ B besteht aus zwei Domänen: Der N-Terminus enthält eine hydrophile Häm-bindende Domäne. Diese besteht aus zwei hydrophoben Taschen, die durch ein fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblatt voneinander getrennt sind. Die Polypeptidkette faltet sich in der Sekundärstruktur in der Reihenfolge  $\beta 1-\alpha 1-\beta 4-\beta 3-\alpha 2-\alpha 3-\beta 5-\alpha 4-\alpha 5-\beta 2-\alpha 6$ , wobei  $\alpha 2-\alpha 3-\beta 5-\alpha 4-\alpha 5$  die Häm-Bindetasche des Proteins



darstellt (Durley und Mathews 1996). Das Eisenzentralatom des Häms geht mit den Stickstoffatomen zweier Histidinreste des Proteins eine koordinative Bindung ein. Darüber hinaus scheinen zwei Moleküle Wasser wesentlicher Bestandteil der Struktur zu sein (Abb. 1.3) (Parthasarathy *et al.* 2011).

Am C-Terminus befindet sich eine etwa 40 Aminosäuren umfassende hydrophobe Domäne (Spatz und Strittmatter 1971), die ein Targeting-Signal für die äußere mitochondriale Membran enthält und gleichzeitig den Membrananker darstellt (Silvestris *et al.* 1995).

Zur physiologischen Funktion des humanen Cytochrom  $b_5$  Typ B gibt es wenig Literatur. Beschrieben sind eine Beteiligung an der Reduktion von Semidehydroascorbat in der Leber (Ito *et al.* 1981) und eine Funktion als Aktivator der Androgensynthese (Ogishima *et al.* 2003).

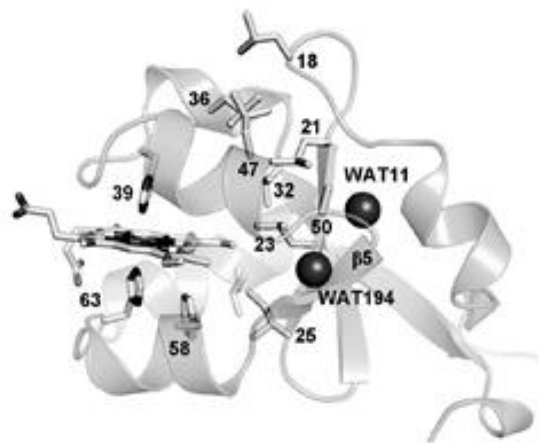


Abb. 1.3: Kristallstruktur des Cytochrom  $b_5$  Typ B aus (Parthasarathy *et al.* 2011)

Ein pathophysiologischer Zusammenhang wurde zwischen einer erhöhten Cytochrom  $b_5$  Typ B-Expression und Hodgkin- sowie aggressiven non-Hodgkin-Lymphomen beobachtet (Murphy *et al.* 2010). Außerdem gehört Cytochrom  $b_5$  Typ B zu den Genen bzw. Enzymen, die nach einer durch das luteinisierende Hormon (LH) vermittelten Aktivierung von LH-Rezeptoren in Prostatakrebszellen hochreguliert werden und die Steroidproduktion in diesen Zellen steigern (Pinski *et al.* 2011).

### 1.4.3. NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase

Das Gen für die NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase 3 (*CYB5R3*; NM\_007326.4) ist auf Chromosom 22 (22q13.2-q13.31) lokalisiert. Es codiert für zwei Isoformen, eine membrangebundene Isoform 1 und eine lösliche Isoform 2.

Das Protein enthält am *N*-Terminus einen Membrananker (Reste 1-30) und die FAD-bindende Domäne (Reste 30-145). Am C-Terminus (Reste 173-300) befindet sich die NADH-Bindestelle. Beide Domänen sind über ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt miteinander verknüpft (Abb. 1.4). Die Cofaktorbindung erfolgt dabei über die Stabilisierung der negativen Ladungen der Diphosphat-Gruppe des FADs durch den Dipolmoment der Helixstruktur (Bando *et al.* 2004).

Isoform 1 ist auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums und auf den Mitochondrien verankert. Physiologische Funktionen bestehen in der Desaturierung und Elongation von Fettsäuren (Oshino *et al.* 1971; Keyes und Cinti 1980) und in der Cholesterol-Biosynthese (Reddy *et al.* 1977). Isoform 2 ist eine Splicevariante der Isoform 1 (Borgese *et al.* 1993). Ihr fehlt der *N*-terminale Membrananker. Für die Reste 26-300 codiert also dasselbe Gen (Du *et al.* 1997). Sie wird auch als lösliche Form bezeichnet und befindet sich in den Erythrozyten und ist dort zusammen mit Cytochrom b<sub>5</sub> Typ A an der Reduktion von Methämoglobin beteiligt (Hultquist und Passon 1971).

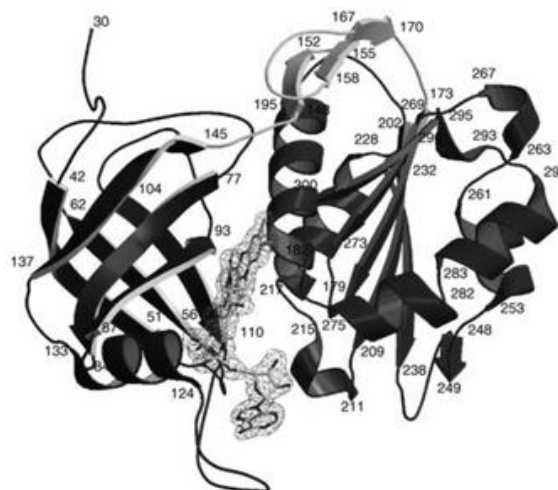


Abb. 1.4: Kristallstruktur der löslichen Form der NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase aus (Bando *et al.* 2004)

Defekte in der NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase verursachen zwei angeborene Formen der Methämoglobinämie. Typ I betrifft nur die erythrozytäre Form des Enzyms und verursacht eine milde Form der Zyanose (Scott und Griffith 1959). Typ II

wird auch als generalisierter Typ bezeichnet, ist durch einen generalisierten Ausfall des Enzyms in allen Geweben charakterisiert und verursacht eine körperliche und geistige Wachstumshemmung sowie neurologische Defekte (Leroux *et al.* 1975).

### 1.4.4. Assoziationsstudien zu SNPs

In genomweiten Assoziationsstudien wird das Vorkommen von SNPs in sehr großen Kohorten zwischen Gesunden und Kranken verglichen, um krankheitsrelevante Positionen zu identifizieren (Dingermann und Zündorf 2013). Es gibt genomweite Assoziationsstudien (GWAS), in denen u.a. intronische SNPs in *MARC1* und *MARC2* auffällig waren.

Eine genomweite Assoziationsstudie zur Methamphetaminabhängigkeit unter Japanern und Taiwanesen hat einen Zusammenhang mit 49 Genen hergestellt, darunter *MARC1* und *MARC2* (Uhl *et al.* 2008). Bei Japanern sind ein intronischer SNP in *MARC1* (rs12562744) und vier intronische SNPs in *MARC2* (rs10863562, rs337147, rs3820354, rs7556458) mit der Methamphetaminabhängigkeit assoziiert, bei Taiwanesen zwei intronische SNPs in *MARC1* (rs6687366 und rs953970), ein SNP im 5'near gene von *MARC1* (rs746767) und zwei intronische SNPs in *MARC2* (rs12030249 und rs3767324). Das mARC-haltige N-reduktive Dreikomponentensystem ist potentiell am Metabolismus des Methamphetamins beteiligt, und zwar an der Reduktion des Hydroxylaminmetaboliten (Clement *et al.* 2000).

In einer GWAS zur Untersuchung individueller Unterschiede in der Entwicklung von extrapyramidal-motorischen Störungen unter einer Therapie mit Antipsychotika konnte eine Assoziation mit drei SNPs hergestellt werden. Weitere 14 SNPs erreichten einen niedrigeren Signifikanzwert, darunter ist auch ein intronischer SNP in *MARC2* (rs1494373) (Aberg *et al.* 2010).

Ferner wurden in einer GWAS 95 Loci mit veränderten Blutfettwerten assoziiert (Teslovich *et al.* 2010). Einer dieser Loci ist ein intronischer SNP in *MARC1* (rs2642442). Es ist eine Assoziation zur Plasmakonzentration von Gesamtcholesterin und LDL hergestellt worden. Über die biologische und klinische Relevanz ist in dieser Studie nichts aufgeführt.

### 1.5. SULFAMETHOXAZOL UND XIMELAGATRAN

Im Bereich der Arzneimittel finden sich Strukturen, die durch das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem reduziert werden können - einerseits im Bereich der Metabolite und andererseits im Bereich der Prodrugs. Beispiele hierfür sind die Arzneistoffe Sulfamethoxazol und Ximelagatran. Gemeinsam ist diesen beiden Substanzen, dass sie schwere Nebenwirkungen verursachen können.

Nach Gabe von Sulfamethoxazol, das in Kombination mit Trimethoprim als Cotrimoxazol zugelassen ist, wird aus diesem Arzneistoff u. a. der Sulfamethoxazolhydroxylaminmetabolit gebildet (Cribb und Spielberg 1992). Diese Reaktion stellt eine Toxifizierung dar, da die Entstehung dieses Metaboliten der initiale Schritt einer Reaktionskaskade ist, die für das Auftreten von Hypersensitivitätsreaktionen verantwortlich sein könnte (Naisbitt *et al.* 1999). Der Hydroxylaminmetabolit kann potentiell durch eine Reduktion (Abb. 1.5), wie sie über das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem vermittelt wird, entgiftet werden.

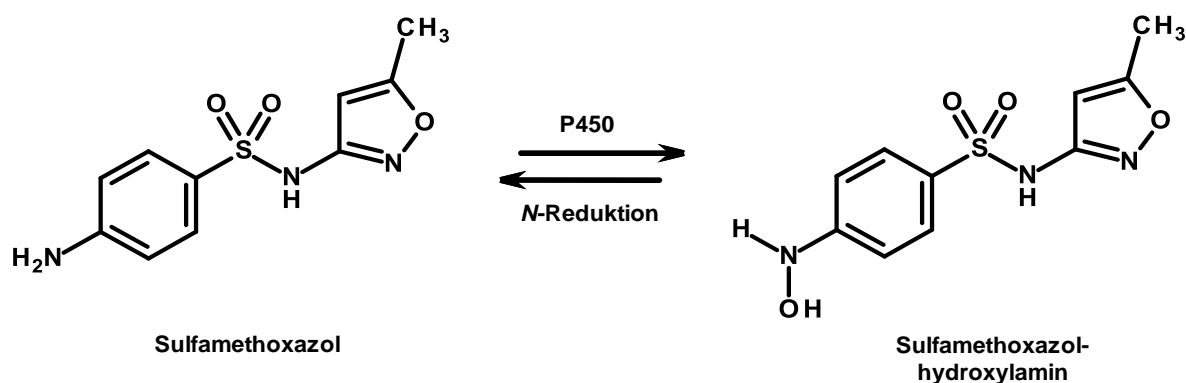


Abb. 1.5: Bildung des Sulfamethoxazolhydroxylaminmetaboliten und dessen Entgiftung

Der direkte Thrombininhibitor Ximelagatran (Exanta<sup>®</sup>) stellt ein doppeltes Prodrug dar, das u.a. durch eine über das *N*-reduktive Enzymsystem vermittelte Reduktion aktiviert wird (Abb. 1.6, Clement und Lopian 2003).

In der Langzeitbehandlung mit Ximelagatran wurden in einigen Fällen erhöhte Blutspiegel der Alanin-Aminotransferase (ALAT) gemessen. Für diese Nebenwirkung wurde eine immunologische Pathogenese postuliert und eine genetische Assoziation zum HLA-Allel *DRB1\*0701* hergestellt (Kindmark *et al.* 2008; Alfirevic *et al.* 2012).

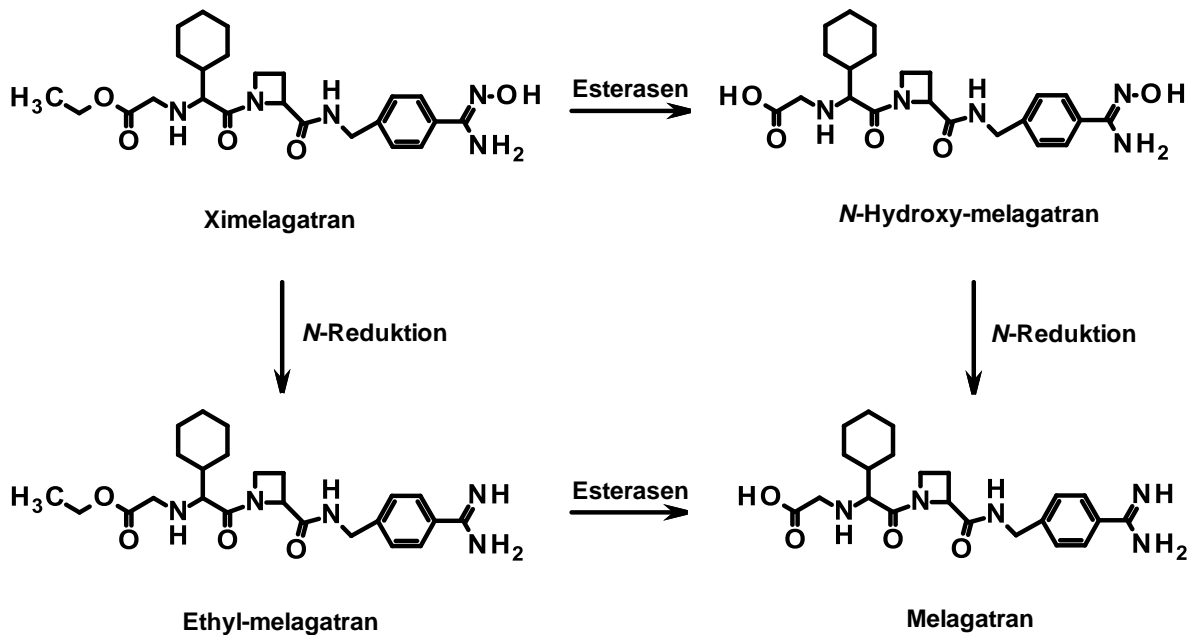


Abb. 1.6: Metabolische Aktivierung des Prodrugs Ximelagatran nach (Clement und Lopian 2003)

## 1.6. THEMA DER ARBEIT

Genetische Polymorphismen können beim Menschen eine interindividuelle Variabilität im Arzneistoffmetabolismus hervorrufen und dadurch die Wirksamkeit der Arzneimitteltherapie entscheidend beeinflussen. Ein fester Bestandteil des Arzneimittelmetabolismus ist die Aktivierung von Prodrugs. Amidoximprodrugs werden über das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem bestehend aus mARC, Cytochrom *b*<sub>5</sub> Typ B und NADH Cytochrom *b*<sub>5</sub> Reduktase in Gegenwart von NADH aktiviert (Clement 2002; Havemeyer *et al.* 2006).

Bislang liegen lediglich Untersuchungen zu vier auf genetischen Polymorphismen beruhenden Proteinvarianten der NADH-Cytochrom *b*<sub>5</sub> Reduktase vor: R59H (Sacco, Trepanier 2010), A158T und V300I (Rhoads *et al.* 2011) sowie R297H (Sacco *et al.* 2012). Diese Untersuchungen wurden jedoch im Zweikomponentensystem durchgeführt, bestehend aus Cytochrom *b*<sub>5</sub> Typ A und NADH-Cytochrom *b*<sub>5</sub> Reduktase. mARC-1, mARC-2 und Cytochrom *b*<sub>5</sub> Typ B sind diesbezüglich noch nicht charakterisiert.

Thema der Arbeit ist es, die funktionelle Relevanz von SNPs in den mARC-Genen, *MARC1* und *MARC2*, sowie im *CYB5B*-Gen auf die Prodrugaktivierung zu untersuchen. Dazu sollen Frequenzdaten zu den zum Aminosäureaustausch führenden SNPs in *MARC1* und *MARC2* an einer Kohorte 340 gesunder Kaukasier mittels Pyrosequencing ermittelt werden. Die zu untersuchenden Cytochrom *b*<sub>5</sub> Typ B-Varianten sollen anhand in Datenbanken veröffentlichter Frequenzdaten ausgewählt werden. Alle Proteinvarianten sind nach der Expression in *E. coli* sowohl auf ihren Cofaktorgehalt hin zu untersuchen als auch am Modellsubstrat Benzamidoxim funktionell zu charakterisieren.

Außerdem soll die pathophysiologische Relevanz der SNPs in *MARC1*, *MARC2* und *CYB5B* auf die Hypersensitivitätsreaktionen nach Sulfamethoxazolgabe untersucht werden. Bislang wurde die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin nur in Mikrosomen (Clement *et al.* 2005), im Zweikomponentensystem aus Cytochrom *b*<sub>5</sub> Typ A und NADH-Cytochrom *b*<sub>5</sub> Reduktase (Kurian *et al.* 2004) und am rekombinanten humanen mARC-1 (Grünwald Dissertation 2008) untersucht. Eine Anreicherung der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin in porcinen subzellulären mitochondrialen Fraktionen ist bisher noch nicht gezeigt worden. Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst durch Untersuchung der subzellulären Fraktionen der Schweineleber und –schilddrüse geklärt werden, in welcher Fraktion die Reduktion stattfindet. Dazu ist zu ermitteln, in welcher Fraktion die Aktivität angereichert ist, und ob die Reduktion NADH- oder NADPH-abhängig ist. Ist die Reduktion in den Mitochondrien lokalisiert, so ist im Folgenden der Einfluss der Proteinvarianten auf die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin zu Sulfamethoxazol zu untersuchen.

Das Vorliegen genetischer Polymorphismen kann zum Auftreten von Arzneimittelnebenwirkungen führen. Über Biomarkertests lässt sich die Verträglichkeit einer Therapie einschätzen (Dingermann und Zündorf 2013). In Kooperation mit der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH, Berlin, soll im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob es möglich ist, den von Kindmark postulierten Biomarkertest bezüglich der Ximelagatran-bedingten ALAT-Erhöhung (Kindmark *et al.* 2008) zu etablieren.

## 2. GENOTYPISIERUNG

### 2.1. EINLEITUNG

Das NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) stellt der Wissenschaft Datenbanken mit biomedizinischen und genomischen Informationen über seine Homepage zur Verfügung (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Eine dieser Datenbanken ist dbSNP, in der genetische Varianten u.a. für *MARC1* (NM\_022746.3) und für *MARC2* (NM\_017898.3) beschrieben sind. Gegenstand dieser Arbeit sind Untersuchungen zum Aminosäureaustausch führende SNPs (*nonsynonymous* SNPs, nichtsynonyme SNPs, nsSNPs) in den mARC-Genen.

Die offenen Leseraster (*open reading frame*, orf) der beiden mARC-Gene haben eine fast identische Größe von 1011 Basenpaaren bei *MARC1* und 1005 Basenpaaren bei *MARC2* (Wahl *et al.* 2010). Die zu Beginn der Arbeiten gültige Datenbankversion dbSNP *build* 133 beschrieb für *MARC1* sieben nichtsynonyme SNPs und für *MARC2* fünf, während die aktuell gültige Version (dbSNP *build* 137) mittlerweile 37 nichtsynonyme SNPs in *MARC1* und 19 in *MARC2* angibt.

Eine Genotypisierung von SNPs in *MARC1* und *MARC2* erfolgt am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie am UKSH, Campus Kiel, mittels Pyrosequencing. Anhand der in dbSNP *build* 133 veröffentlichten Frequenzdaten wurden vier SNPs in *MARC1* und zwei SNPs in *MARC2* für die Genotypisierung ausgewählt. Diese Auswahl umfasst auch nach dem derzeit aktuellen Stand der Datenbank (*build* 137) die beiden häufigsten SNPs in *MARC1* und den häufigsten SNP in *MARC2*.

Pyrosequencing ist eine Methode zur DNA-Sequenzierung, die von Pál Nyrén in Stockholm entwickelt wurde. Bereits 1987 stellte Nyrén die enzymatische Methode vor, über die man kontinuierlich DNA-Polymerase-Aktivität messen konnte (Nyrén 1987). 1998 wurde die entsprechende DNA-Sequenzieretechnologie präsentiert (Ronaghi *et al.* 1998). Sie beruht auf dem sogenannten „*sequencing by synthesis*“-Prinzip.

Pyrosequencing ist in Publikationen (Ahmadian *et al.* 2006) und Fachbüchern (Mülhardt 2009) detailliert beschrieben und wird dort wie folgt dargestellt:

Kurz zusammengefasst basiert die Technologie auf einer DNA-Synthese mit Hilfe von vier Enzymen. Die Reaktionskaskade endet nach Einbau des Nukleotids in einem detektierbaren Lichtsignal, das quantitativ mit der Anzahl an eingebauten Nukleotiden ins Verhältnis gesetzt werden kann. Die Synthese wird folglich in Echtzeit aufgenommen.

Im Detail werden die folgenden Reaktionschritte durchlaufen. Die zu sequenzierende DNA muss als Einzelstrang vorliegen, zu dem der komplementäre Strang enzymatisch synthetisiert werden kann. Dazu wird das PCR-Produkt mit Hilfe eines biotinylierten Primers gewonnen. Über das Biotin kann das PCR-Produkt an Streptavidin-gekoppelte Sepharose-Kügelchen gebunden und mit NaOH denaturiert werden. Dabei bleibt der biotin-markierte Strang an das Kügelchen gebunden, denn die Streptavidin-Biotin-Bindung gehört zu den stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen (Weber *et al.* 1989). Der komplementäre Strang des PCR-Produkts wird fortgewaschen. Man erhält ein einzelsträngiges *Template*, an das ein Sequenzierprimer hybridisiert wird.

Das Pyrosequencing erfolgt mit dem PSQ 96HS-System (Biotage, Uppsala, Schweden). Dazu wird das Gerät mit einem Enzymmix, bestehend aus den vier Enzymen (*exo*<sup>-</sup>)-Kleenow-DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase, einem Substratmix, bestehend aus Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Luciferin, sowie den vier Nukleotidtriphosphaten (dNTP) dATP-S, dCTP, dGTP und TTP, bestückt. Da die Luciferase auch aus dATP Licht produzieren kann, wird dieses Nukleotid in einer modifizierten Form als  $\alpha$ -thio-Triphosphat (dATP-S) eingesetzt. Die einzelsträngige DNA mit hybridisiertem Sequenzierprimer wird in einer 96well-Platte in das Gerät gestellt. Anschließend erfolgt eine Art schrittweiser DNA-Synthese.

Das erste dNTP wird zugegeben. Ist es komplementär zur nächsten Base des Templates, so katalysiert die DNA-Polymerase den Einbau. Es wird (*exo*<sup>-</sup>)-Kleenow-DNA-Polymerase eingesetzt. Diese besitzt keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, um unsynchronisierte DNA-Polymerisationen zu verhindern. Obwohl sie kein *proofreading* besitzt, kommt es nicht zum Einbau falscher dNTPs, weil diese deutlich langsamer eingebaut und somit vor Einbau von der Apyrase entfernt werden würden.



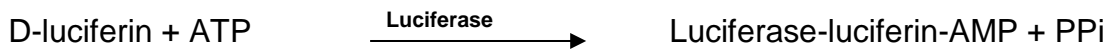
## 2 GENOTYPISIERUNG



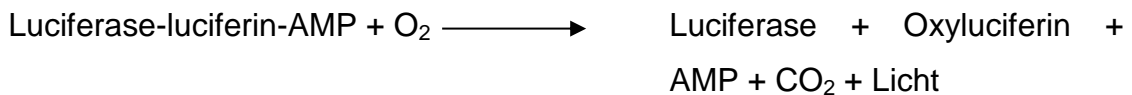
Bei jedem Einbau wird ein Molekül Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, aus dem die ATP-Sulfurylase zusammen mit APS ein Molekül ATP synthetisiert,



das in einer weiteren über Luciferase katalysierten Reaktion Luciferin in Oxiluciferin und Licht umwandelt. Dabei kommt es zunächst zu einer Konformationsänderung der Luciferase nach Komplexierung des D-Luciferins in Gegenwart von Magnesiumionen.

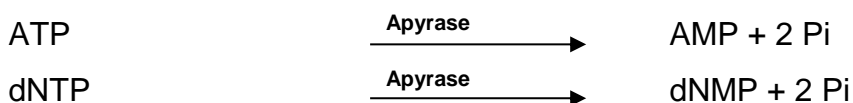


Darauf entsteht Licht durch oxydative Decarboxylierung des Luciferyladenylats.



So entsteht für jedes eingebaute dNTP ein Lichtsignal. Die Lichtproduktion wird während des gesamten Laufs über eine CCD-Kamera erfasst, quantifiziert, ausgewertet und in Form von Signalpeaks in einem sogenannten Pyrogram dargestellt. Aus dem Pyrogram lässt sich der Genotyp der Probe an der untersuchten Position ablesen. Folgen zwei oder drei gleiche Nukleotide im Template aufeinander, dann werden in einer Runde mehrere Nukleotide eingebaut und die Lichtproduktion fällt doppelt bzw. dreimal so hoch aus wie normal. Die Peakhöhe ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Wird kein Nukleotid eingebaut, so wird kein Licht produziert und das Signal bleibt aus.

Abschließend werden vor der Zugabe der nächsten Base über die Apyrase nicht eingebaute dNTPs und ATP entfernt.



Um überschüssige dNTPs zu entfernen und die Reaktion rasch zu beenden, werden parallel zur oben beschriebenen Reaktion die dNTPs von der ebenfalls zugegebenen

Apyrase zu dNMP und Phosphat abgebaut. Auf diese Weise ist innerhalb einer Minute das gesamte dNTP aufgebraucht und der Zyklus damit beendet. Weitere fünf Sekunden später kann bereits das nächste Nukleotid zugegeben und ein neuer Zyklus gestartet werden. Obwohl durch die Apyrase auch das frisch gebildete und für die Nachweisreaktion dringend benötigte ATP abgebaut wird, wird die Lichtproduktion dennoch nicht beeinflusst, weil der Abbau durch die Apyrase deutlich langsamer erfolgt als die eigentliche Nachweisreaktion.

### 2.2. ZIELSETZUNG

In der Datenbank dbSNP sind für die SNPs der mARC-Gene, *MARC1* und *MARC2*, zum Teil mit Frequenzdaten angegeben, wobei die Daten der zum Zeitpunkt der Recherche aktuellen Datenbankversion *build* 133 häufig nur an sehr kleinen Kohorten erhoben worden sind.

Am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie am UKSH, Campus Kiel, steht im Arbeitskreis von Prof. Cascorbi eine Kohorte 340 freiwilliger, gesunder Kaukasier für eine Genotypisierung zur Verfügung.

Ziel der Untersuchungen ist es, die Häufigkeiten ausgewählter nichtsynonymer SNPs in *MARC1* und *MARC2* an einer größeren Kohorte zu ermitteln.

### 2.3. METHODEN

#### 2.3.1. Datenbankrecherche und Auswahl der SNPs in *MARC1* und *MARC2*

Die Datenbankrecherche erfolgte mit der zu diesem Zeitpunkt gültigen Datenbankversion dbSNP *build* 133; die Auswahl der zu untersuchenden SNPs für die Genotypisierung nach den folgenden Kriterien: (i) Der SNP sollte zum Aminosäureaustausch führen. (ii) Die SNPs durften nicht im N-Terminus liegen, damit eine anschließende Untersuchung der N-trunkierten Proteinvarianten möglich war. (iii) Für Europäer sollten Frequenzdaten der homozygoten Variante angegeben sein. (iv) Für Europäer sollten Frequenzdaten der heterozygoten Variante angegeben sein. (v) Positionen, für die keine Frequenzdaten für Europäer angegeben waren, sollten untersucht werden. (vi) Positionen, die Frequenzdaten von 100% Wildtyp bei

Europäern zeigten, sollten nur dann untersucht werden, wenn sie zusammen mit einem anderen SNP in einem Versuch bestimmt werden konnten.

### 2.3.2. Probanden

Für die Bestimmung der Genotypenfrequenzen stand eine Kohorte von 340 freiwilligen, gesunden, kaukasischen Probanden am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie am UKSH, Campus Kiel, zur Verfügung. Die Kohorte bestand im Einzelnen aus 110 männlichen (26 - 67 Jahre, mittleres Alter 34,4 Jahre) und 230 weiblichen Probanden (26 - 67 Jahre, mittleres Alter 32,7 Jahre). Das mittlere Alter der Probanden insgesamt lag bei 33,3 Jahren. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie war zugelassen durch das Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

### 2.3.3. DNA-Isolierung

Die DNA wurde im Arbeitskreis von Prof. Cascorbi aus venösem Blut der Probanden mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die endgültige Konzentration wurde photometrisch eingestellt (Binder *et al.* 2011).

### 2.3.4. Genotypisierung

Vor Beginn der Genotypisierung musste der zu untersuchende DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert werden. Dazu wurden die Primersequenzen mit Hilfe der *Pyrosequencing assay design software version 1.0* (Biotage) festgelegt. Einer der PCR-Primer musste biotinyliert sein. Man erhielt PCR-Produkte, die ein oder zwei zu untersuchende SNPs enthielten.

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation
2 min	30 s	30 s	30 s	7 min
95°C	95°C	$T_m - 5^\circ\text{C}$	72°C	72°C
50 Zyklen				

Tab. 2.1: PCR-Protokoll ( $T_m$  = Schmelztemperatur)

SNP	rs-Nummer	Primername	Primersequenz	Fragmentlänge	T <sub>m</sub>
<b>MARC1</b>					
c.493A>G	rs2642438	PQ_MARC1_G509A_F PQ_MARC1_G509A_R	5'-Bio-AGTGCACGGCCTGGAGATAGAG 5'-TAGGGGCTGTGACTTCAGGAAGCT	84 bp	74,0°C 72,6°C
c.560T>A	rs17850677	PQ_MARC1_A576T_F PQ_MARC1_A576T_R	5'-Bio-GCCCCAGTGGATAACCAGCTTC 5'-TGGGTCGGAACAAGTCTGCTATT	109 bp	72,0°C 73,0°C
c.736T>A c.739G>C	rs3738178 rs72470601	PQ_MARC1_C755G_F PQ_MARC1_C755G_R	5'-Bio-CTCAACTCCAGGCTAGAGAAGAA 5'-GATCCAAAGGGGCATAGTGTTAC	107 bp	68,1°C 69,7°C
<b>MARC2</b>					
c.730G>A	rs3795535	PQ_MARC2_A928G_F PQ_MARC2_A928G_R	5'-AGATGCCTCCCTGGTAGATTTGAA 5'-Bio-CTTACCTCCTCAAAAAGCATCACAG	108 bp	73,1°C 70,3°C
c.730G>A c.735T>G	rs3795535 rs76664695	PQ_MARC2_T933G_F PQ_MARC2_T933G_R	5'-Bio-TGCCCTCCCTGGTAGATTTGAATA 5'-AAAAAGCAGTGGGTCGCTTACCTC	120 bp	70,8°C 73,7°C

Tab. 2.2: PCR-Primer (F = forward, Bio = Biotin, R = reverse, T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur, bp = Basenpaare)

Die Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnitts erfolgte nach einem Standardprotokoll über 50 Zyklen (Tab. 2.1), damit möglichst wenige Nebenprodukte entstanden und das PCR-Produkt direkt für das Pyrosequencing eingesetzt werden konnte. Es wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Primer verwendet.

Die einzelnen Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt (Tab. 2.3):

Komponente	Volumen (µl)
Wasser	16,6
10x Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25
dNTP (2,5 mM)	2,5
Primer F (10 µM)	0,5
Primer R (10 µM)	0,5
Taq-Polymerase	0,15
gDNA	1,0
Gesamt	25,0

Tab. 2.3: Zusammensetzung der PCR-Ansätze (*F* = forward, *R* = reverse)

Die Länge des PCR-Produkts jeder Platte wurde elektrophoretisch kontrolliert (Abb. 8.1, Kapitel 8). Hierzu wurden 7 µl PCR-Produkt mit 2 µl Blue Juice 10x versetzt und neben 9 µl GeneRuler® 100 bp DNA ladder (Fermentas) auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V über 30 min.

Das Pyrosequencing (PSQ) erfolgte nach dem PSQ Standard Protokoll (Haenisch *et al.* 2008). 10 µl PCR-Produkt wurden hierfür mit 30 µl *Ultra Pure Water*, 37 µl *Binding buffer* und 3 µl *Streptavidin-Sepharose High Performance beads* pro well für 10 Minuten inkubiert. Mit Hilfe der *Vacuum Prep workstation* wurden die Einzelstrang-PCR-Fragmente, die an den *Seapharose beads* hafteten, mit Ethanol (70% V/V), NaOH (0,1 mol / l) und *Washing buffer* behandelt und danach in eine zweite 96well-Platte überführt, die pro well 11 µl *Annealing buffer* und 1 µl Sequenzier-Primer (10 µmol / l) enthielt. Diese Platte wurde für 2 min bei 80°C inkubiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde das

Pyrosequencing mit dem PSQ 96HS-System durchgeführt. Jede 96well-Platte enthielt mindestens eine Kontrolle ohne DNA als Negativkontrolle.

Die Sequenzierprimer wurden ebenfalls mit Hilfe der *Pyrosequencing assay design software version 1.0* (Biotage) designt und hatten die in Tabelle 2.4 aufgeführten Sequenzen:

SNP	rs-Nummer	Primernamen	Primersequenz	T <sub>m</sub>
<b>MARC1</b>				
c.493A>G	rs2642438	PQ_MARC1_G509A_S	5'-CTGGTTATCCACTGG	51,7°C
c.560T>A	rs17850677	PQ_MARC1_A576T_S	5'-GGACGTCTCGGTCCG	59,2°C
c.736T>A c.739G>C	rs3738178 rs72470601	PQ_MARC1_C755G_S	5'-TGTTACCTCTGCATAGACA	51,7°C
<b>MARC2</b>				
c.730G>A	rs3795535	PQ_MARC2_A928G_S	5'-GCCAAATATTGTGGTGAC	53,9°C
c.730G>A c.735T>G	rs3795535 rs76664695	PQ_MARC2_T933G_S	5'-TACCTCCTCAAAGCAT	50,4°C

Tab. 2.4: Sequenzierprimer (*T<sub>m</sub>* = Schmelztemperatur)

## 2.4. ERGEBNISSE

### 2.4.1. Datenbankrecherche und Auswahl der SNPs

Die Datenbankanalyse mit dbSNP *build* 133 ergab für die zum Aminosäureaustausch führenden SNPs die in Tabelle 2.5 aufgeführten Frequenzdaten bei Europäern.

rs-Nummer	SNP	AS-Austausch	Genotypenfrequenz	Allelfrequenz	Probanden
<b>MARC1</b>					
rs72470572	c.44T>A	L15H	T/T 0,952 T/A 0,048	T = 0,976 A = 0,024	n = 48
rs12023067	c.286G>C	V96L	G/G 1,000	G = 1,000	n = 116

## 2 GENOTYPIERUNG

rs2642438	c.493A>G	T165A	A/A 0,100 A/G 0,367 G/G 0,533	A = 0,283 G = 0,717	n = 120
rs17850677	c.560T>A	M187K	keine Frequenzdaten		
rs3738178	c.736T>A	C246S	T/T 1,000	T = 1,000	n = 120
rs72470601	c.739G>C	D247H	G/G 0,952 G/C 0,048	G = 0,976 C = 0,024	n = 42
rs2642419	c.804G>A	M268I	C/C 1,000	C = 1,000	n = 120
<b>MARC2</b>					
rs72472370	c.7G>T	A3S	G/G 1,000	G = 1,000	n = 44
rs12039771	c.91G>A	A31T	keine Frequenzdaten		
rs12566701	c.138G>T	R46S	keine Frequenzdaten		
rs3795535	c.730G>A	G244S	C/C 0,991 C/T 0,009	C = 0,996 T = 0,004	n = 224
rs76664695	c.735T>G	C245W		T = 0,861 G = 0,139	n = 36

Tab. 2.5: Ergebnis der Datenbankanalyse der SNPs in *MARC1* und *MARC2* mit NCBI dbSNP build 133 (AS-Austausch = Aminosäure-Austausch)

Nach den oben formulierten Auswahlkriterien wurden für die Genotypisierung die SNPs c.493A>G, c.560T>A, c.736T>A und c.739G>C in *MARC1* sowie die SNPs c.730G>A und c.735T>G in *MARC2* ausgewählt.

### 2.4.2. Genotypisierung

Für die untersuchten SNPs wurden die in Tabelle 2.6. aufgeführten Frequenzdaten ermittelt.

Für *MARC1* ergaben sich die folgenden Ergebnisse: Am häufigsten wurde der SNP rs2642438 in der Kohorte detektiert. Die Verteilung der Frequenzen lag im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, d.h. die Genotypenhäufigkeiten an dem biallelischen Locus befanden sich in dem in sehr großen Populationen zu beobachtenden Gleichgewicht. Es gab keine Abweichungen, die durch Datenfehler entstanden sein könnten (Bickeböller und Fischer 2007). Dabei traten allerdings die Genotypen der hetero-

## 2 GENOTYPISIERUNG

und homozygoten Variante am häufigsten auf. Der in der Datenbank als Wildtyp bezeichnete Genotyp zeigte nur eine Frequenz von 7,1%. Die heterozygoten Varianten der SNPs rs1785067 und rs3738178 wurden in 2,7% bzw. 0,3% der Proben nachgewiesen. Rs72470601 konnte in der untersuchten Kohorte nicht detektiert werden.

SNP rs-Nummer (AS-Austausch)	Allel	Frequenz (Proben; %)	Genotyp	Frequenz (Proben; %)
<b>MARC1</b>				
c.493A>G rs2642438 (T165A)	A	188 (30,4)	A/A	22 (7,1)
	G	286 (69,6)	A/G	144 (46,6)
			G/G	143 (46,2)
c.560T>A rs17850677 (M187K)	T	576 (98,6)	T/T	284 (97,3)
	A	8 (1,4)	T/A	8 (2,7)
			A/A	0 (0,0)
c.736T>A rs3738178 (C246S)	T	607 (99,8)	T/T	303 (99,7)
	A	1 (0,2)	T/A	1 (0,3)
			A/A	0 (0,0)
c.739G>C rs72470601 (D247H)	G	612 (100,0)	G/G	306 (100,0)
	C	0 (0,0)	G/C	0 (0,0)
			C/C	0 (0,0)
<b>MARC2</b>				
c.730G>A rs3795535 (G244S)	G	629 (99,5)	G/G	313 (99,1)
	A	3 (0,5)	G/A	3 (0,9)
			A/A	0 (0,0)
c.735T>G rs76664695 (C245W)	T	640 (100,0)	T/T	320 (100,0)
	G	0 (0,0)	T/G	0 (0,0)
			G/G	0 (0,0)

Tab. 2.6: Ergebnis der Genotypisierung von sechs SNPs in *MARC1* und *MARC2*, angegeben sind die Allel- und Genotypenfrequenzen der untersuchten SNPs (AS-Austausch = Aminosäure-Austausch)



Für *MARC2* ergaben sich die folgenden Ergebnisse: Die heterozygote Variante des SNPs rs3795535 wurde in 0,9% der Proben nachgewiesen. Rs76664695 konnte in der Kohorte nicht detektiert werden.

Bei Trägern des homozygoten 493AA-Genotyps wurden keine weiteren heterozygoten Varianten gefunden. Zwei Probanden der Kohorte trugen zwei heterozygote Varianten: der eine war heterozygot für c.493A>G und c.560T>A, der andere für c.493A>G und c.730G>A.

### 2.5. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Die untersuchten sechs SNPs in den mARC-Genen (c.493A>G, c.560T>A, c.736T>A und c.739G>C in *MARC1* sowie c.730G>A und c.735T>G in *MARC2*) zeigten eine geringe Frequenzhäufigkeit in der genotypisierten Kohorte aus 340 gesunden Kaukasiern.

Es konnte eine häufige Variante in *MARC1* detektiert werden (rs2642438, c.493A>G). Hierbei zeigte der in der Datenbank als Wildtyp definierte Genotyp (493AA) nur eine Frequenz von 7,1% und die homozygote Variante (493GG) eine Frequenz von 46,2%. Dieses Phänomen tritt häufiger auf und kommt dadurch zustande, dass der Wildtyp durch den ersten Datenbankeintrag definiert und nachfolgend nicht korrigiert wird.

Während dbSNP *build* 133 noch keine Frequenzdaten für rs17850677 (c.560T>A) in *MARC1* für Kaukasier veröffentlicht hatte, konnte mittels Genotypisierung der 560TT-Genotyp als Wildtyp nachgewiesen werden. Dies ist für die Expression des rekombinanten mARC-1-Proteins von Bedeutung. Bislang wurde bei der mARC-1-Expression nur darauf hingewiesen, welche Aminosäure man in Position 187 des mARC-1-Proteins als Wildtyp annahm. Ebenso wurde wegen der hohen Frequenz für die homozygote Variante mit Position 165 verfahren (Gruenewald *et al.* 2008; Wahl *et al.* 2010). Nun steht fest, dass das mARC-1-Wildtypprotein bei Kaukasiern in Position 165 ein Alanin und in Position 187 ein Methionin trägt und dass das mARC-1-Wildtypprotein korrekt exprimiert wird.

Für den SNP rs76664695 (c.735T>G) wurde in dbSNP *build* 133 eine Allelfrequenz von T = 86,1% und G = 13,9% angegeben. Bei der Genotypisierung konnte allerdings keine homozygote Variante detektiert werden. Ab der folgenden

Datenbankversion, dbSNP *build* 134, waren keine Allelfrequenzen mehr aufgeführt. Offensichtlich handelte es sich bei den Frequenzdaten in dbSNP *build* 133 um einen Datenbankfehler.

Mittlerweile sind die Daten aus großangelegten Sequenzierprojekten in die SNP-Datenbank eingepflegt worden, z.B. aus dem *NHLBI Grand Opportunity Exome Sequencing Project* (ESP; <https://esp.gs.washington.edu/drupal/>), so dass die derzeit aktuelle Version von dbSNP *build* 137, veröffentlicht im Juni 2012, für *MARC1* insgesamt 37 zum Aminosäureaustausch führende SNPs enthält, bei 13 von ihnen tritt das variante Allel in Europäern auf. Für *MARC2* sind 19 zum Aminosäureaustausch führende SNPs angegeben; wobei nur für 4 SNPs das variante Allel in Europäern detektiert werden konnte. Trotz einer beträchtlichen Erhöhung der Datenmenge in der Datenbank bleiben nach wie vor c.493A>G und c.560T>A die beiden SNPs mit den höchsten Frequenzhäufigkeiten des varianten Allels in *MARC1*, und c.730G>A der SNP mit der höchsten Frequenzhäufigkeit des varianten Allels in *MARC2*. Hinzugekommen sind vor allem SNPs mit geringer Frequenzhäufigkeit für das variante Allel.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass für einen SNP in *MARC1*, der zur Proteinvariante A165T führt, Träger der homozygoten Variante in der untersuchten Kohorte nachgewiesen werden konnten. Die Frequenz dieses Genotyps lag bei 7,1%. Darüber hinaus ist die Sequenz des mARC-1-Wildtypproteins geklärt worden, so dass es korrekt exprimiert werden kann.

## 3. CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN UND NATIVEN ENZYMQUELLEN

### 3.1. EINLEITUNG

Die Reinigung und Identifizierung des porcinen mARC-2-Proteins aus der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien ermöglichte die Aufklärung der Zusammensetzung des *N*-reduktiven Dreikomponentensystems. *In vitro*-Untersuchungen bestätigten die Beteiligung dieses Enzymsystems an der Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs (Havemeyer *et al.* 2006). Um Aussagen über die Aktivierung der Amidoxim-Prodrugs im Menschen machen zu können, wird das humane Enzymsystem für weitere *in vitro*-Untersuchungen benötigt.

Die drei humanen Proteinkomponenten können rekombinant hergestellt werden (Wahl *et al.* 2010). Da die *full-length*-Proteine mARC-1 (*MARC1*; NM\_022746.3) und mARC-2 (*MARC2*; NM\_017898.3) schlecht löslich waren, wurden sie um die *N*-terminalen mitochondrialen Targeting-Sequenzen trunkiert, d.h. *MARC1* wurde um 51 Aminosäuren trunkiert und *MARC2* um 50 Aminosäuren. Nach Einfügen eines ATG-Startcodons ergaben sich offene Leseraster von 861 Basenpaaren für *MARC1* und von 858 Basenpaaren für *MARC2* (Wahl *et al.* 2010). Die mARC-Proteine für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit werden im *E. coli*-Expressionstamm TP1000 exprimiert, in dem die *mobA*- und *mobB*-Gene deletiert sind, so dass Molybdopterin (MPT) nicht, wie in Prokaryoten üblich, weiter zum Molybdopteringuanin-dinukleotid (MGD) modifiziert werden kann (Palmer *et al.* 1996). Würde man die mARC-Proteine dagegen in den *E. coli*-Expressionstämmen RK5206 oder RK5204 ohne Zusatz von Natriummolybdat exprimieren, so enthält das mARC-Protein weder den Molybdäncofaktor noch zeigt es zusammen mit Cytochrom  $b_5$  Typ B und NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase *N*-reduktive Aktivität (Wahl *et al.* 2010). Das humane *full-length* Cytochrom  $b_5$  Typ B-Protein (*CYB5B*; NM\_030579) besitzt am C-Terminus eine Membrandomäne, um die es ebenfalls zur Verbesserung der

Reinheit und der Löslichkeit trunziert wurde. Daraus resultierten ein offenes Leseraster von 375 statt 453 Basenpaaren und ein um 26 Aminosäuren verkürztes Protein.

Von der humanen NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase 3 existieren zwei Isoformen, wobei Isoform 2 eine natürlich vorkommende Splicevariante der Isoform 1 darstellt. Die Isoform 2 (CYB5R3; NM\_007326) ist am N-Terminus verkürzt und lässt sich besser exprimieren und aufreinigen (Wahl *et al.* 2010).

Sowohl Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B als auch die NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase 3 werden in *E. coli* DL41 exprimiert, einem Expressionsstamm, der ebenso wie Säugetierzellen für Methionin auxotroph ist (Hendrickson *et al.* 1990).

Neben den Wildtypproteinen können auch Proteinvarianten nach vorheriger PCR-Mutagenese exprimiert werden (Wahl *et al.* 2010).

### 3.2. ZIELSETZUNG

Es ist möglich, alle drei Komponenten des humanen N-reduktiven Enzymsystems sowie Varianten rekombinant zu exprimieren. Jede Komponente besitzt einen Cofaktor, der ihr Aktivität verleiht. mARC besitzt einen Molybdäncofaktor als prosthetische Gruppe, an Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B ist ein Molekül Häm gebunden und an die NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase 3 ein Molekül FAD. Die Stöchiometrie der drei Komponenten des rekombinanten N-reduktiven Enzymsystems im Inkubationsansatz ist über den Cofaktor-Gehalt der einzelnen Proteine optimiert worden (Pitzko Diplomarbeit 2010). Um nachfolgend reproduzierbare und vergleichbare Daten aus den Inkubationen zu erhalten, ist es das Ziel, jede Proteincharge hinsichtlich ihres Cofaktor-Gehalts zu charakterisieren.

Während für die Bestimmung des Häm- und FAD-Gehalts einfache Protokolle im Arbeitskreis etabliert sind, gestaltet sich die Bestimmung des Gehalts an Molybdäncofaktor (Moco) im mARC-Protein schwieriger. Die Bestimmung kann über zwei Verfahren erfolgen. Zum einen kann der Moco über den sogenannten FormA-dephospho-Gehalt bestimmt werden. Nachteil dieser Methode ist, dass auch die inaktive Vorstufe MPT miterfasst wird. Zum anderen kann der Molybdängehalt mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) bestimmt werden. Diese Methode erfasst nur das

Molybdän im Moco, besitzt allerdings ein sehr aufwändiges Protokoll zur Probenvorbereitung. Ziel dieser Arbeit ist es, zu überprüfen, ob das Protokoll der Probenvorbereitung für die ICP-MS-Messung vereinfacht werden kann und ob es möglich ist, eine Korrelation zu den FormA-dephospho-Gehalten herzustellen.

Native Enzymquellen sollten möglichst rein sein. Westernblot-Protokolle zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen subzellulären Fraktionen und der Anwesenheit der Komponenten des *N*-reduktiven Enzymsystems sind im Arbeitskreis etabliert.

### 3.3. METHODEN

#### 3.3.1. Rekombinant hergestellte humane Proteine

Die Herstellung der rekombinanten Proteine erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Mendel am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig.

Den Mutationen der mARC-Einfachvarianten lagen alle in dbSNP *build* 133 veröffentlichten SNPs zugrunde, die sich im Leseraster der *N*-trunkierten mARC-Proteine befanden, den Mutationen der Cytochrom *b*<sub>5</sub>Typ B-Varianten alle in dbSNP *build* 132 zu *CYB5B* (NM\_030579.2) veröffentlichten SNPs (Tab. 3.1).

rsNummer	SNP	AS-Austausch	Allelfrequenz	Probanden	Population
rs117949766	c.5C>T	S2F	C = 0,967 T = 0,033	n = 60	Chinesen, Japaner
rs79522540	c.41A>G	D14G	A = 0,818 G = 0,182	n = 44	Chinesen, Japaner
rs79729055	c.46A>G	K16E	A = 0,944 G = 0,056	n = 36	Europäer
rs77374917	c.64A>G	T22A	Keine Frequenzdaten		

Tab. 3.1: Ergebnis der Datenbankanalyse der SNPs in *CYB5B* mit NCBI dbSNP *build* 132 (AS-Austausch = Aminosäure-Austausch)

Bei den mARC-Mehrfachvarianten wurden die einzelnen Mutationen nacheinander in die DNA eingebracht, die Proteinvarianten wurden jeweils exprimiert und man erhielt sechs mARC-1-Varianten und zwei mARC-2-Varianten.

Die Festlegung der Reihenfolge des Einbringens der Mutationen erfolgte nach abnehmender Wahrscheinlichkeit für Träger der homozygoten Variante. Für die Ermittlung der Wahrscheinlichkeiten waren die Ergebnisse aus der Genotypisierung von höchster Priorität (Kap. 2.4), dann folgten die Ergebnisse der Datenbankrecherche (dbSNP) zu Genotypenfrequenzen für homozygote und heterozygote Träger zunächst für Europäer und dann für die anderen Populationen.

Für mARC-1 ergab sich die Reihenfolge A165T > M187K > V96L > C246S > D247H > M268I, für mARC-2 die Reihenfolge G244S > C245W.

Es wurden also die folgenden Proteinvarianten rekombinant hergestellt: (i) die mARC-1-Varianten V96L, A165T, M187K, C246S, D247H und M268I, (ii) die mARC-2-Varianten G244S und C245W, (iii) die mARC-1 Mehrfachvarianten, bei denen sukzessive die Varianten A165T, M187K, V96L, C246S, D247H und M268I eingeführt wurden, (iv) die mARC-2-Mehrfachvarianten, bei denen nacheinander die Varianten G244S und C245W eingeführt wurden, und (v) die Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Varianten S2F, D14G, K16E und T22A.

#### **3.3.1.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung der Proteine**

Die Expressionsvektoren waren, wie bei Wahl *et al.*, 2010 beschrieben, konstruiert. Die mARC- und Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Varianten wurden durch PCR-Mutagenese mit Primern, die die gewünschte Mutation tragen, hergestellt (Reichmann Diplomarbeit 2009).

Die Richtigkeit der c.DNA-Sequenzen nach PCR-Mutagenese wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft (GATC, Konstanz, Germany).

Expimierung und Aufreinigung der rekombinanten mARC-, Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B- und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase-Proteine erfolgte nach dem Protokoll von Wahl *et al.*, 2010.

#### **3.3.1.2. Bestimmung des Proteingehalts**

Der Proteingehalt jeder Charge wurde jeweils an zwei verschiedenen Tagen über die BCA-Methode bestimmt (Smith *et al.* 1985). Diese Methode beruht auf der photometrischen Quantifizierung des Cu<sup>+</sup>-Bicinchoninsäure-Komplexes. Um in den

Puffern enthaltende störende Begleitsubstanzen zu entfernen, wurden die Proteine vor der eigentlichen Analyse mit dem Compat-Able™ ProteinAssay Preparation Reagent Set (Thermo Scientific) gefällt, in dem BCA-Working-Reagent des Pierce® BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) gelöst und abschließend bei 562 nm im Cary 50 (Varian) vermessen.

#### **3.3.1.3. Bestimmung des Molybdängehalts in den mARC-Proteinen**

mARC ist ein Molybdoenzym und hat in seiner aktiven Form ein Mol Molybdän pro Mol Protein gebunden (Hille *et al.* 2011). Der Molybdängehalt wurde mit Hilfe der ICP-MS, einem sehr leistungsfähigen Analyseverfahren zum Nachweis von Spurenelementen, bestimmt. Dazu wurden die in einer Probe vorkommenden Elemente im Argon-Plasma (ICP) bei einer Temperatur von ca. 6000 K ionisiert. Die entstandenen Ionen wurden durch ein Interface aus dem Plasma in das Hochvakuum des Massenspektrometers überführt und durch eine Ionenoptik fokussiert. Durch den nachfolgenden Massenfilter (Quadrupol) gelangten nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) auf einer stabilen Flugbahn bis zum Detektor, der jedes Ion in einen elektrischen Impuls bzw. Strom umwandelte, der dann wiederum registriert und im PC weiterverarbeitet werden konnte. Die Anzahl der Impulse pro Sekunde (*counts per second*, cps) war proportional zur Konzentration der Probe.

Die ICP-MS-Messungen wurden am Institut für Geowissenschaften der CAU Kiel unter der Leitung von Dr. Garbe-Schönberg und Dipl.-Ing. Ulrike Westernströer durchgeführt.

Die Bestimmung des Molybdängehalts der rekombinanten mARC-Proteine erfolgte bislang nach zeitaufwändiger Umpufferung, um eventuell vorhandene Spuren an Natriummolybdat aus dem Proteinpuffer zu entfernen. Es sollte überprüft werden, ob eine Vereinfachung des Protokolls möglich war. Deswegen wurde zunächst der Molybdängehalt einiger Proteine vor und nach Umpuffern bestimmt.

Sollte das mARC-Protein ohne vorheriges Umpuffern vermessen werden, so war das Ausgangsprotein auf einen Proteingehalt zwischen 0,3 und 0,7 mg / ml zu verdünnen. Dazu wurde Lagerpuffer pH 7,4, bestehend aus 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mM DTT und 20% Glycerol in Aqua bidest. verwendet.

Sollte das mARC-Protein nach Umpuffern vermessen werden, so wurde es auf eine PD MiniTrap G-25-Säule (GE Healthcare) gegeben und mit Lagerpuffer pH 7,4

eluiert. Es wurden 10 Fraktionen aufgefangen, von denen die Absorption bei 280 nm am Cary 50 bestimmt wurde. Es wurde ein Elutionsprofil erstellt. Die Fraktionen mit der höchsten Absorption wurden gepoolt und der Proteingehalt mittels BCA-Methode (Kapitel 3.3.1.2.) bestimmt. Der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wurde anschließend wieder auf einen Gehalt zwischen 0,3 und 0,7 mg / ml eingestellt.

Um aus den Proben das Molybdän freizusetzen, wurden jeweils 200,0 µl der proteinhaltigen Lösungen in einem 2 ml Reaktionsgefäß 10 min bei 100°C erhitzt. Anschließend wurde zu den 200,0 µl der abgekochten Lösung 10,0 µl eines internen Standards (Indium, In<sup>115</sup>, 2,5 ppb) und 1790,0 µl 2%ige (V/V) oberflächendestillierte Salpetersäure gegeben. Das gefällte Protein wurde über einen 30 kDa Molekularfilter (Amicon Ultra 0.5 Ultracel-PI membrane, Millipore) abzentrifugiert. Das Zentrifugat wurde für die Messungen am Agilent 7500cs ICP-MS verwendet. Um den Probenverbrauch zu vermindern, wurde ein Mikrozerstäuber mit einer nominellen Probenaufnahme von 200 µl / min verwendet und die Proben wurden manuell zugeführt. Für die Analyse auf Molybdän wurden die Signale (in *counts per second*) auf den Massen 92, 94, 95, 96 und 98 m / z ausgewertet. Für die Quantifizierung wurde das Signal 98 m / z verwendet, das frei von Interferenzen war. Kalibrierlösungen (5 und 50 ppb) wurden aus einer Molybdän-Stammlösung (Alpha Aesar) verdünnt. Die Ergebnisse sind die um die Blindwerte korrigierten Mittelwerte aus zwei Verdünnungen, die jeweils dreifach vermessen wurden. Blindwerte wurden über die Vermessung von filtrierter 2% HNO<sub>3</sub> für die Kalibrierung bzw. über die Vermessung des abgekochten und filtrierten Lagerpuffers für die Proben ermittelt. Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde ca. alle 10 Messungen überprüft. Die relative Standardabweichung war besser als 1%. Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden internationale Standardreferenzminerale (BIR-1 und BHVO-2) vermessen. Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens lag bei 0,5 ng / l Mo, bezogen auf die zentrifugierte Proteinlösung (Kotthaus *et al.* 2011).

Als Kontrollen dienten der Lagerpuffer, eine Charge einer NADH Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase, die in einem molybdänhaltigen Medium exprimiert und dann aufgereinigt worden war, eine mARC-Charge aus RK 5204 und eine mARC-Charge aus der zuletzt durchgeführten ICP-MS-Messung sowie einer neue Verdünnung der zuletzt genannten mARC-Charge.



#### **3.3.1.4. Bestimmung des FormA-dephospho-Gehalts der mARC-Proteine**

In dem aufgereinigten mARC-Protein befinden sich der Molybdäncofaktor (Moco) und seine inaktive, molybdänfreie Vorstufe Molybdopterin (MPT). Beide sind extrem empfindlich gegenüber Oxidationen und dadurch chemisch instabil. Der Nachweis dieser beiden Substanzen kann über das chemisch stabile Oxidationsprodukt FormA-dephospho erfolgen (Johnson *et al.* 1984; Wahl Dissertation 2010).

Das aufgereinigte Protein eines Expressionsansatzes wurde durch eine saure Oxidationslösung (1% I<sub>2</sub> / 2% KI in 1 M HCl) zum FormA oxidiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes befand sich FormA im Überstand. Dieser wurde abgetrennt und mit Alkalischer Phosphatase inkubiert, wodurch FormA zum stabilen FormA-dephospho dephosphoryliert wurde. FormA-dephospho wurde nach Aufreinigung über isokratische Anionenaustauscherchromatographie mittels HPLC quantifiziert. Die Auswertung erfolgte über einen Standard, der sich auf das Moco Carrier Protein (MCP) aus *Chlamydomonas reinhardtii* bezieht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. (Wahl Dissertation 2010; Wahl *et al.* 2010; Reichmann Diplomarbeit 2009 und Dissertation in Vorbereitung).

Die Bestimmung der FormA-dephospho-Gehalte erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Mendel am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig.

#### **3.3.1.5. Bestimmung des Hämgehalts im Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B**

Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B ist ein Hämprotein, das pro Mol Protein ein Mol Häm als Cofactor enthält (Durley und Mathews 1996). Der Hämgehalt im Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B wurde nach der Methode von Estabrook und Werringloer über die Aufnahme des Differenzspektrums von reduzierter und oxidiert Form des Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B bestimmt. Während Estabrook und Werringloer die Bestimmung an Mikrosomen durchführten, sollte hier der Hämgehalt des rekombinanten humanen Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B bestimmt werden. Dazu wurden 200 µl rekombinantes humanes Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B (0,5 bis 0,8 mg / ml in 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5) mit 1 µl rekombinanter humaner NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase (ca. 0,02 mg / ml in 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5) versetzt. Zum Ansatz wurde 1 µl NADH (15 mM) hinzugegeben und nach 60 Sekunden das Absorptionsmaximum bei ca. 426 nm und das Absorptionsminimum bei ca. 409 nm durch Scannen der Absorption im Wellenlängenbereich von 400 bis 500 nm bestimmt. Es wurde solange NADH 1 µl-weise zugegeben, bis die Absorptionsdifferenz ein Maximum erreichte. Über den

molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) wurde der Hämgehalt berechnet (Estabrook und Werringloer 1978). Das Ergebnis ist der Mittelwert aus zwei Bestimmungen an zwei verschiedenen Tagen.

#### **3.3.1.6. Bestimmung des FAD-Gehalts der NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase**

NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase ist ein Flavoprotein, das pro Mol Protein ein Mol FAD als Cofactor enthält (Bando *et al.* 2004). FAD wurde photometrisch in Anlehnung an die Methode von Whitby bestimmt (Whitby 1953). Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde eine Stammlösung mit 1 mM FAD in 50 mM PBS pH 7,0 hergestellt und über einen Bereich von 0,01 bis 1  $\mu\text{mol} / \text{ml}$  verdünnt. Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von etwa 1,5 mg / ml eingestellt. Zum einen wurden 250  $\mu\text{l}$  der Kalibrierlösungen und Probenverdünnungen 10 min bei 100°C im Dunkeln erhitzt, erkalten gelassen, 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, jeweils 200  $\mu\text{l}$  Überstand in eine 96 well Platte pipettiert und die Absorption bei 450 nm gemessen, zum anderen wurden die Lösungen ohne Abkochen direkt vermessen. Die Auswertung erfolgte über die Kalibriergerade mit FAD. Die Richtigkeit betrug  $99,1 \pm 3,1\%$ ; die Richtigkeit an der Bestimmungsgrenze 93,9%. Das Ergebnis ist der Mittelwert aus zwei Bestimmungen an zwei verschiedenen Tagen.

#### **3.3.1.7. Kontrolle der Reinheit der rekombinanten Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Probenaufbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, d.h. die mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzte Probe wurde erhitzt, wodurch sowohl Wasserstoff-brückenbindungen als auch Disulfidbrücken gespalten wurden (Berg *et al.* 2013).

Die Probe wurde mit Aqua bidest. auf den angestrebten Proteingehalt eingestellt. Vier Teile dieser Lösung wurden mit einem Teil Probenauftragspuffer (5-fach; 3,5% (m/V) SDS, 50% (m/V) Glycerol, 15% (m/V)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,02% (m/V) Bromphenolblau) versetzt und zehn Minuten im siedenden Wasserbad abgekocht. Danach wurden die Proben fünf Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder oder Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker) auf das Gel aufgetragen. Es wurde die von Laemmli beschriebene diskontinuierliche Methode der SDS-PAGE durchgeführt (Laemmli 1970), bei der die SDS-Protein-Komplexe zuerst in ein

6%iges Sammelgel (2,4 ml Aqua bidest., 1 ml Sammelgelpuffer bestehend aus 0,25 M Tris-Base pH 6,8 und 0,4% (m/V) SDS, 0,6 ml 30% (m/V) Acrylamidlösung, 6 µl TEMED 30 und 25 µl 10% (m/V) APS-Lösung) wandern und sich aufkonzentrieren, darauf erfolgte die Auftrennung im 12,5%igen Trenngel (4 ml Aqua bidest., 3 ml Trenngelpuffer bestehend aus 0,75 M Tris-Base pH 8,8 und 0,4% (m/V) SDS, 2,6 ml 30% (m/V) Acrylamidlösung, 10 µl TEMED 30 und 80 µl 10% (m/V) APS-Lösung).

Die elektrophoretische Aufkonzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte über 20 Minuten bei 80 V, die anschließende Trennung im Trenngel über eine Stunde bei 200 V.

Die Proteine im Gel wurden mit Roti<sup>®</sup>-Blue (Roth) nach der Vorschrift des Herstellers angefärbt und mit Hilfe eines Gel-trocknungsrahmens (Roth) getrocknet.

#### **3.3.2. Native porcine Enzymquellen**

##### **3.3.2.1. Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus porcinen Organen**

Die Gewinnung der subzellulären Fraktionen erfolgte durch verschiedene Kollegen nach dem im Arbeitskreis etablierten Standardprotokoll (Hovius *et al.* 1990; Krompholz *et al.* 2012). Die einzelnen subzellulären Fraktionen der Schweineleber und -schilddrüse standen für die folgenden Untersuchungen zur Verfügung.

##### **3.3.2.2. Charakterisierung der gewonnenen Zellfraktionen**

Die einzelnen subzellulären Fraktionen der Schweineschilddrüse waren zu charakterisieren. Eine solche Charakterisierung umfasste die Bestimmung des Proteingehalts und die Überprüfung der Reinheit der Fraktionen im Westernblot.

###### **3.3.2.2.1. Bestimmung des Proteingehalts**

Die Proteingehalte der subzellulären Schweineleberfraktionen lagen bereits vor; die der Schweineschilddrüsenfraktionen wurden nach der in Kapitel 3.3.1.2. beschriebenen Methode neu bestimmt.

###### **3.3.2.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 3.3.1.7 beschrieben durchgeführt.

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: Die Probe wurde mit Aqua bidest. auf den angestrebten Proteingehalt eingestellt. Drei Teile dieser Lösung wurden mit einem Teil Probenauftragspuffer (4-fach; 0,2 M Tris-Base pH 6,8, 8% (m/V) SDS, 40% (m/V) Glycerol, 20% (m/V)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,02% (m/V) Bromphenolblau) versetzt und fünf Minuten im siedenden Wasserbad abgekocht. Danach wurden die Proben fünf Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder oder Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker) auf das Gel aufgetragen.

#### **3.3.2.2.3. Westernblot**

Beim Westernblot werden die Proteine im Gel mittels eines senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen, an der sie über hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. Im Anschluss werden die Proteinbanden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel vorübergehend in Transferpuffer (bestehend aus 20% (v/v) Methanol, 25 mM Tris-HCl und 192 mM Glycin) gelagert. Nach Aktivierung der PVDF-Transfermembran (Hybond™-P, Amersham GE Healthcare) durch Waschen in Methanol und Wasser wurde das Blotting-Sandwich zusammengebaut und mit einem Kühlakku in die Apparatur (Biorad) eingesetzt, die Kammer mit Transferpuffer befüllt und für den Blot-Vorgang eine Spannung von 90 V über zwei Stunden angelegt. Im Anschluss wurde die Membran zum Blocken der unbesetzten Membranflächen für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit einer 5%igen Milchpulverlösung (bestehend aus 5% (m/V) Milchpulver in TBST-Puffer (10% TBS und 0,1% Tween 20)), inkubiert.

Dann wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Es folgte dreimal 10minütiges Waschen mit je 10 ml TBST-Puffer zur Entfernung des überschüssigen und ungebundenen Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt war, wurde im Anschluss für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimal 10minütigen Waschen mit je 10 ml TBST-Puffer folgte die Detektion mit Hilfe Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare). Die Signale wurden auf einem Fotofilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) dokumentiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tab. 3.2 aufgeführt.

Antikörper	Hersteller	Wirt
<b>Primärantikörper</b>		
<b>anti-VDAC2</b> (Mitochondrienmarker)	acris Antibodies GmbH, Herford	Goat
<b>anti-Calnexin</b> (Mikrosomenmarker)	acris Antibodies GmbH, Herford	Rabbit
<b>anti-mARC-1</b>	Abgent, Oxfordshire, UK	Rabbit
<b>anti-mARC-2</b>	Sigma, Taufkirchen	Rabbit
<b>anti-CYB5B</b>	Sigma, Taufkirchen	Rabbit
<b>anti-CYB5R3</b>	acris Antibodies GmbH, Herford	Goat
<b>Sekundärantikörper</b>		
<b>anti-Goat</b> (an HRP gekoppelt)	Sigma, Taufkirchen	Donkey
<b>anti-Rabbit</b> (an HRP gekoppelt)	Sigma, Taufkirchen	Goat

Tab. 3.2: Die für die Westernblots verwendeten Primär- und Sekundärantikörper (*HRP = horseradisch peroxidase*)

### 3.4. ERGEBNISSE

#### 3.4.1. Charakterisierung der rekombinant hergestellten humanen Proteine

Die Protein-, Häm und FAD-Gehalte wurden pro Charge an zwei verschiedenen Tagen bestimmt. Die Mittelwerte befinden sich in Tab. 8.1 in Kapitel 8.

Die Molybdängehalte der mARC-Proteine wurden an insgesamt drei Terminen gemessen. In der ersten Messung wurde sichergestellt, dass durch die beiden Methoden der Probenvorbereitung (Kap. 3.3.1.3) kein wesentlicher Unterschied in den Messwerten auftrat (Kap. 3.4.2). In den folgenden Messungen wurde auf das Umpuffern verzichtet und die Probe verdünnt vermessen. Die Mittelwerte der Molybdängehalte befinden sich in Tab. 8.1 in Kapitel 8. In den Negativkontrollen war so gut wie kein Molybdän nachweisbar.

Die Reinheit der rekombinant hergestellten humanen Proteine wurde im SDS-Gel überprüft. Dabei traten keine Auffälligkeiten auf. Die Proteine waren vergleichbar rein (Abb. 8.2, Kapitel 8).

### 3.4.2. Überprüfung der Notwendigkeit des Umpufferns der mARC-Proteine vor der Mo-Bestimmung mittels ICP-MS

Der Unterschied der Molybdängehalte der verdünnten Proben im Vergleich zu denen der umgepufferten Proben war gering (Abb. 3.2). Der Mittelwert der relativen Standardabweichung der Molybdängehalte betrug  $12,6 \pm 8,1\%$  (Werte in Tab. 8.2, Kapitel 8).

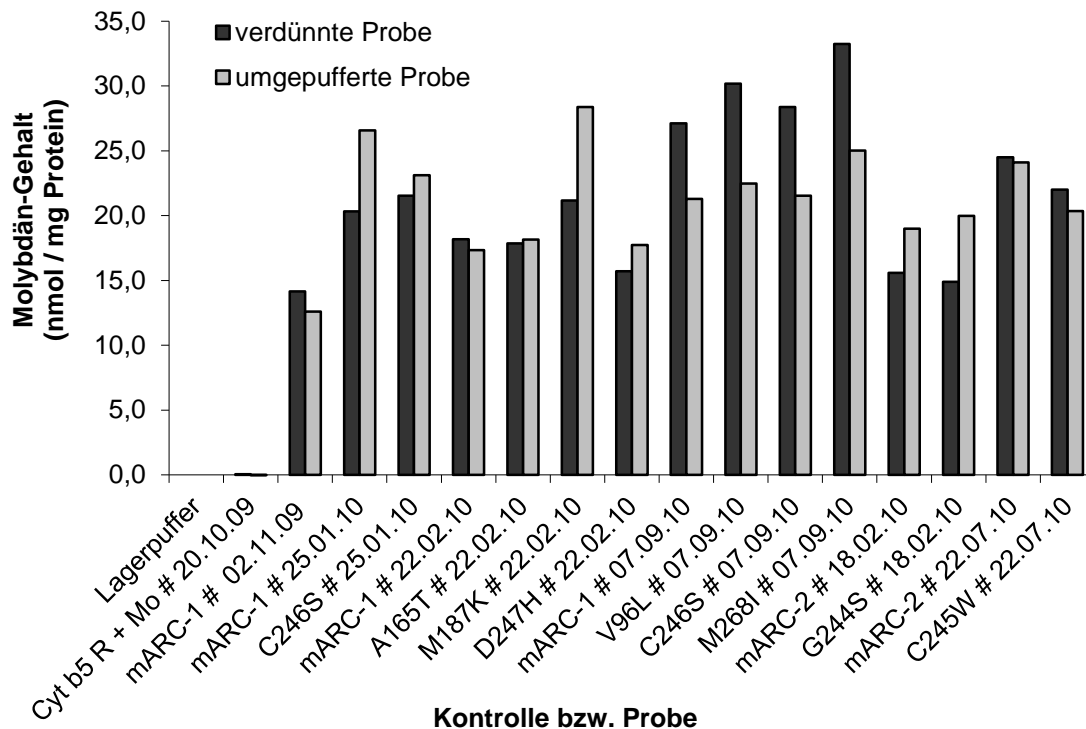


Abb. 3.2: Molybdängehalte der Proben nach Verdünnen bzw. nach Umpuffern, angegeben sind die Mittelwerte.

Außerdem waren die Messwerte aus den verdünnten Proben gut reproduzierbar. Es wurden Wiederholungsmessungen zu beiden Arten der Probenaufbereitung durchgeführt. In der ersten Messung wurde eine mARC-1-Charge (# 02.11.09), deren Molybdängehalt bereits bestimmt war, neu umgepuffert und erneut vermessen. Der Molybdängehalt der Probe betrug 8 nmol Mo / mg Protein statt 12 nmol Mo / mg Protein. In der zweiten Messung wurden zum einen eine in der ersten Messung vermessene und zwischenzeitlich bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Probe (G244S # 18.02.10) erneut vermessen und zum anderen wurde dieses Protein neu verdünnt und vermessen. Der Molybdängehalt betrug 15 nmol Mo / mg Protein in der ersten Messung, 14 nmol Mo / mg Protein in der eingefrorenen Probe und 13 nmol Mo / mg

Protein in der neu verdünnten Probe. In der dritten Messung wurden die gleichen Wiederholungsmessungen an einer anderen Proteincharge (M187K # 12.10.11) durchgeführt. Die Molybdängehalte betragen 23, 25 und 25 nmol Mo / mg Protein. In der Probenvorbereitung für die ICP-MS-Messung konnte auf das Umpuffern verzichtet werden. Das einfache Verdünnen der Proteinprobe mit Lagerpuffer pH 7,4 stellte eine optimale Probenvorbereitung dar.

### 3.4.3. Molybdänsättigung der mARC-Varianten im Vergleich zum Wildtypprotein

Aus den Molybdängehalten wurde mit Hilfe des Molekulargewichts der rekombinant hergestellten mARC-Proteine (mARC-1: 33,14 kDa, mARC-2: 33,3 kDa) die Sättigung des Proteins mit Molybdän berechnet. Sie lag in den Expressionansätzen für die Einfachvarianten bei mARC-1 in einem Bereich von 50 bis 95% (Mittelwert  $71 \pm 14\%$ ) und bei mARC-2 zwischen 75 und 90% (Mittelwert  $72 \pm 12\%$ ) (Abb. 3.3, Tab. 8.3 in Kapitel 8).

Ein Vergleich der Molybdänsättigung der mARC-Varianten mit dem Wildtypprotein ergab nach gleicher Probenaufbereitung keine statistisch signifikanten Unterschiede (mARC-1 und Varianten: ANOVA mit Dunett's Post-hoc-Test, mARC-2 und Varianten: ANOVA, SigmaPlot11.0).

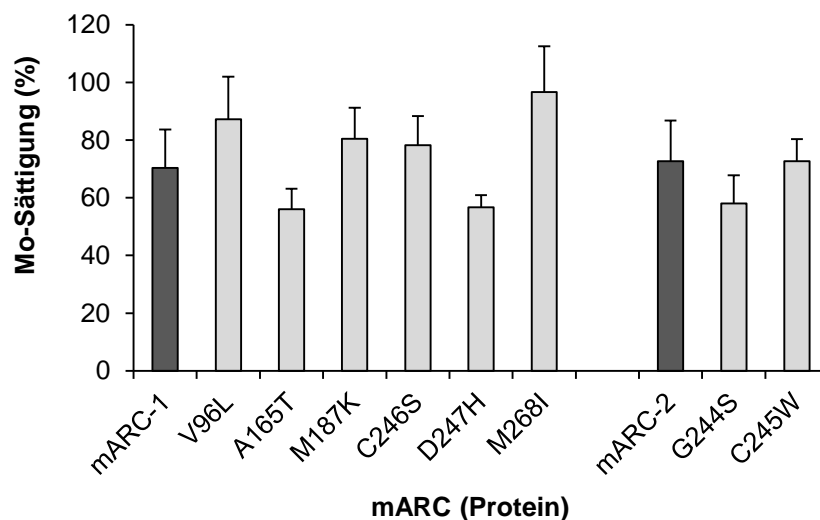


Abb. 3.3: Molybdänsättigung (%) der mARC-Proteine und -einfachvarianten, angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

In den Expressionansätzen für die Mehrfachvarianten lag die Molybdänsättigung bei mARC-1 in einem Bereich von 60 bis 85% (Mittelwert  $74 \pm 8\%$ ) und bei mARC-2 zwischen 40 und 50% (Mittelwert  $44 \pm 4\%$ ) (Abb. 3.4, Tab. 8.3 in Kapitel 8). mARC-1 und seine Varianten waren in diesen Expressionsansätzen besser mit Molybdän gesättigt als mARC-2 und seine Varianten. Auffällige Unterschiede zwischen Varianten und Wildtypprotein gab es nicht.

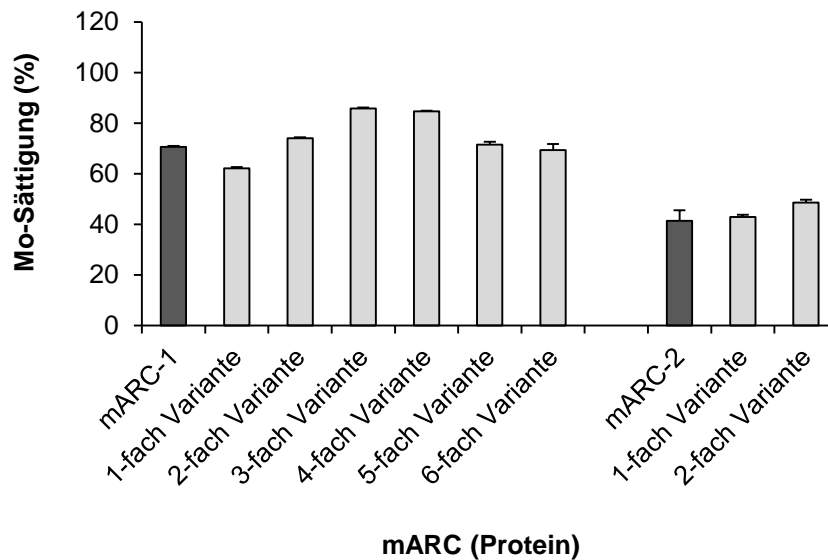


Abb. 3.4: Molybdänsättigung (%) der mARC-Proteine und –mehrfachvarianten, angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

#### 3.4.4. Prüfung auf Korrelation zwischen FormA-dephospho- und Mo-Gehalt

Die FormA-dephospho-Gehalte der mARC-Proteine wurden im Arbeitskreis von Prof. Mendel am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig bestimmt und anschließend auf die in Kiel bestimmten Proteingehalte umgerechnet (Tab. 3.3).

Da bei der FormA-dephospho-Bestimmung MPT miterfasst wurde, war es richtig, dass die FormA-dephospho-Gehalte höher als die Molybdängehalte waren. Die Schwankungen lagen zwischen 105 und 433%.

Graphisch ließ sich keine Korrelation zwischen FormA-dephospho- und Molybdängehalt aufzeigen weder für die Wildtypproteine noch für die Varianten (Abb. 3.5)



### 3 CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN UND NATIVEN ENZYMQUELLEN

mARC-Protein	Mo-Gehalt (nmol / mg Protein)	FormA-dephospho- Gehalt (nmol / mg Protein)	FormA / Mo
mARC-1 # 25.01.10	23,46	27,71	1,18
C246S # 25.01.10	22,34	23,53	1,05
mARC-1 # 22.02.10	17,76	61,94	3,49
A165T # 22.02.10	18,00	50,44	2,80
M187K # 22.02.10	24,78	49,98	2,02
D247H # 22.02.10	16,73	72,45	4,33
mARC-1 # 07.09.10	24,22	89,00	3,67
V96L # 07.09.10	26,34	72,41	2,75
C246S # 07.09.10	24,95	FormA nicht bestimmt	
M268I # 07.09.10	29,14	78,19	2,68
mARC-2 # 18.02.10	17,29	44,17	2,55
G244S # 18.02.10	17,44	35,64	2,04
mARC-2 # 22.07.10	24,31	48,77	2,01
C245W # 22.07.10	21,19	41,51	1,96

Tab. 3.3: Molybdän- und FormA-dephospho-Gehalte der mARC-Proteine, angegeben sind die Mittelwerte.

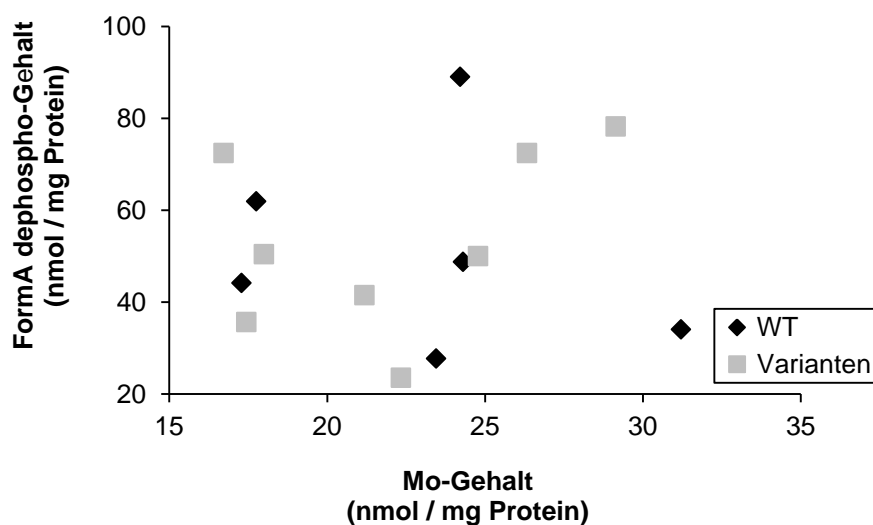


Abb. 3.5: FormA-dephospho- versus Molybdängehalte in den mARC-Wildtypen und -Varianten, dargestellt sind die Mittelwerte.

### 3.4.5. Hämgehalte der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Proteine

Die Hämgehalte schwankten um 60% um den Mittelwert von 3,5 nmol Häm / mg Protein, was einer Häm-Sättigung von 6% entsprach. Um die Schwankungsbreite besser einschätzen zu können, wurden die Hämgehalte der zu untersuchenden Wildtypen und Varianten mit denen der im Arbeitskreis verfügbaren Wildtypen verglichen (Abb. 3.6).

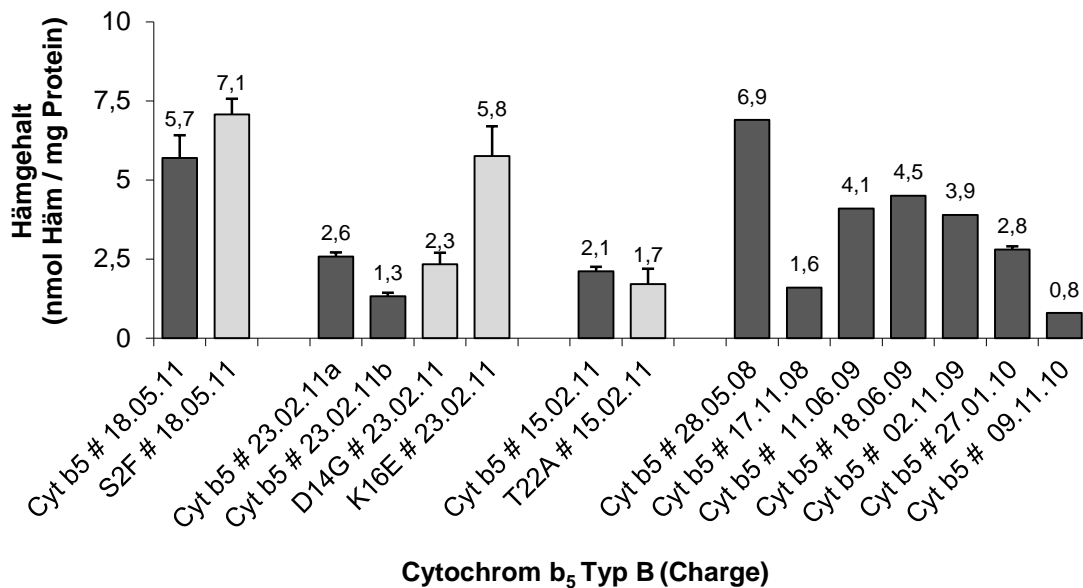


Abb. 3.6: Hämgehalte der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen, angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der in dieser Arbeit untersuchten Chargen sowie die Mittelwerte der im Arbeitskreis untersuchten Chargen.

Es war erkennbar, dass die Schwankungen des Hämgehalts in dem üblichen Rahmen lagen.

### 3.4.6. Charakterisierung der nativen porcinen Enzymquellen

Die Proteingehalte der porcinen subzellulären Fraktionen der Leber lagen bereits vor, die der Schilddrüse wurden an zwei verschiedenen Tagen bestimmt. Die Mittelwerte befinden sich in Tab. 8.4 in Kapitel 8.

Die Identität und Reinheit der subzellulären Fraktionen der porcinen Schilddrüse wurde mittels Westernblot überprüft. Dazu wurden als Primärantikörper polyklonale Antikörper gegen VDAC2 und Calnexin verwendet.

VDAC2 steht für „*voltage-dependent anion channel 2*“. Dieser spannungsabhängige Anionkanal ermöglicht die Diffusion von Metaboliten durch die äußere mitochondriale Membran. Demzufolge wird der anti-VDAC-Primärantikörper als Mitochondrienmarker eingesetzt. Nur in der Mitochondrienfraktion der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen war eine VDAC2-Bande auf Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 31,6 kDa und eine Bande des VDAC-Dimers bei 63,2 kDa erkennbar. Die Mitochondrien waren nur in der subzellulären Mitochondrienfraktion nachweisbar (Abb. 8.3, Kapitel 8).

Calnexin ist ein integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums. Es besteht aus einer 50 kDa großen *N*-terminalen Calcium-bindenden luminalen Domäne, einer transmembranären Helix und einem kurzen sauren cytoplasmatischen Rest. Je nach Antikörper können im Westernblot Banden bei 90, 80 oder 75 kDa erscheinen. Da Mikrosomen aus Fragmenten des Endoplasmatischen Retikulums bestehen, wird der anti-Calnexin Primärantikörper als Mikrosomenmarker eingesetzt. In der Mikrosomenfraktion der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen war eine deutliche Calnexin-Bande auf Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 90 kDa erkennbar. Diese Bande trat in schwächerer Form allerdings auch in der Mitochondrienfraktion auf. Die Mitochondrienfraktion war leicht mit Mikrosomen verunreinigt (Abb. 8.4, Kapitel 8).

Außerdem wurde überprüft, in welchen subzellulären Fraktionen sich mARC-1, mARC-2, Cytochrom *b*<sub>5</sub> Typ B und NADH-Cytochrom *b*<sub>5</sub> Reduktase 3 befanden.

Die mARC-1 haltigen subzellulären Fraktionen wurden mit einem anti-mARC-1-Primärantikörper identifiziert. In der Mitochondrienfraktion der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen war eine deutliche mARC-1-Bande auf Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 36 kDa erkennbar. mARC-1 war nur in der subzellulären Mitochondrienfraktion nachweisbar. Außerdem detektierte dieser Antikörper das rekombinant hergestellte mARC-1; auf der Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 33 kDa war eine Bande erkennbar. mARC-2 wurde durch den verwendeten Antikörper nicht erkannt (Abb. 8.5, Kapitel 8).

Die mARC-2 haltigen subzellulären Fraktionen wurden mit einem anti-mARC-2-Primärantikörper identifiziert. In der Mitochondrienfraktion der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen war eine deutliche mARC-2-Bande auf Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 36 kDa erkennbar. mARC-2 war nur in der subzellulären Mitochondrienfraktion nachweisbar. Außerdem detektierte dieser

Antikörper das rekombinant hergestellte mARC-2; auf der Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 33 kDa war eine Bande erkennbar. mARC-1 wurde durch den verwendeten Antikörper nicht erkannt (Abb. 8.6, Kapitel 8).

Die Cytochrom  $b_5$  Typ B-haltigen subzellulären Fraktionen wurden mit einem anti-CYB5B-Primärantikörper identifiziert. In der Mitochondrienfraktion der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen war eine Cytochrom  $b_5$  Typ B-Bande auf Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 18 kDa erkennbar. Cytochrom  $b_5$  Typ B war nur in der subzellulären Mitochondrienfraktion nachweisbar (Abb. 8.7, Kapitel 8).

Die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase 3-haltigen subzellulären Fraktionen wurden mit einem anti-CYB5R3-Primärantikörper identifiziert. In der Mitochondrienfraktion der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen war eine deutliche Bande der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase 3 auf Höhe des vorhergesagten Molekulargewichts von 33 kDa erkennbar; in der Mikrosomenfraktion trat eine schwächere Bande auf. NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase 3 befand sich zum Großteil in der subzellulären Mitochondrienfraktion, die Mikrosomenfraktion enthielt erkennbar weniger NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase 3 (Abb. 8.8, Kapitel 8).

Anhand der Westernblots ist erkennbar, dass die subzellulären Fraktionen rein und kaum mit Bestandteilen anderer Fraktionen kontaminiert sind. Die Mitochondrienfraktion ist die einzige Fraktion, die alle Komponenten des *N*-reduktiven Dreikomponentensystems enthält (Abb. 3.7).

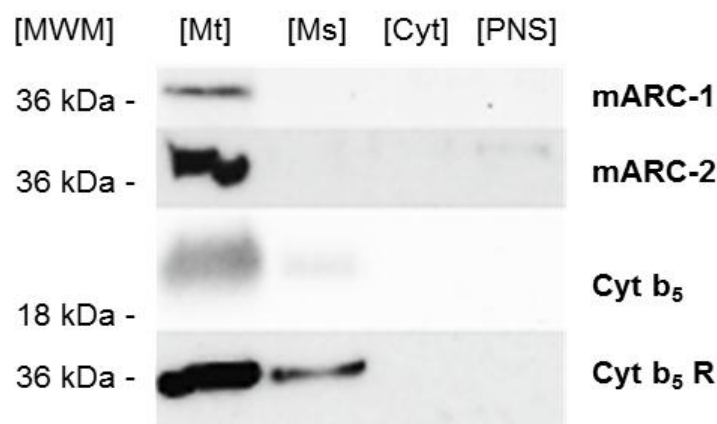


Abb. 3.7: Zusammenstellung der vier Westernblots der zu den Komponenten des *N*-reduktiven Enzymsystems in den subzellulären Fraktionen der porcinen Schilddrüse (*MWM* = Molekulargewichtsmarker, *Mt* = Mitochondrien, *Ms* = Mikrosomen, *Cyt* = Cytosol, *PNS* = post-nukleärer Überstand)

#### 3.5. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Das Protokoll zur Probenvorbereitung für die Messung der Molybdängehalte der mARC-Proteine mittels ICP-MS wurde erfolgreich vereinfacht. Die Messung kann aus den verdünnten Proteinlösungen erfolgen und liefert gut reproduzierbare Werte. Dem gegenüber steht die Bestimmung des FormA-dephospho-Gehalts, durch die nicht nur der Molybdäncofaktor, sondern auch dessen Vorstufe MPT erfasst wird. Es konnte weder für die Wildtypproteine noch für die Varianten eine Korrelation zwischen beiden Werten aufgezeigt werden. Es wurde auch keine Verschiebung der FormA-dephospho-Gehalte der Varianten gegenüber den Wildtypproteinen beobachtet. Die Bestimmung des FormA-dephospho-Gehalts stellt eher einen qualitativen Nachweis der Bindung von MPT bzw. Molybdäncofaktor an das Protein dar. Zur quantitativen Bestimmung des Molybdäns im Molybdäncofaktor ist die ICP-MS-Methode mit ihrer sehr niedrigen Bestimmungsgrenze die Methode der Wahl. Darüber hinaus ist sie vor Ort durchführbar.

Als wichtiges Ergebnis zu den Proteinvarianten bleibt festzuhalten, dass alle Varianten exprimierbar waren und dass sowohl die mARC- als auch die Cytochrom  $b_5$  Typ B-Varianten ihren jeweiligen Cofaktor gebunden hatten. Die Varianten übten keinen Einfluss auf die Cofaktorbindung aus. Die Cofaktoren werden für die Elektronenübertragung während der Reduktion benötigt. Alle Varianten tragen diese für die Reduktion notwendige Struktur und müssten folglich in der Lage sein, Aktivität zu zeigen. Wie groß die Aktivität im Vergleich zum Wildtypprotein ist, ist in den folgenden Inkubationen zu klären.

Über die Wahl des Expressionssystems für die rekombinanten Proteine wird häufig diskutiert. Das optimale Expressionssystem gibt es nicht. Bakterielle Systeme, wie *E. coli* sind gut untersucht, einfach zu handhaben, können aber Schwierigkeiten in der Expression bereiten und keine eukaryotischen Proteinmodifikationen vornehmen. Eine heterologe Expression in Säugerzellen ist für Säugerproteine sicherlich die beste Wahl, weil in ihnen die Modifikationen und Faltungen so vorgenommen werden, wie sie sein sollten, allerdings benötigt man entsprechende Labore (Mülhardt 2009).

Die mARC-Proteine sind nicht kommerziell erhältlich. Der Arbeitskreis von Prof. Mendel am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig hat die Expression der rekombinanten mARC-Proteine in *E. coli* etabliert. Kürzlich wurde dort auch ein

System zur Expression von mARC in der Hefe *Pichia pastoris* eingeführt. Im Gegensatz zu *E. coli* kann *P. pastoris* auch die für Eukaryoten spezifischen posttranslationalen Modifikationen vornehmen (Wahl 2010), allerdings weisen die mARC-Proteine nach der Expression in *E. coli* eine wesentlich bessere Sättigung mit dem Molybdäncofaktor auf und besitzen *in vitro* eine deutlich höhere *N*-reduktive Aktivität.

Die humane Sulfitoxidase ist ein Beispiel dafür, dass die Expression des rekombinanten Proteins und seiner Varianten in *E. coli* sehr gute Ergebnisse liefern kann und nicht zwingend in einem eukaryotischen Expressionssystem stattfinden muss. Die Expression rekombinanter humaner Sulfitoxidase, die um ihre mitochondriale Targeting-Sequenz trunziert wurde, wurde durch Verwendung des *E. coli* Stammes TP1000 optimiert. In diesem Stamm wurde nur die eukaryotische Form des Moco gebildet, wodurch die Produktion aktiven Enzyms stark anstieg. Ferner wurde das rekombinante Protein sowohl mit als auch ohne His-tag exprimiert. Zwischen beiden Formen traten keine Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften auf (Temple *et al.* 2000). Über *site-directed mutagenesis* war es möglich, gezielt Varianten des Enzyms zu exprimieren. Die R160Q-Variante trat bei Patienten mit Sulfitoxidasemangel auf. Die rekombinant hergestellte Proteinvariante enthielt zwar Moco, zeigte aber eine ca. 1000-fach erniedrigte katalytische Effizienz am Substrat Sulfit (Garrett *et al.* 1998).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass alle humanen rekombinanten Proteine und Varianten exprimierbar sind, rein vorliegen und ihre Cofaktoren enthalten. In den nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen zur Reduktion von Benzamidoxim bzw. Sulfamethoxazolhydroxylamin können die tatsächliche Aktivität am Substrat ermittelt und mögliche Unterschiede in den Varianten herausgearbeitet werden.

Als wichtigstes Ergebnis aus den Westernblotanalysen der subzellulären Fraktionen der porcinen Schilddrüse bleibt festzuhalten, dass in den Mitochondrien alle Komponenten des *N*-reduktiven Enzymsystems nachgewiesen werden konnten.

### 4. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG GENETISCHER VARIANTEN AM SUBSTRAT BENZAMIDOXIM

#### 4.1. EINLEITUNG

SNPs können, wie in der Einleitung dieser Arbeit in Kapitel 1 beschrieben, die Aktivität des resultierenden Proteins verändern. Intronische SNPs in *MARC1* und *MARC2* sind in drei genomweiten Assoziationsstudien angegeben (Kapitel 1.4). Zu SNPs, die im codierenden Bereich der DNA der beiden mARC-Gene liegen und zum Aminosäureaustausch führen, sind bislang keine Daten über deren funktionelle Relevanz veröffentlicht. Während Untersuchungen zu nichtsynonymen SNPs in *CYB5A* und den daraus resultierenden Proteinvarianten vorliegen (Kurian *et al.* 2007), sind Proteinvarianten der mitochondrialen Isoform, die durch SNPs im *CYB5B*-Gen entstehen könnten, noch nicht untersucht.

Zur Untersuchung der *N*-reduktiven Aktivität ist ein *in vitro*-Assay im Arbeitskreis etabliert. An diesem Assay wurde zum einen der Einfluss verschiedener Zusätze auf die *N*-reduktive Aktivität untersucht und zum anderen das stöchiometrische Verhältnis der drei rekombinant hergestellten humanen Proteinkomponenten mARC, Cytochrom  $b_5$  Typ B und NADH Cytochrom  $b_5$  Reduktase im Inkubationsvolumen sowie die Wahl des Puffers optimiert. Hohe Werte für die *N*-reduktive Aktivität lassen sich ermitteln, wenn die Inkubationen in 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-(MES)-Puffer bei pH 6,0 stattfinden und wenn mARC und Cytochrom  $b_5$  Typ B im Überschuss gegenüber der NADH Cytochrom  $b_5$  Reduktase vorliegen. Das optimale Verhältnis von mARC : Cytochrom  $b_5$  Typ B : NADH Cytochrom  $b_5$  Reduktase liegt im Bereich von 10:10:1 bis 110:10:1 (Plitzko Diplomarbeit 2010) und sollte vor Versuchsbeginn mit den aktuellen Proteinchargen kurz überprüft werden.

### 4.2. ZIELSETZUNG

Alle rekombinant hergestellten Proteinvarianten sind am Substrat Benzamidoxim zu untersuchen.

Die Untersuchung der Auswirkungen des jeweils einzelnen Austauschs von sechs Aminosäuren in mARC-1 und von zwei in mARC-2 auf die *N*-reduktive Aktivität erfolgt über die Bestimmung der kinetischen Parameter. Da der Inkubationsansatz als vereinfachtes *in vitro*-Modell für Träger homozygoter Genotypen der betreffenden SNPs betrachtet werden kann, sollen die Inkubationen dreimal je Proteincharge wiederholt werden, so dass ausreichend Daten vorhanden sind, um Aussagen über eine mögliche statistische Signifikanz in den Unterschieden machen zu können.

Darüber hinaus soll untersucht werden, welche Auswirkungen der gleichzeitige Austausch von bis zu sechs Aminosäuren in mARC-1 sowie von bis zu zwei Aminosäuren in mARC-2 hat.

Auch die rekombinant hergestellten Proteinvarianten des Cytochrom b5 Typ B sind hinsichtlich der *N*-reduktiven Aktivität am Modells substrat Benzamidoxim zu untersuchen. Sollten hier starke Unterschiede zwischen Wildtyp und Variante auftreten, so kann eine anschließende Genotypisierung der betreffenden Positionen im *CYB5B*-Gen erwogen werden.

### 4.3. METHODEN

#### 4.3.1. Materialien und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Kapitel 9 der vorliegenden Arbeit aufgeführt. Benzamidoxim wurde aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert (Krüger 1885) und auf dem üblichen Wege charakterisiert.

#### 4.3.2. Enzymquellen

Die verwendeten Enzymquellen und deren Charakterisierung wurden in Kapitel 3 dieser Arbeit beschrieben.



### 4.3.3. *In vitro* Biotransformation von Benzamidoxim zu Benzamidin

#### 4.3.3.1. Inkubationsansatz

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad durchgeführt. Der Inkubationsansatz besaß ein Endvolumen von 150 µl und enthielt 3 (Standardinkubationsansatz) bzw. 0,05 bis 10 mM Benzamidoxim (Inkubationsansätze zur Bestimmung der kinetischen Parameter), 6 µg mARC bzw. 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B) und 6 pmol FAD (NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase) in 20 mM MES pH 6,0. Nach dreiminütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Nach 15minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eiskalten Methanols gestoppt, die Ansätze 5 min geschüttelt und 5 min bei 10.000 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen.

#### 4.3.3.2. HPLC-Analytik

Die Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin wurde von Friedrich beschrieben (Friedrich Dissertation 2003) und erfolgte in Anlehnung an diese Methode.

HPLC Pumpe	Waters 1525	
Detektor	Waters 2487	
Autosampler	Waters 717	
Integrator	Waters Breeze Vers. 3.30	
Stationäre Phase	LiChroCart, LiChrospher 60, RP select B, (Merck, Länge 250 x 4mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule 4 x 4 mm (Merck)	
Mobile Phase	83 % 10 mM 1-Octylsulfonat in Aqua bidest. 17% Acetonitril	
Flussrate	1 ml / min	
Laufzeit	30 min	
Detektion	229 nm	
Injektionsvolumen	40 µl	
Retentionszeit	Benzamidoxim	7,9 ± 0,1 min
	Benzamidin	26,7 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde mit einem Whatman<sup>®</sup> Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Nach der Zugabe von Acetonitril wurde kräftig geschüttelt und 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die Kalibrierung von Benzamidin erfolgte im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 500 µM. Sie war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ( $r^2 = 0,9989$ ). Die Richtigkeit für den ermittelten Bestimmungsbereich von 0,05 bis 500 µM betrug  $98 \pm 5\%$ , wobei an der Bestimmungsgrenze von 0,05 µM die Richtigkeit 91% betrug (Abb. 8.9, Kapitel 8).

#### 4.3.3.3. Ermittlung der kinetischen Parameter

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden pro mARC-Protein drei Substratabhängigkeiten an drei verschiedenen Tagen inkubiert. Jede Substratabhängigkeit bestand aus zwei Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Da eine Charge Cytochrom  $b_5$  Typ B nicht ausreichte, um diese Anzahl an Inkubationen durchzuführen, wurden vorab durch Inkubation je eines mARC-1- und mARC-2-Wildtypproteins mit sämtlichen Cytochrom  $b_5$  Typ B-Chargen die entsprechenden Umsetzungsraten ermittelt und daraufhin die verwendeten Chargen so ausgewählt, dass trotz dieses Chargenwechsels die Standardabweichung des Endergebnisses so gering wie möglich war.

Es wurde über die Residualdiagramme geprüft, ob die Substratabhängigkeiten der Kinetik nach Michaelis-Menten folgten. Im Falle des Vorliegens einer Substratüberschusshemmung wurde zunächst der lineare Bereich im Diagramm nach Lineweaver-Burk ermittelt. War die Linearität über den gesamten Konzentrationsbereich gegeben, so folgte die Auswertung in der direkten Darstellung mit SigmaPlot 11.0. Wenn die Linearität nicht gegeben war, wurde zunächst der lineare Bereich ermittelt. Für diesen Bereich wurden die kinetischen Parameter über SigmaPlot 11.0 errechnet. Die Umsetzungsgeschwindigkeiten für die Werte, die nicht in dem linearen Bereich lagen, wurden über die Michaelis-Menten-Gleichung errechnet und für die abschließende Berechnung der apparenten kinetischen Parameter über SigmaPlot 11.0 benutzt.

### 4.3.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten zu den kinetischen Parametern der mARC-Einfachvarianten erfolgte mit SigmaPlot 11.0.

Für einen Vergleich normalverteilter Daten zwischen beiden Wildtypproteinen am selben Substrat war der t-Test geeignet.

Hatte man allerdings Ansätze mit mehr als zwei Proben, so war der t-Test nicht mehr geeignet. Die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 1. Art zu begehen, d.h. einen Effekt dort zu akzeptieren, wo keiner vorhanden ist, ist nur für zwei Proben definiert. Die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 1. Art zu begehen, wird auch als  $\alpha$ -Wert bezeichnet und üblicherweise wird ein Wert von 0,05 angenommen. Vergleicht man mehr als zwei Proben mit dem t-Test, so erhöht sich dieser Wert. Es tritt ein Fehler 1. Art auf (Bärlocher 2008).

Für den Vergleich normalverteilter Daten von mehr als zwei Proben war die Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) geeignet. Sie zerlegt im einfachsten Fall die Gesamtvariabilität der Daten in zwei Komponenten: (i) in einen Faktor, der durch eine beabsichtigte Behandlung der Proben entstanden ist und dessen Einfluß auf die Varianz der Daten bestimmt werden soll, und (ii) die sogenannte Reststreuung oder Versuchsfehler, deren Ursache unbekannt ist und die auf zufälligen Schwankungen beruht. Durch Bildung des Quotienten aus beiden Varianzen erhält man den sogenannten F-Wert. Ein hoher F-Wert zeigt einen großen Einfluß der Behandlung auf die Meßdaten an (Bärlocher 2008).

Um besonders auffällige Mittelwerte miteinander zu vergleichen, schliesst man an die Varianzanalyse einen Post-hoc-Test an. Der Dunnett's Test ist geeignet, um mehrere normalverteilte Gruppen von Mittelwerten mit einer normalverteilten Referenzgruppe zu vergleichen (Sachs und Hedderich 2006). Dies war beim Vergleich von Proteinvarianten gegenüber dem Wildtypprotein gegeben.

## 4.4. ERGEBNISSE

### 4.4.1. Sicherstellung geeigneter Inkubationsbedingungen

Die optimale Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Für mARC-1 konnte gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von 15 Minuten die Bildung von Benzamidoxim

proportional zur Inkubationszeit verläuft, für mARC-2 über einen Zeitraum von 20 Minuten (Abb. 8.10, Kapitel 8).

Die Überprüfung des optimalen Verhältnisses von mARC : Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B : NADH Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase im Inkubationsansatz ergab, dass die höchste Aktivität erzielt wurde, wenn die drei Komponenten im Verhältnis 6 µg mARC (entspricht 100-140 pmol Mo) bzw. 120 pmol Mo, 60 pmol Häm und 6 pmol FAD vorlagen (Abb. 8.11 und 8.12, Kapitel 8).

Damit die Umsetzungsraten unabhängig von der gewählten Substratkonzentration waren, sollten die Inkubationen im gesättigten Bereich stattfinden. Aus den Substratabhängigkeiten (Abb. 8.13 und 8.14, Kapitel 8) war für mARC-1 und für mARC-2 der Beginn des gesättigten Bereichs bei einer Benzamidoximkonzentration von 2 mM ablesbar. Als optimale Substratkonzentration für die folgenden Inkubationen wurde 3 mM Benzamidoxim gewählt.

Im Standardinkubationsansatz wurde für mARC-1 und für mARC-2 sichergestellt, dass die Reduktion von Benzamidoxim nur dann abläuft, wenn alle drei Komponenten des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems im Inkubationsansatz enthalten sind und die Reaktion mit NADH gestartet worden ist. (Abb. 8.15 und 8.16, Kapitel 8).

#### **4.4.2. Auswirkungen eines Chargenwechsels der Wildtypproteine**

Es wurden die Auswirkungen eines Chargenwechsels der Wildtypproteine mARC-1, mARC-2 und Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B auf die *N*-reduktive Aktivität des Inkubationsansatzes untersucht.

Verschiedene Chargen mARC-1 und mARC-2 zeigten bei Inkubation mit derselben Charge Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase nicht die gleiche spezifische Aktivität (Abb. 4.1).

Der Mittelwert der spezifischen Aktivität besaß eine relative Standardabweichung von 6% mit dem größten Ausreißer nach unten von 53,4 nmol BA / (min mg Gesamtprotein) und nach oben von 137,4 nmol BA / (min mg Gesamtprotein). Bei der Untersuchung der mARC-Varianten sind diese Schwankungen bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

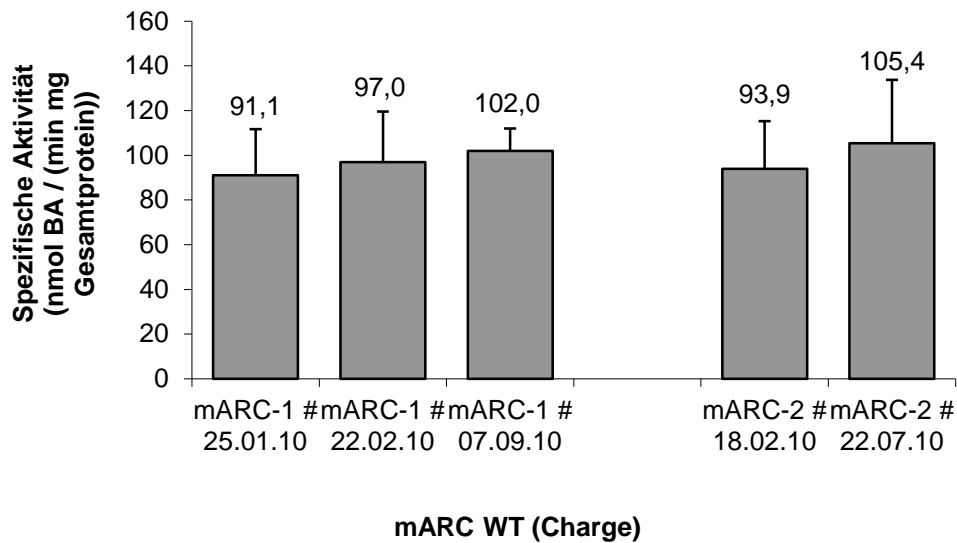


Abb. 4.1: Einfluss des Chargenwechsels auf die spezifische Aktivität des Wildtyp-Proteins

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus mindestens vier Inkubationen mit zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Auch ein Wechsel der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Charge wirkte sich auf die spezifische Aktivität aus (Abb. 4.2). Der überwiegende Teil der Gesamtproteinmenge im Inkubationsansatz stammte vom Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B, so dass folglich ein hoher Hämgehalt der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Charge (z.B. # 18.05.2011) eine hohe spezifische Aktivität im Inkubationsansatz ergab.

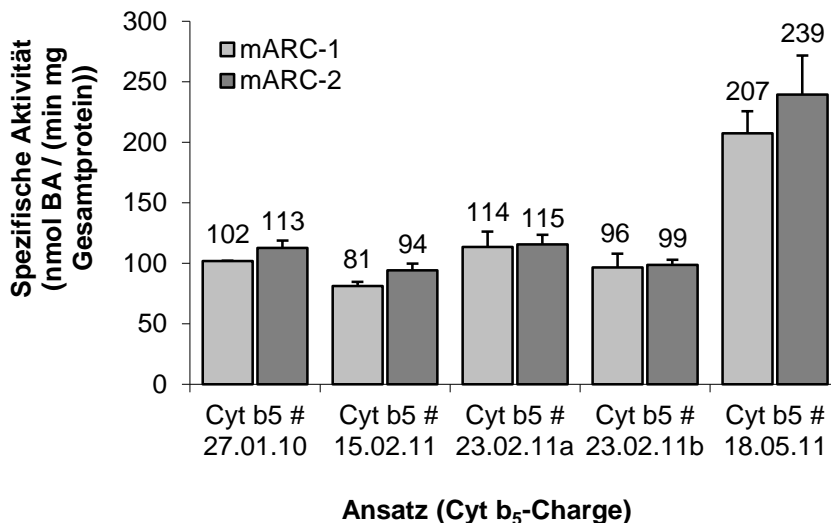


Abb. 4.2: Auswirkungen des Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargenwechsels auf die spezifische Aktivität

#### 4 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG GENETISCHER VARIANTEN

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10, mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub>) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Der Mittelwert der spezifischen Aktivität besaß eine relative Standardabweichung von 42%.

Die Berechnung der Aktivität unabhängig vom Gesamtproteingehalt in „nmol BA / min“ ergab auch Unterschiede zwischen den Chargen (Abb. 4.3). Die relative Standardabweichung des Mittelwerts der spezifischen Aktivität war aber geringer und betrug 23%.

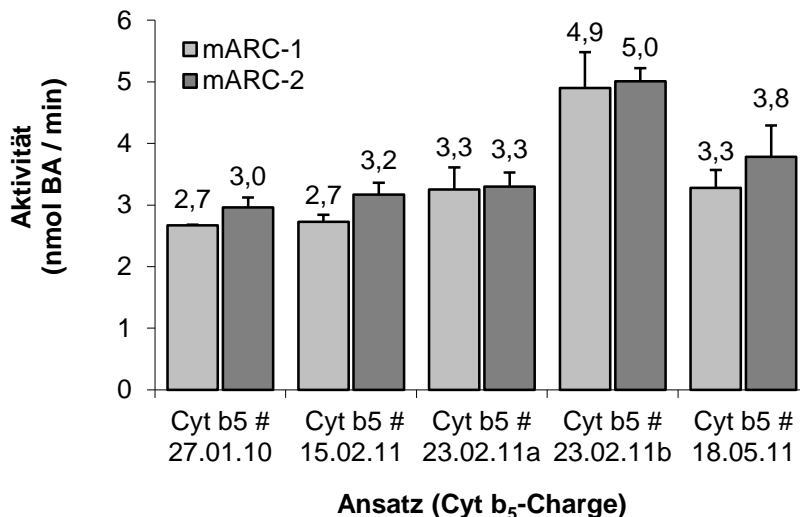


Abb. 4.3: Auswirkungen des Cytochrom b<sub>5</sub>-Chargenwechsels auf die Umsetzungsrate

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10, mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub>) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse war möglich, sofern man zur Ermittlung der spezifischen Aktivität Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen mit ähnlichem Hämgehalt benutzte. Ein Vergleich der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen untereinander konnte über die proteinunabhängige Umsetzungsrate in „nmol BA / min“ erfolgen.

#### 4.4.3. Untersuchung der mARC-Einfachvarianten

Die kinetischen Parameter jeder mARC-Charge (Wildtyp und Einfachvariante) wurden an drei verschiedenen Tagen bestimmt.

Die einzelnen Michaelis-Menten-Kurven und die Angaben zur Zusammensetzung der jeweiligen Inkubationen befinden sich in Kapitel 8.3.3 dieser Arbeit, die Mittelwerte der kinetischen Parameter  $V_{\max}$ ,  $K_m$  und der katalytischen Effizienz der einzelnen Proteinchargen in Tab. 8.5 in Kapitel 8. Die katalytische Effizienz konnte als  $k_{\text{cat}} / K_m$  unter Einbeziehung des Cofaktorgehalts als Surrogat für den Anteil aktiven Enzyms berechnet werden.

Als Endergebnis wurde für alle kinetischen Parameter pro Proteinart, d.h. Wildtyp bzw. Variante, chargenübergreifend ein Mittelwert gebildet (Tab. 4.1).

mARC-Protein (Charge)	Chargenanzahl (n)	$V_{\max}$ ((nmol BA / (min mg Gesamtprotein)))	$V_{\max}$ (nmol BA / min)	$K_m$ (mM BAO)	$k_{\text{cat}} / K_m$ (1 / (s M))
<b>mARC-1</b>					
mARC-1	4	105 ± 23	3,1 ± 0,6	0,23 ± 0,10	1370 ± 430
V96L	1	138 ± 24	4,1 ± 1,2	0,28 ± 0,13	1430 ± 460
A165T	2	125 ± 28	3,9 ± 1,3	0,38 ± 0,21	1070 ± 320
M187K	2	104 ± 22	3,1 ± 0,7	0,34 ± 0,11	970 ± 610
C246S	2	93 ± 21	2,6 ± 0,5	0,20 ± 0,07	1290 ± 420
D247H	2	113 ± 18	3,4 ± 0,7	0,28 ± 0,07	1220 ± 350
M268I	1	94 ± 18	2,7 ± 0,2	0,21 ± 0,07	1270 ± 550
<b>mARC-2</b>					
mARC-2	3	119 ± 34	3,4 ± 1,1	0,35 ± 0,08	890 ± 160 <sup>2</sup>
G244S	1	84 ± 10	2,4 ± 0,2	0,39 ± 0,07	580 ± 40 <sup>3</sup>
C245W	2	48 ± 11 <sup>1</sup>	1,4 ± 0,4	0,20 ± 0,05	650 ± 180 <sup>3</sup>

Tab. 4.1: Chargenübergreifende kinetische Parameter der mARC-Proteine Wildtypen und Varianten. Statistisch signifikante Unterschiede (<sup>1,2,3</sup>) sind nachweisbar und im Text erläutert.

Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede wurden die Einzelwerte pro Proteinart herangezogen. Es waren die folgenden statistisch signifikante

Unterschiede nachweisbar: <sup>1</sup>  $V_{\max}$  der C245W-Variante war gegenüber dem der mARC-2-Wildtypen statistisch signifikant erniedrigt ( $p < 0,050$ , ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test, SigmaPlot 11.0). <sup>2</sup> Die katalytische Effizienz der Wildtypproteine bezüglich Benzamidoxim war bei mARC-2 statistisch signifikant niedriger im Vergleich zu mARC-1 ( $p = 0,005$ , t-Test, SigmaPlot 11.0). <sup>3</sup> Die katalytische Effizienz der mARC-2 Varianten G244S und C245W war im Vergleich zum mARC-2-Wildtypprotein statistisch signifikant erniedrigt ( $p < 0,050$ , ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test, SigmaPlot 11.0).

Die meisten statistisch signifikanten Unterschiede zeigten sich in der katalytischen Effizienz (Abb. 4.4).

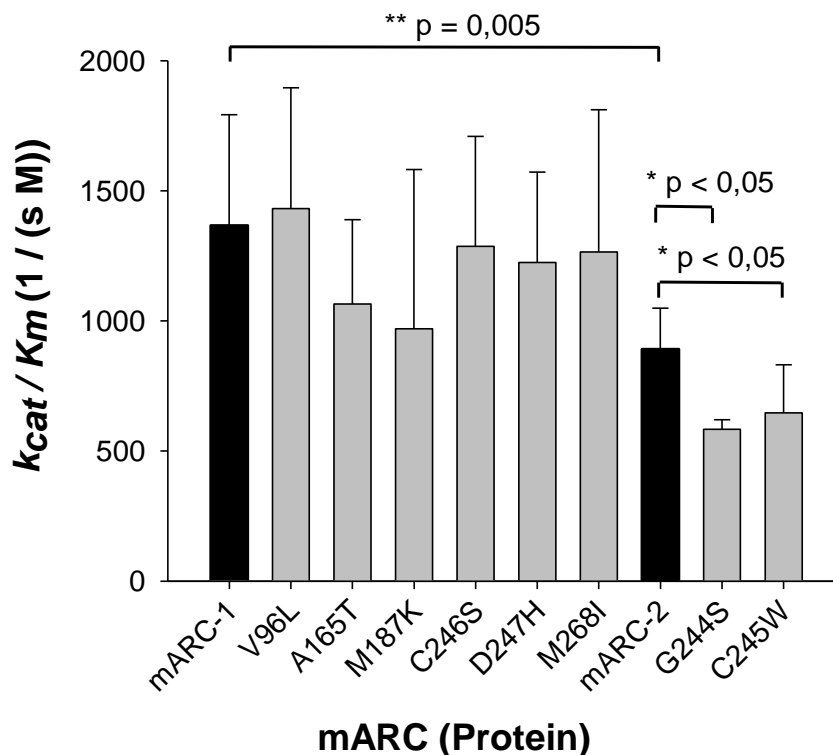


Abb. 4.4: Statistisch signifikante Unterschiede in der katalytischen Effizienz zwischen den mARC-Wildtypproteinen nach t-test sowie zwischen Wildtypprotein und Variante nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test.

#### 4.4.4. Untersuchung der mARC-Mehrfachvarianten

Sechs mARC-1-Einfachvarianten und zwei mARC-2-Einfachvarianten wurden bereits durch ihre kinetischen Parameter charakterisiert. Nun sollten die sechs bzw. zwei Einzelmutationen in einem mARC-1- bzw. mARC-2-Protein vereint und die Auswirkungen auf die *N*-reduktive Aktivität untersucht werden.



Die parallele Inkubation aller Komplettansätze der mARC-Mehrfachvarianten zeigte Unterschiede in der spezifischen Aktivität (Abb. 4.5).

Die spezifische Aktivität der mARC-1 1-fach und 2-fach Variante lagen mit 88 bzw. 85% innerhalb der Standardabweichung der spezifischen Aktivität des Wildtypproteins. Ab der 3-fach Variante brach die spezifische Aktivität auf unter 50% der des Wildtypproteins ein: die der 3-fach Variante liegt bei 42%, die der 4-fach Variante bei 48%, die der 5-fach Mutante bei 23% und die der 6-fach Variante bei 0,4%. Die mARC-1 6-fach Variante hatte ihre Aktivität nahezu komplett verloren.

Die spezifische Aktivität der mARC-2 1-fach liegt mit 83% innerhalb der Standardabweichung der spezifischen Aktivität des Wildtypproteins. Die 2-fach Variante zeigt nur noch 46% der spezifischen Aktivität des Wildtypproteins.

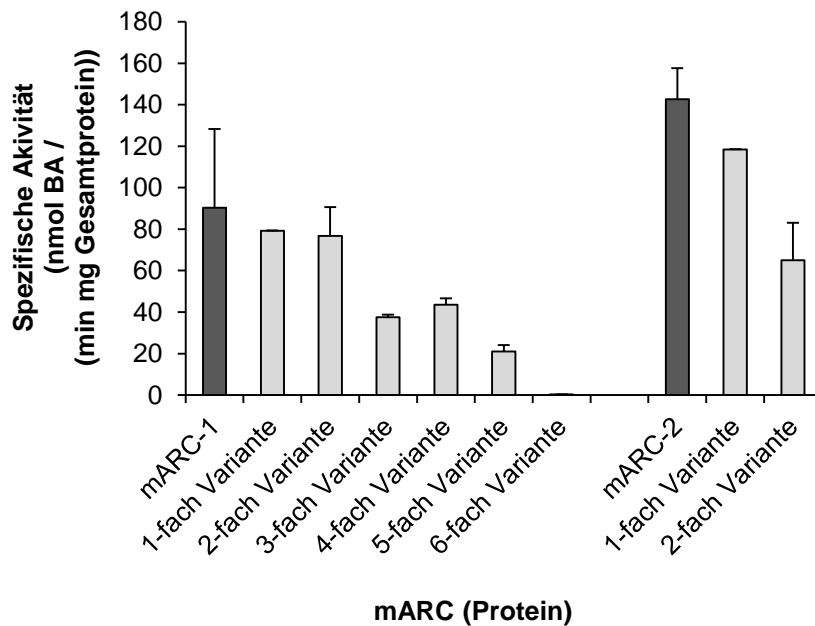


Abb. 4.5: Komplettansätze mit allen mARC-Mehrfachvarianten

Jeder Komplettansatz bestand aus 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt  $b_5$  # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt  $b_5$  R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu$ l). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Außerdem wurden die kinetischen Parameter der *N*-Reduktion von Benzamidoxim durch die mARC-Mehrfachvarianten und Wildtypproteine ermittelt (Tab. 4.2). Sie konnten Ergebnisse aus der Inkubation der Komplettansätze bestätigen.

#### 4 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG GENETISCHER VARIANTEN

mARC-Protein (Charge)	$V_{max}$ ((nmol BA / (min mg Gesamtprotein))	$V_{max}$ (nmol BA / min)	$K_m$ (mM BAO)	$k_{cat} / K_m$ (1 / (s M))
<b>mARC-1</b>				
mARC-1	105,7 ± 25,1	3,64 ± 0,90	0,17 ± 0,03	1940 ± 80
1-fach Variante	81,8 ± 0,7	2,87 ± 0,03	0,20 ± 0,01	1300
2-fach Variante	110,2 ± 0,8	3,76 ± 0,03	0,25 ± 0,01	1370
3-fach Variante	61,8 ± 2,2	2,06 ± 0,07	0,48 ± 0,06	380
4-fach Variante	51,6 ± 1,4	1,74 ± 0,05	0,43 ± 0,04	360
5-fach Variante	40,8 ± 4,5	1,20 ± 0,13	0,42 ± 0,17	260
6-fach Variante	0,6 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,66 ± 0,16	20
<b>mARC-2</b>				
mARC-2	91,3 ± 2,9	3,50 ± 0,11	0,37 ± 0,05	850
1-fach Variante	101,1 ± 9,5	3,85 ± 0,21	0,53 ± 0,10	650
2-fach Variante	73,5 ± 4,1	2,71 ± 0,15	0,44 ± 0,09	560

Tab. 4.2: Kinetische Parameter der mARC-Mehrfachvarianten und Wildtypen; für das mARC-1 Wildtypprotein lagen zwei Chargen vor.

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 0 bis 5 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden mit SigmaPlot 11.0 ermittelt.

Bei mARC-1 brach  $V_{max}$  ab der 4-fach Variante auf Werte unter 50% des Wertes des Wildtypproteins ein. Die 6-fach Variante zeigte so gut wie keine Aktivität mehr. Gleichzeitig stieg mit zunehmendem Einbau von Mutationen in das mARC-Protein der  $K_m$ -Wert an. Daraus resultierte eine Abnahme der katalytischen Effizienz ab der 3-fach Variante auf Werte unter 20 % der des Wildtypproteins. Das heisst, mARC-1 toleriert bei Einbau der sechs Mutationen in der gewählten Reihenfolge maximal das gleichzeitige Auftreten von zwei Mutationen, die zum Aminosäureaustausch führen. Bei mARC-2 war nur in der katalytischen Effizienz eine Abnahme mit zunehmendem Einbau von Mutationen erkennbar. Die 2-fach Variante zeigte eine katalytische Effizienz von 65% des Wildtypproteins.

#### 4.4.5. Untersuchung der Cytochrom b<sub>5</sub> TypB-Varianten

Die einzelnen Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen besaßen unterschiedliche Hämgehalte so dass ein Wechsel der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Charge die Gesamtproteinmenge erheblich verändern und dadurch die spezifische Aktivität beeinflussen würde. Daher erfolgte der Vergleich der Varianten mit dem Wildtypprotein über die Aktivität, angegeben in „nmol BA / min“.

Darüber hinaus wurde in jeder Inkubation der Hämgehalt im Bereich von 30 bis 210 pmol variiert, um zu überprüfen, ob über die Hämmenge Unterschiede in der Aktivität zwischen Wildtyp und Variante herausgearbeitet werden könnten (Abb. 4.6 und 4.7).

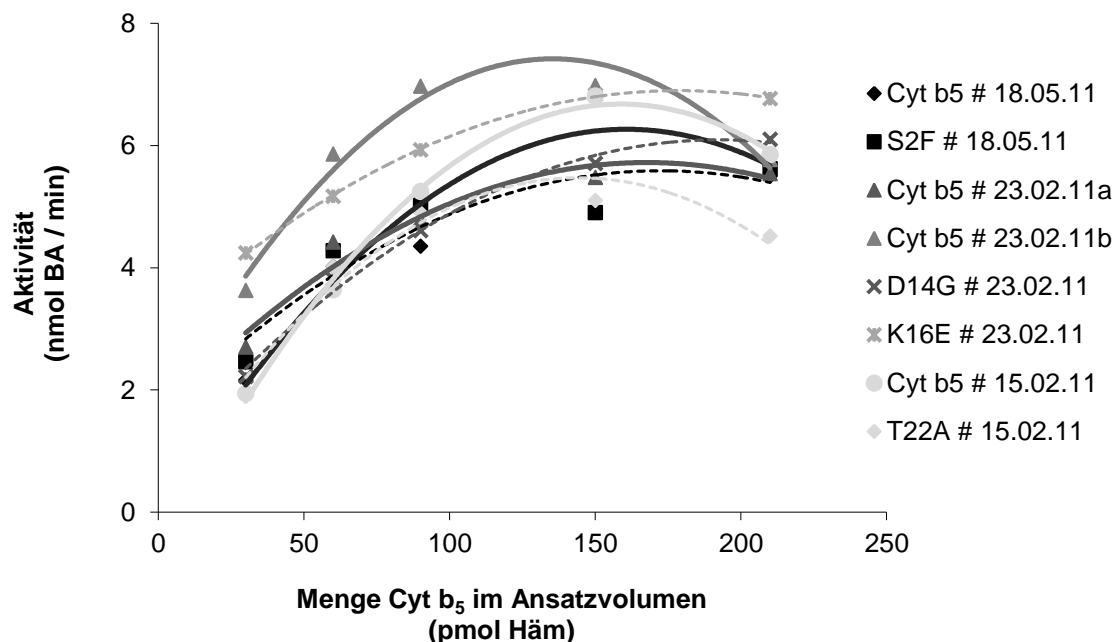


Abb. 4.6: Umsetzungsraten der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Wildtyp-Proteine und -Varianten mit mARC-1

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10), 30 bis 210 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub>) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

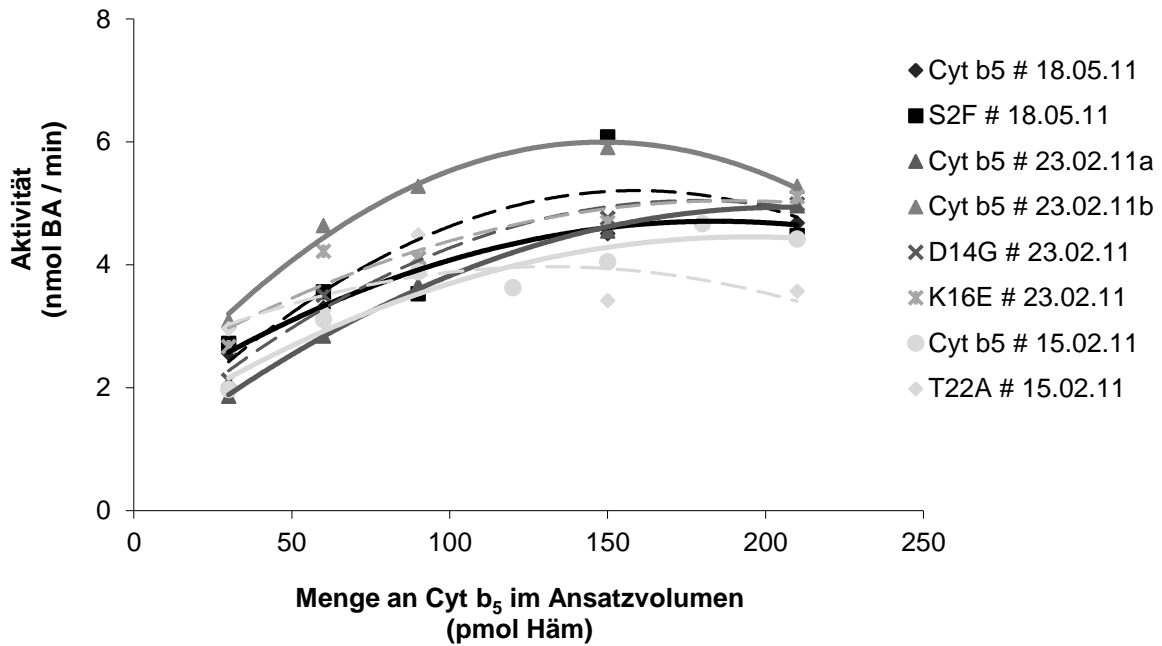


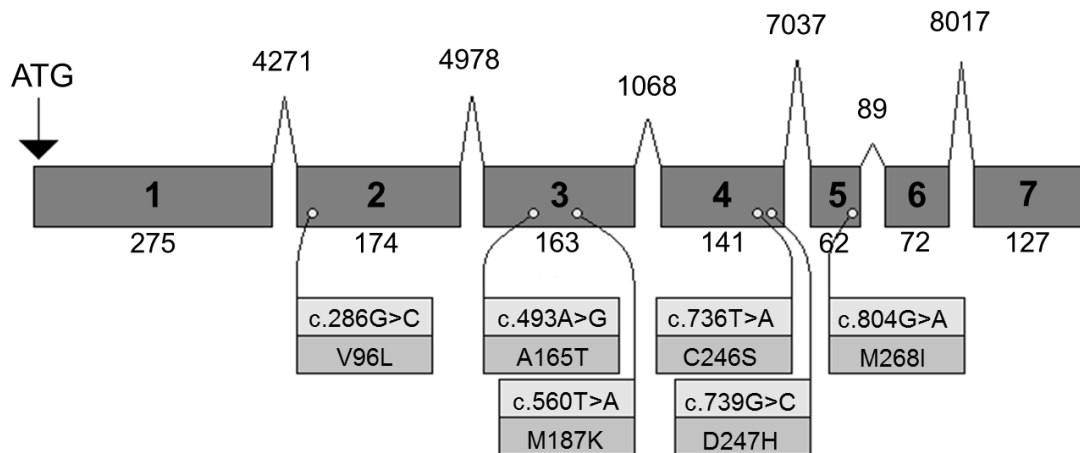
Abb. 4.7: Umsetzungsraten der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B -Wildtyp-Proteine und -Varianten mit mARC-2. Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-2 # 18.02.10), 30 bis 210 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub>) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Die Aktivität der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Varianten lagen sowohl für mARC-1 als auch für mARC-2 innerhalb der Schwankungsbreiten ihrer Wildtypproteine, d.h. die Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Varianten übten keinen Einfluß auf die *N*-reduktive Aktivität aus.

#### 4.5. DISKUSSION

Die zu Beginn der Arbeiten gültige Datenbankversion dbSNP *build* 133 beschrieb für *MARC1* sechs nichtsynonyme SNPs, die in dem offenen Leseraster für das *N*-trunkierte, rekombinante mARC-1 lagen, und für *MARC2* zwei nichtsynonyme SNPs, die in dem offenen Leseraster für das *N*-trunkierte, rekombinante mARC-2 (Abb. 4.8). Diese acht Varianten und ihre Wildtypen wurden rekombinant hergestellt. Die den mARC-1-Varianten A165T und M187K sowie der mARC-2-Variante G244S zugrunde liegenden SNPs weisen auch in den derzeit aktuellen Datenbankversionen die höchsten Allelfrequenzen für das variante Allel auf.

MARC1:



MARC2:

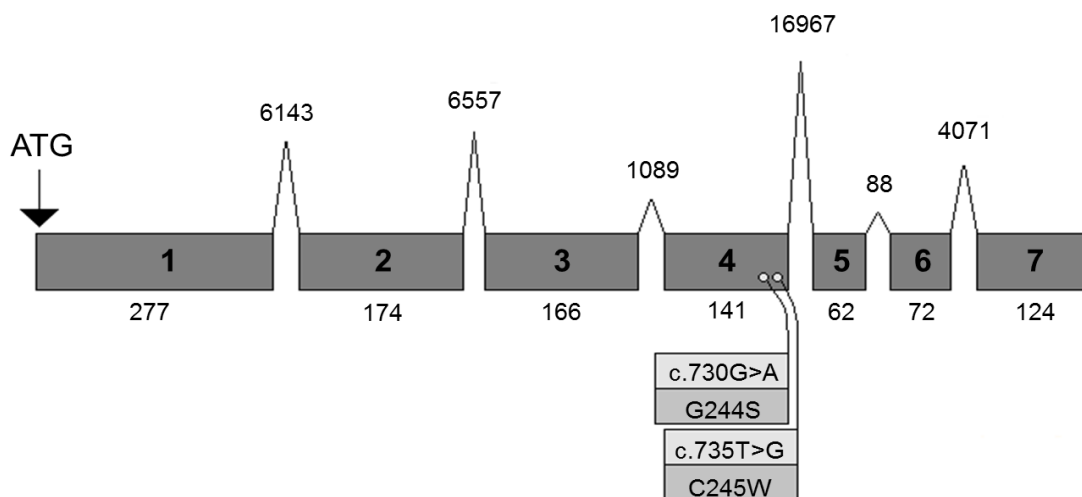


Abb. 4.8: Exon-Intron-Struktur von *MARC1* und *MARC2* nach Wahl *et al.*, 2010 und Lokalisation der nichtsynonymen SNPs mit Nennung der daraus resultierenden Proteinvarianten, die alle rekombinant exprimiert und am Substrat Benzamidoxim funktionell charakterisiert worden sind.

Für eine funktionelle Charakterisierung dieser mARC-Varianten ist das Substrat Benzamidoxim geeignet, denn es stellt das Modellsubstrat des Prodrug-Prinzips „Amidoxime statt Amidine“ dar (Clement 2002). Die *in vitro*-Rekonstitution wurde optimiert und der Assay wurde für robust erklärt (Pitzko Diplomarbeit 2010). Er kann somit für die Bestimmung der kinetischen Parameter eingesetzt werden.

Die Substratabhängigkeiten folgten der Kinetik nach Michaelis-Menten. In einigen Inkubationen war zu beobachten, dass bei hohen Substratkonzentrationen die

Reaktionsgeschwindigkeit wieder sank und nicht einer Maximalgeschwindigkeit zustrebte. Diese Substratüberschusshemmung kommt dadurch zustande, dass nach Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes noch ein weiteres Substratmolekül an das Enzym bindet und die Reaktion hemmt. Es wirkt als unkompetitiver, nur an den Enzym-Substrat-Komplex bindender Hemmstoff. Liegt eine Substratüberschusshemmung vor, so lässt sich der Kurvenverlauf im doppelt-reziproken Diagramm nach Lineweaver-Burk nicht linearisieren (Bisswanger 2000). Auswirkungen auf die Funktion des Enzyms im Menschen hat dieses Phänomen nicht, da es erst bei hohen, nichtphysiologischen Substratkonzentrationen auftritt. Wichtiger ist, dass es in der Berechnung der kinetischen Parameter berücksichtigt wird und dass  $V_{\max}$  und  $K_m$  nicht zu niedrig berechnet und folglich richtig miteinander verglichen werden (Houston und Kenworthy 2000).

$V_{\max}$  und  $K_m$  sind wichtige Charakteristika eines Enzyms.  $K_m$ -Werte von Enzymen variieren im Allgemeinen in einen Bereich von  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  M. Sie geben die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist, und liefern somit ein Maß für die Substratkonzentration, die für eine nennenswerte Katalyse erforderlich ist. In vielen Fällen geben sie die Substratkonzentration *in vivo* annähernd wieder (Berg *et al.* 2013). Auch für das *N*-reduktive Enzymsystem liegen die  $K_m$ -Werte in diesem Bereich mit 0,23 mM BAO für mARC-1 und 0,35 mM BAO für mARC-2, obwohl es sich nur um ein Modellsubstrat handelt.

Der wichtigste Parameter zur Charakterisierung der mARC-Varianten ist die katalytische Effizienz, weil sie auf die physiologischen Bedingungen eingeht.

$V_{\max}$  wird erreicht, wenn alle katalytischen Bindungsstellen am Enzym mit Substrat gesättigt sind. Aus diesem Parameter lässt sich die Wechselzahl berechnen. Sie gibt die Anzahl von Substratmolekülen an, die bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat pro Zeiteinheit in das Produkt umgewandelt werden. Unter physiologischen Bedingungen arbeiten die meisten Enzyme nicht im gesättigten Bereich, das Verhältnis von Substratkonzentration zu  $K_m$ -Wert liegt häufig zwischen 0,01 und 1,0. Ist die Substratkonzentration deutlich kleiner als der  $K_m$ -Wert, so wird der Quotient aus der Katalysegeschwindigkeit mit einem bestimmten Substrat ( $k_{\text{cat}}$ ) und Stärke der Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat ( $K_m$ ),  $k_{\text{cat}} / K_m$ , zum Maß für die katalytische Effizienz (Berg *et al.* 2013).

Ein Vergleich der beiden mARC-Wildtypproteine miteinander zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,005$ , t-Test, SigmaPlot 11.0) in der katalytischen

Effizienz, sie ist für mARC-1 größer als für mARC-2. Auch in der Reduktion der *N*-hydroxylierten Basenanaloga zeigte mARC-1 die höhere katalytische Effizienz (Krompholz *et al.* 2012).

Unter den Proteinvarianten zeigten nur die mARC-2-Varianten G244S und C245W eine signifikant verminderte katalytische Effizienz gegenüber dem Wildtypprotein ( $p < 0,05$ , ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test, SigmaPlot 11.0). Homozygote Träger der für diese beiden Varianten codierenden Genotypen konnten in der untersuchten Kohorte Kaukasier nicht nachgewiesen werden, d.h. dieser Unterschied in der katalytischen Effizienz hat wahrscheinlich keine Bedeutung für die Reduktion von Substraten des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems. Im Gegenzug ließ sich für die einzig in Kaukasiern vorkommende mARC-Variante A165T kein Unterschied in der katalytischen Effizienz gegenüber dem Wildtypprotein aufzeigen, d.h. das Tragen dieser Variante hat vermutlich keinen Einfluss auf das Vermögen, *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren.

Bringt man mehr als zwei Mutationen – in der ausgewählten Reihenfolge (Kapitel 3.3.1.) - in *MARC1* ein, so sinkt die katalytische Effizienz des *N*-reduktiven Enzymsystems auf unter 20% ab. Gäbe es Träger dieser mARC-1 3-fach-, 4-fach-, 5-fach- und 6-fach-Variante, so wäre das Ausmaß in der Verminderung der katalytischen Effizienz ein bedeutungsvolles Ergebnis für die Reduktion von Benzamidoxim, des Modellsubstrates der Amidoxim-Prodrugs. Auf Grund der aktuellen Frequenzdaten scheint das tatsächliche Vorkommen solcher Träger aber ausgeschlossen zu sein. Darüber hinaus ist auch noch nicht geklärt, ob mARC-2 eine solche mARC-1-bedingte interindividuelle Variabilität in der *N*-Reduktion gegebenenfalls kompensieren könnte.

Gleichzeitig kann die fehlende *N*-reduktive Aktivität der mARC-1 6-fach-Variante trotz Bindung des Molybdäncofactors ein erster Hinweis darauf sein, dass diese sechs Positionen entscheidend für die Substratbindung in mARC-1 sind.

Die zu Beginn der Arbeiten gültige Datenbankversion dbSNP *build* 132 beschrieb für *CYB5B* vier nichtsynonyme SNPs (c.5C>T, c.41A>G, c.46A>G und c.64A>G), die in dem offenen Leseraster des C-trunkierten, rekombinanten Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B lagen. Die vier Varianten S2F, D14G, K16E und T22A und ihre Wildtypen wurden rekombinant hergestellt. In der aktuell gültigen Datenbankversion dbSNP *build* 137 sind sieben nichtsynonyme SNPs angegeben, aber nur einer mit Frequenzdaten: der SNP c.193G>C, der zur Proteinvariante V65L führt, zeigt für das C-Allel eine

Frequenz von 0,1%. Diese Frequenz ist auch auf dem *Exome Variant Server* veröffentlicht. Bei der Untersuchung von 8238 Allelen wurden 9 variante Allele detektiert, womit dieser SNP den zum Aminosäureaustausch führenden SNP mit der höchsten Frequenz für das variante Allel darstellt.

Für die T22A-Variante des Cytochrom  $b_5$  Typ B ist eine Kristallstruktur in der Datenbank LS-SNP/PDB veröffentlicht und näher beschrieben (<http://ls-snp.icm.jhu.edu/ls-snp-pdb/>). Der Aminosäureaustausch in dieser Variante befindet sich in einem sogenannten „coil“ des Cytochrom  $b_5$  Typ B. 84% der Oberfläche der Aminosäure in Position 22 sind dem Lösungsmittel zugewandt. Sind mehr als 36% der Oberfläche einer Aminosäure dem Lösungsmittel zugewandt und wird diese Aminosäure dann ausgetauscht, so kann dieses einen Effekt auf das Vermögen des Proteins, mit anderen Molekülen in Wechselwirkung treten zu können, haben (<http://ls-snp.icm.jhu.edu/ls-snp-pdb/>). *In vitro* zeigten diese und die anderen drei untersuchten Proteinvarianten des Cytochrom  $b_5$  Typ B keine Änderung der Aktivität des *N*-reduktiven Enzymsystems. Eine weitere Genotypisierung der zugrunde liegenden SNPs ist demzufolge auch nicht sinnvoll, da sie weder die Aktivität des *N*-reduktiven Enzymsystems beeinflussen noch vermutlich Frequenzdaten zeigen würden, die man an einer Kohorte von 340 Kaukasiern bestätigen könnte.

Für *CYB5R3* sind in der Datenbank dbSNP *build* 137 insgesamt 31 zum Aminosäureaustausch führende SNPs beschrieben. Für keinen dieser SNPs sind homozygote Varianten detektiert worden. Untersuchungen im Zweikomponentensystem mit Cytochrom  $b_5$  Typ A und Sulfamethoxazolhydroxylamin als Substrat konnten die *in silico* Vorhersagen zur Funktion der R59H-Variante *in vitro* nicht bestätigen. Es war keine signifikante Veränderung der Aktivität nachweisbar (Sacco, Trepanier 2010). Die Varianten A158T und V300I (Rhoads *et al.* 2011) sowie R297H (Sacco *et al.* 2012) zeigten wie vorhergesagt keine signifikanten Veränderungen in der Aktivität.



### 4.6. ZUSAMMENFASSUNG

Die drei Komponenten des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems wurden auf den Einfluss vererbbarer Proteinvarianten hin untersucht.

Zunächst wurde mittels Datenbankrecherche (dbSNP) ermittelt, welche zum Aminosäureaustausch führenden SNPs im Menschen beschrieben sind.

Die ausgewählten genetischen Varianten der mARC- und Cytochrom  $b_5$  Typ B-Proteine ließen sich alle in *E. coli* exprimieren und wurden *in vitro* funktionell am Modellsubstrat Benzamidoxim charakterisiert.

mARC-1 zeigte im Vergleich zu mARC-2 die höhere katalytische Effizienz für das Substrat Benzamidoxim. Die mARC-2-Proteinvarianten G244S und C245 zeigten eine gegenüber ihrem Wildtyp signifikant verminderte katalytische Effizienz. Da aber keine homozygoten Träger des jeweiligen für diese Proteinvarianten codierenden Genotyps in der untersuchten Kohorte Kaukasier nachgewiesen werden konnten, ist die physiologische Bedeutung als gering einzuschätzen. Die mARC-1-Proteinvariante A165T, die zu 7,1% in den Kaukasiern vorkommt, zeigte keine signifikanten Veränderungen in ihrer katalytischen Effizienz. Die Untersuchung der mARC-Mehrfachvarianten hat gezeigt, dass das Protein bereits auf mehr als zwei ausgetauschte Aminosäuren empfindlich reagiert. Die Werte für die spezifische Aktivität,  $V_{\max}$  und die katalytische Effizienz brachen ein. Dies könnte auf eine gemeinsame Beteiligung dieser Aminosäuren an der Substratbindung hindeuten. Die Cytochrom  $b_5$  Typ B-Varianten verhielten sich in den *in vitro* Ergebnissen unauffällig. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Varianten der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase aus den Daten bereits veröffentlichter Arbeiten zum Zweikomponentensystem.

Unter den derzeit *in vitro* untersuchten Proteinvarianten des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems befindet sich keine, die bei Europäern vorkommt und eine signifikant veränderte *N*-reduktive Aktivität aufweist. Diese ersten Untersuchungen wurden mit den trunkierten, löslichen Proteinen durchgeführt. *In vivo* sind die drei Proteine membranständig, d.h. es lassen sich in dem *in vitro*-Modell keine Effekte messen, die durch die Anordnung der membranverankerten Proteine zueinander, die allerdings noch nicht aufgeklärt ist, entstehen könnten.

## 5. UNTERSUCHUNGEN AM SUBSTRAT SULFAMETHOXAZOLHYDROXYLAMIN

### 5.1. EINLEITUNG

#### 5.1.1. Der Arzneistoff Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol wurde 1968 in der fixen Kombination mit Trimethoprim als Cotrimoxazol als Fertigarzneimittel zugelassen (Ho und Juurlink 2011).

Die pharmakologischen Eigenschaften werden in der Fachinformation zu Eusaprim<sup>®</sup> (Stand: April 2012) wie folgt zusammengefasst: Cotrimoxazol ist ein Antibiotikum, das seine Aktivität über die Hemmung zweier Reaktionsschritte der bakteriellen Biosynthese von Tetrahydrofolsäure entfaltet. Sulfamethoxazol ist ein kompetitiver Hemmstoff der Dihydropteroatsynthase, die für den Einbau von p-Aminobenzoessäure in Dihydropteroinsäure verantwortlich ist. Trimethoprim ist ein kompetitiver Inhibitor der mikrobiellen Dihydrofolat-Reduktase, die Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat reduziert. Es wird die Synthese von Tetrahydrofolsäure unterbunden und somit können die zum Aufbau von Thymin und Purinen benötigten C<sub>1</sub>-Verbindungen (Methyl- und Formylgruppen) nicht bereitgestellt werden. Durch Kombination der beiden Wirkstoffe erzielt man eine synergistische Wirkung (Bushby und Hitchings 1968). Ein Verhältnis von 1 Teil Trimethoprim zu 19 Teilen Sulfamethoxazol ist für die Wirkungssteigerung optimal. Dies wird durch orale Gabe der Wirkstoffe im Verhältnis 1 zu 5 erreicht. Nach oraler Gabe wird Sulfamethoxazol rasch und vollständig im oberen Magen-Darm-Trakt resorbiert. Die Plasmaproteinbindung beträgt für Sulfamethoxazol ca. 65%. Maximale Plasmaspiegel werden nach zwei bis vier Stunden erreicht. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber. Der Metabolisierungsgrad beträgt ca. 80%. Nur 15-20% des Sulfamethoxazols werden in unveränderter aktiver Form ausgeschieden. Hauptmetabolit ist das N<sub>4</sub>-Acetyl-Sulfamethoxazol mit einem Anteil von 61%, gefolgt von dem N<sub>1</sub>-Glukuronid mit einem Anteil von 15%. Die

Elimination erfolgt hauptsächlich renal. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 8 bis 11 Stunden.

*In vivo* wird Sulfamethoxazol über die *N*-Acetyltransferasen (NAT) am *N*<sub>4</sub> acetyliert, über Uridindiphosphatglucuronosyltransferase (UDPGT) am *N*<sub>1</sub> glucuronidiert, über P450 am C<sub>5</sub> hydroxyliert sowie über P450 am *N*<sub>4</sub> hydroxyliert (Abb. 5.1).

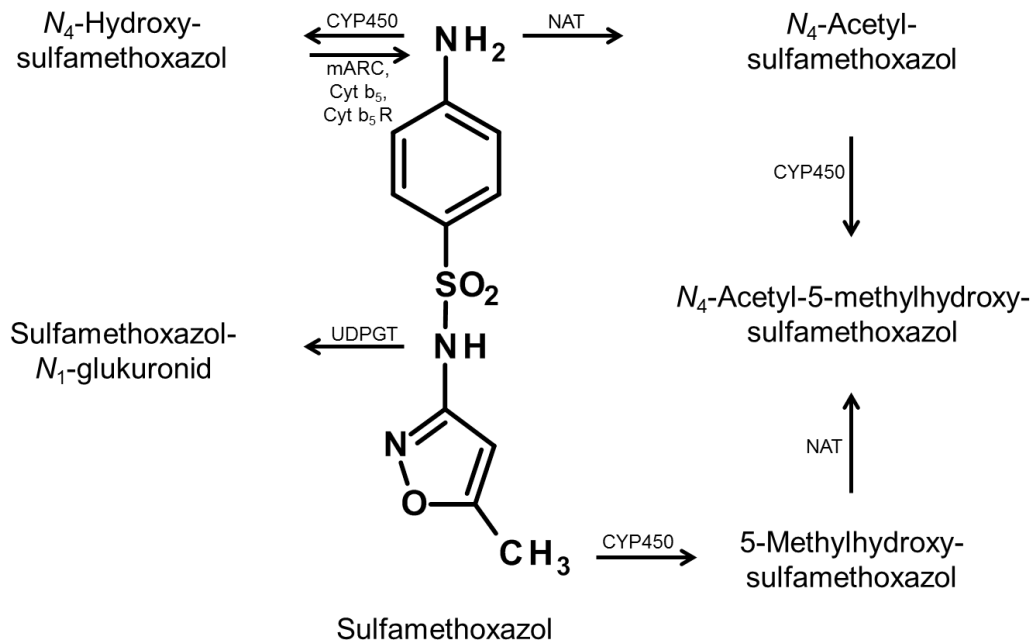


Abb. 5.1: Sulfamethoxazol-Metabolismus und die daran beteiligten Enzyme nach van der Ven *et al.*, 1995 sowie Kennzeichnung der Reaktion, die potentiell vom mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystem vermittelt werden könnte (NAT = *N*-Acetyltransferase, UDPGT = Uridindiphosphatglucuronosyltransferase)

1992 haben Cribb und Spielberg Sulfamethoxazolhydroxylamin erstmals im menschlichen Urin nachgewiesen. Die einmalige Gabe von 1000 mg Sulfamethoxazol führte zu einer Wiederfindung von  $3,1 \pm 0,7\%$  Sulfamethoxazolhydroxylamin im 24-Stunden-Sammelurin (Cribb und Spielberg 1992).

1994 untersuchten van der Ven *et al.* die Bildung und Elimination dieses Metaboliten genauer. Nach einmaliger Gabe von 800 mg Sulfamethoxazol an sechs gesunden Probanden wurde für Sulfamethoxazolhydroxylamin eine Halbwertszeit von  $11,2 \pm 1,2$  Stunden, eine mittlere Verweildauer nach Gabe des Arzneistoffs von  $5,5 \pm 1,5$  Stunden, eine renale Clearance von  $4,39 \pm 0,91$  l / h und eine Wiederfindung von  $2,4 \pm 0,8\%$  der Dosis im Urin ermittelt. Drei der Probanden waren langsame Acetylierer. Bei ihnen konnte kein Anstieg der Hydroxylaminbildung

nachgewiesen werden (van der Ven *et al.* 1994). Eine Untersuchung HIV-seropositiver Patienten ergab, dass bei diesen Patienten die Wiederfindung nur des Hydroxylaminmetaboliten im Urin signifikant erniedrigt war:  $0,05 \pm 0,51$  versus  $2,23 \pm 0,85\%$ ,  $p = 0,0006$ . Diese Daten wurden dahingehend interpretiert, dass seropositive HIV-Patienten das Hydroxylamin schneller weiter metabolisierten und dadurch vermehrt unerwünschte Arzneimittelwirkungen zeigten (van der Ven *et al.* 1995).

Eine Studie zur detaillierteren Aufklärung des Metabolismus zeigte, dass nach einmaliger oraler Gabe von 800 mg Sulfamethoxazol im Urin eines gesunden Probanden 79,3 % der Dosis wiedergefunden wurden. Dabei handelte es sich bei 15,3% der Dosis um unverändertes Sulfamethoxazol, bei 3,4% um 5-Methylhydroxysulfamethoxazol, bei 45,5% um  $N_4$ -Acetyl-sulfamethoxazol, bei 0,9% um  $N_4$ -Hydroxysulfamethoxazol, bei 5,8% um  $N_4$ -Acetyl-5-methylhydroxysulfamethoxazol und bei 8,4% um Sulfamethoxazol- $N_1$ -Glukuronid (Vree *et al.* 1994).

Die enzymatische Bildung des Hydroxylamins ist aufgeklärt. Bereits 1995 wurde postuliert, dass die  $N$ -Hydroxylierung des Sulfamethoxazols über Mitglieder der CYP2C-Subfamilie erfolgt. Cytochrom P450 2C6 wurde als das wahrscheinlichste betrachtet (Cribb *et al.* 1995).

Die gleichzeitige Gabe des Cytochrom P450 2C9-Inhibitoren Fluconazol hemmt sowohl die  $N$ -Hydroxylierung als auch die 5-Hydroxylierung des Sulfamethoxazols. Dies führte *in vivo* zu einer signifikanten Inhibierung der Hydroxylaminbildung. Die Wiederfindung im Urin wurde um  $50,0 \pm 15,1\%$  ( $1,6 \pm 0,5\%$  versus  $0,8 \pm 0,2\%$ ,  $p < 0,0001$ ) gesenkt. Darüber hinaus waren die Bildung von  $N_4$ -Acetyl-5-methylhydroxysulfamethoxazol und 5-Methylhydroxysulfamethoxazol signifikant erniedrigt (Gill *et al.* 1996). Während die gleichzeitige Gabe von Sulfamethoxazol und Fluconazol die AUC des Hydroxylaminmetaboliten erniedrigte, erhöhte andererseits die gleichzeitige Gabe von Sulfamethoxazol und dem Antibiotikum Rifabutin die AUC des Hydroxylaminmetaboliten bei HIV-Patienten und könnte somit das Auftreten von Nebenwirkungen erhöhen (Winter *et al.* 2004).

### 5.1.2. Wirkungen von Sulfamethoxazol auf die Schilddrüse

Die Fachinformation Cotrimoxazol-haltiger Arzneimittel (Fachinformation Eusaprim® 2012) weist unter „Gegenanzeigen“ (4.3), bei denen das Arzneimittel nicht angewendet werden sollte, unter anderen auf Schilddrüsenfunktionstörungen hin. Des Weiteren wird unter „Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung und

Warnhinweise“ (4.4) darauf hingewiesen, dass die Anwendung von Cotrimoxazol bei Funktionsstörungen der Schilddrüse einer konsequenten ärztlichen Überwachung bedarf. Unter den „Präklinischen Daten zur Sicherheit“ (5.3) ist in dem Abschnitt zur „Chronischen Toxizität / Subchronische Toxizität“ beschrieben, dass junge Ratten, die über 90 Tage 258 mg Sulfamethoxazol und 129 mg Trimethoprim pro kg Körpergewicht und pro *die* erhielten, histologisch eine verstärkte Mikrofollikelbildung in der Schilddrüse zeigten. Die Dosis entsprach etwa dem 15fachen einer Tagesdosis beim Menschen. In dem Abschnitt „Mutagenes und tumorerzeugendes Potential“ wird zu Sulfamethoxazol ausgeführt, dass es bei Ratten Schilddrüsenkarzinome erzeugen kann. Dieses wird aber relativiert mit der Aussage, dass es speziesspezifisch zu sein scheint und beim Menschen wohl kaum von klinischer Bedeutung sei.

Studien zeigten, dass Sulfonamide Wirkungen auf die Schilddrüse von Ratten, Mäusen und Hunden haben, während bei Affen und Menschen fast keine Veränderungen zu beobachten waren (Capen 1994). In zwei doppelblinden crossover Studien am Menschen konnte zuvor gezeigt werden, dass nach einer 10tägigen Gabe von Cotrimoxazol die peripheren T3- und T4-Konzentrationen bei Männern um etwa 15% und bei Frauen um etwa 5% sanken. Absolut gesehen lagen die Werte weiterhin im Normbereich. Die TSH-Spiegel stiegen nicht an. Das heißt, eine 10tägige Behandlung führte beim Menschen nicht zu einer Hypothyreose (Cohen *et al.* 1980).

### **5.1.3. Hypersensitivitätsreaktionen durch Sulfamethoxazol**

Cotrimoxazol wird zur Therapie von Infektionen, die durch Cotrimoxazol-empfindliche Infektionserreger verursacht werden und einer oralen Therapie zugänglich sind, angewendet (Fachinformation Eusaprim® 2012). Bei der Therapie und Prophylaxe einer *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie (PCP) wird die 5fache Standarddosis verabreicht. Es treten deutlich häufiger schwere Überempfindlichkeitsreaktionen auf, verbunden mit Hautausschlag, Fieber, Neutropenie, Thrombopenie, erhöhten Leberenzymwerten, Hyperkaliämie und Rhabdomyolyse (Fachinformation Eusaprim® 2012). Es handelt sich dabei um idiosynkratische, verzögert, d.h. frühestens nach fünf Tagen, auftretende Überempfindlichkeitsreaktionen. In besonders schweren Fällen führen sie zum Stevens-Johnson-Syndrom (SJS) oder zur toxisch epidermalen Nekrolyse (TEN). Diese Nebenwirkungen traten in einer Kohorte kanadischer HIV-

Patienten, die neben Cotrimoxazol noch Nevirapin, Stavudin und Clarithromycin einnahmen, mit einer Inzidenz von 1-2 Fällen pro 1000 Patienten auf (Mittmann *et al.* 2012). SJS bzw. TEN weisen Sterblichkeitsraten von 1-5% bzw. 25-35% auf (Harr und French 2012).

Die Pathogenese der Hypersensitivitätsreaktion wurde detailliert untersucht (Abb. 5.2). Sulfamethoxazol wird in der Leber durch Cytocrom P450 2C9 zum Hydroxylamin metabolisiert (Cribb *et al.* 1995), welches dann über ein intermediär gebildetes Nitroxid-Radikal zum Nitrososulfamethoxazol autoxydiert. Dabei werden Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) frei (Cribb *et al.* 1991). Nitrososulfamethoxazol kann Azo- und Azoxydimere bilden (Naisbitt 2002) oder auch in Gegenwart von Glutathion und Ascorbinsäure wieder zum Hydroxylamin reduziert werden. Es entsteht ein Redoxzyklus (Lavergne *et al.* 2006). Andererseits kann Glutathion auch mit dem Nitrosometaboliten ein Semimercaptal bilden, das spontan zum stabileren Sulfinamid isomerisiert. Dieses kann wiederum thiolytisch zum Hydroxylamin gespalten werden (Cribb *et al.* 1991). Es gibt Ansätze, die Struktur des für die Hypersensitivitätsreaktion verantwortlichen Antigens zu klären (Callan *et al.* 2009; Lo Bello *et al.* 1993; Cheng *et al.* 2008). Das ultimative Antigen ist aber noch nicht gefunden (Stachulski *et al.* 2012). Bislang bleiben die beiden Möglichkeiten offen, ob die Hypersensitivitätsreaktion durch ein Hapten oder den Arzneistoff selbst hervorgerufen wird.

Nach dem *P-I* Konzept (*pharmacological interaction with immune receptors*) stellt der Arzneistoff direkt eine Wechselwirkung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Molekül her, die stark genug ist, um eine Immunantwort auszulösen (Pichler *et al.* 2006).

Nach der „*Danger*“-Hypothese erfordert die effektive Aktivierung des adaptiven Immunsystems zwei Signale: (1) die T-Zell-Rezeptor vermittelte Erkennung eines durch ein MHC-Molekül präsentierten Antigens und (2) die Interaktion zwischen verschiedenen kostimulatorischen Liganden und Rezeptoren, z.B. CD28:CD86 und CD40:CD154, zwischen der T- und der antigenpräsentierenden Zelle (Naisbitt *et al.* 2000). Das erste Signal allein reicht nur für die Entwicklung einer Toleranz aus (Appleman und Boussiotis 2003). Sogenannte „*Danger*“-Signale, wie Zellzerstörung oder Infektion, agieren über den Weg des zweiten Signals, indem sie kostimulatorische Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen hochregulieren (Sanderson *et al.* 2006).

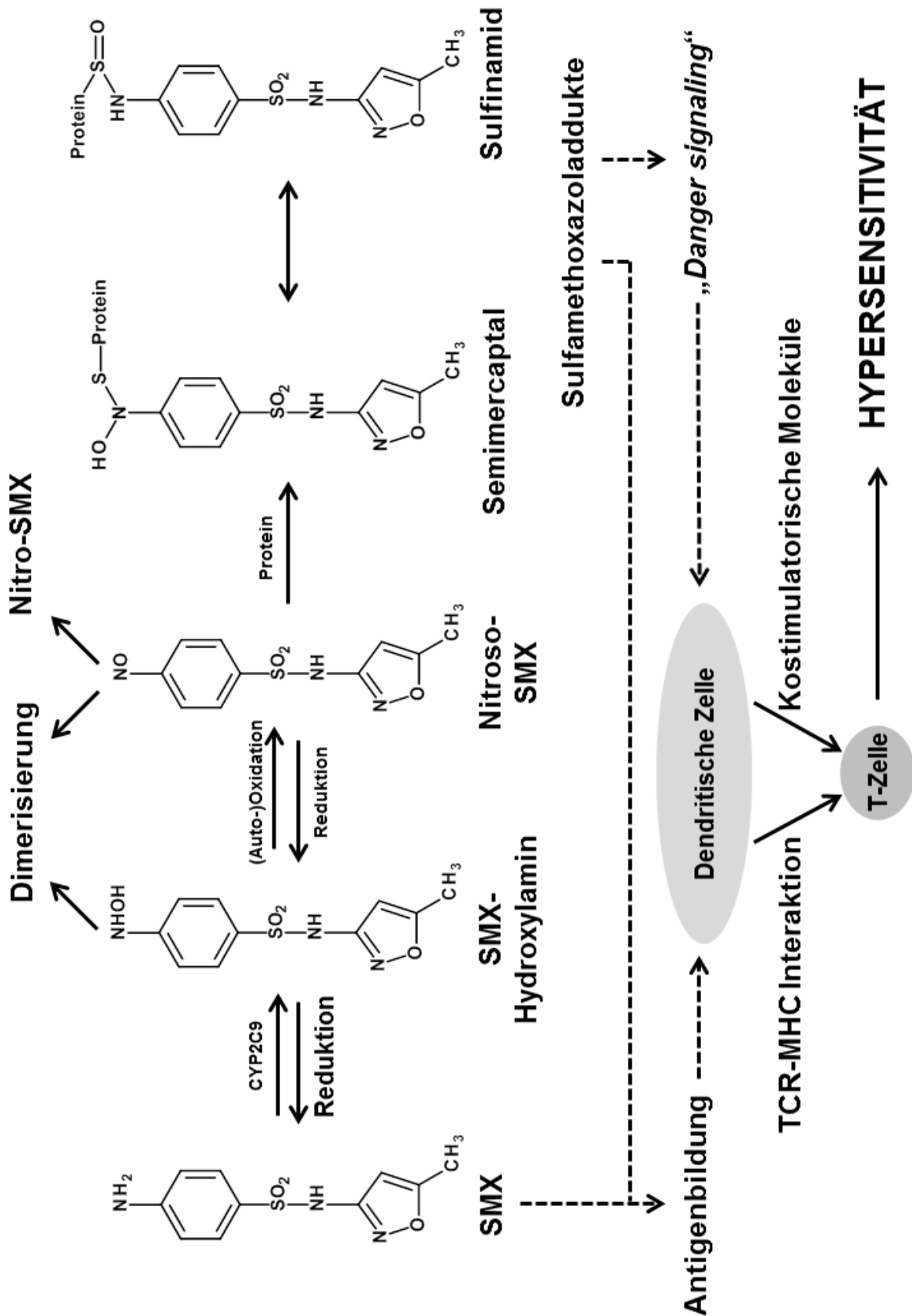


Abb. 5.2: Pathogenese der Hypersensitivität nach Sanderson *et al.*, 2006 (SMX = Sulfamethoxazol, TCR = T-Zell-Rezeptor)

Ein Ansatz, die interindividuellen Unterschiede im Auftreten der Hypersensitivitätsreaktion zu erklären, ist die Betrachtung der organ- bzw. gewebespezifischen metabolischen Aktivierung des Arzneistoffs. Die Leber stellt das wichtigste Organ für den Arzneistoffmetabolismus dar. Reaktive Metabolite, die dort entstehen, überleben auf Grund ihrer Reaktivität meist nicht lange in der Zirkulation. Die Leber selbst ist hohen Konzentrationen an reaktiven Metaboliten ausgesetzt und schützt sich u.a. durch entsprechend hohe Glutathionspiegel. Sie ist selten das Ziel antigenspezifischer T-Zellen. Da Nitrososulfamethoxazol sehr instabil ist und schnell mit Proteinen zum Antigen reagiert, liegt es Nahe, dass diese Giftung lokal erfolgt, z.B. in Zellen der Haut oder des Immunsystems (Sanderson *et al.* 2006). Keratinozyten sind metabolisch aktiv (Yengi *et al.* 2003) genauso wie dendritische Zellen. Der Metabolismus von Sulfamethoxazol in Immunzellen ist nachgewiesen (Elsheikh *et al.* 2010; Lavergne *et al.* 2009).

Frühere Studien in unterschiedlichen Populationen konnten keinen Zusammenhang zwischen der Entstehung des Hydroxylamin- bzw. Nitrosometaboliten und *NAT2*, *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *GSTM1*, *GSTT1* sowie *GSTP1* aufzeigen (Alfirevic *et al.* 2003; Delomenie *et al.* 1994; Pirmohamed *et al.* 2000). Mittlerweile ist ein Zusammenhang zu den beiden *NAT1*-Allelen \*10 und \*11 hergestellt. Diese beiden Allele steigern die *NAT1*-Proteinexpression und damit auch die Enzymaktivität. Daraus ergibt sich der Status eines schnellen *NAT1*-Metabolisierers, der vor der Hypersensitivitätsreaktion zu schützen scheint (Wang *et al.* 2011). Darüberhinaus wurde bei HIV / AIDS-Patienten ein Polymorphismus in der katalytischen Untereinheit der Glutamat Cystein Ligase (*glutamate cysteine ligase catalytic subunit*, *GCLC*) gefunden, der über eine verminderte mRNA-Expression zur Hypersensitivität führt (Wang *et al.* 2012). Die Untersuchung von Patienten auf Polymorphismen in den *NAT2*-, *CYB5A*- und *CYB5R3*-Genen konnte keine Assoziation zur Überempfindlichkeitsreaktion herstellen (Sacco *et al.* 2012).

### 5.2. ZIELSETZUNG

Sulfamethoxazolhydroxylamin stellt ein potentielles Substrat des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems dar. Bislang ist noch nicht gezeigt worden, dass die Reduktion in mitochondrialen, porcinen Fraktionen angereichert ist. Ziel ist es,



zunächst die Beteiligung des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems an der Reduktion *in vitro* zu zeigen. Dies soll an den subzellulären Fraktionen zweier porciner Organe erfolgen, die eine hohe *N*-reduktive Aktivität zeigen,; die Leber, die den Hauptort des Metabolismus darstellt, und die Schilddrüse, für die Nebenwirkungen in den Fachinformationen Cotrimoxazolhaltiger Arzneimittel aufgeführt werden und die in dieser Spezies bezüglich der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin noch nicht untersucht worden ist.

Wenn eine Beteiligung des Enzymsystems an der Reduktion gegeben ist, sollen die Auswirkungen der SNPs in *MARC1*, *MARC2* und *CYB5B* auf die Reduktion untersucht werden.

### **5.3. METHODEN**

#### **5.3.1. Materialien und Geräte**

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Kapitel 9 der vorliegenden Arbeit aufgeführt. Sulfamethoxazol (Sigma-Aldrich) und Sulfamethoxazolhydroxylamin (Dalton) wurden kommerziell erworben.

#### **5.3.2. Enzymquellen**

Die verwendeten Enzymquellen und deren Charakterisierung wurden in Kapitel 3 dieser Arbeit beschrieben. Die Untersuchungen wurden mit porcinen subzellulären Fraktionen und mit dem humanen rekombinanten Dreikomponentensystem durchgeführt.

#### **5.3.3. *In vitro* Biotransformation von Sulfamethoxazolhydroxylamin zu Sulfamethoxazol**

##### **5.3.3.1. Zusammensetzung der Inkubationsansätze**

Der Inkubationsansatz zur Untersuchung der porcinen subzellulären Fraktionen war folgendermaßen zusammengesetzt: Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad durchgeführt. Der Inkubationsansatz besaß ein Endvolumen von 150 µl und enthielt,

sofern nicht anders angegeben, 0,1 mg der porcinen subzellulären Fraktion und 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0. Nach dreiminütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Das Ansatzvolumen enthielt 6,6% DMSO. Nach 20minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eiskalten Methanols gestoppt, die Ansätze 5 min geschüttelt und 5 min bei 10.000 U / min zentrifugiert. Das Ansatzvolumen enthielt 6,6% DMSO.

Der Inkubationsansatz zur Untersuchung der humanen rekombinanten Enzyme hatte die folgende Zusammensetzung: Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad durchgeführt. Der Inkubationsansatz besaß ein Endvolumen von 150 µl und enthielt, sofern nicht anders angegeben, 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B) und 6 pmol (NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase) sowie 3 mM bzw. 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin in 20 mM MES-Puffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0. Nach dreiminütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Das Ansatzvolumen enthielt 2 bis 6,6% DMSO. Nach 20minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eiskalten Methanols gestoppt, die Ansätze 5 min geschüttelt und 5 min bei 10.000 U / min zentrifugiert.

### 5.3.3.2. HPLC-Analytik

Die Trennung von Sulfamethoxazolhydroxylamin und Sulfamethoxazol erfolgte in Anlehnung an die von Behrens, Amschler und Grünewald beschriebene Methode (Behrens 1999; Amschler 2004; Grünewald 2008).

HPLC Pumpe	Waters 1525 Binary Pump
Detektor	Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector
Autosampler	Waters 717 Plus Autosampler
Integrator	Waters Breeze Chromatography Software Vers. 3.30
Stationäre Phase	Waters Symmetry® C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, Vorsäule Phenomenex Security Guard Cartridge System C18, 4 x 3,0 mm
Mobile Phase	Acetonitril / Aqua bidest. / Eisessig / Triethylamin (30 : 68,5 : 1 : 0,5, v / v / v / v)

## 5 UNTERSUCHUNGEN AM SUBSTRAT SULFAMETHOXAZOLHYDROXYLAMIN

---

Flussrate	0,6 ml / min	
Laufzeit	20 min	
Detektion	254 nm	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeit	Sulfamethoxazolhydroxylamin	9,9 ± 0,3 min
	Sulfamethoxazol	12,3 ± 0,3 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde mit einem Whatman<sup>®</sup> Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Nach der Zugabe von Acetonitril wurde kräftig geschüttelt und 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die Reinheit des Substrats wurde mittels HPLC überprüft (Abb. 8.17, Kapitel 8). Das Substrat Sulfamethoxazolhydroxylamin war zu etwa 99,5% rein und zu etwa 0,5% mit Sulfamethoxazol verunreinigt.

Daher enthielten die einzelnen Inkubationen immer zwei Ansätze ohne Proteinzugabe, die am Anfang und am Ende des HPLC-Laufs vermessen wurden, um die metabolisch entstandene Sulfamethoxazolmenge um die vorhandene Verunreinigung korrigieren zu können.

Die Sulfamethoxazolhydroxylamin-Lösung wurde mit Ascorbinsäure stabilisiert. Dazu wurde das Substrat in einer Lösung aus gleichen Teilen DMSO mit 3 mM Ascorbinsäure und Puffer mit 1 mM Ascorbinsäure gelöst (Sacco und Trepanier 2010). Die Lösung wurde über 15 Stunden bei Raumtemperatur in der HPLC vermessen. Die Peakfläche der Sulfamethoxazolhydroxylamin- und Sulfamethoxazolpeaks war über 15 Stunden konstant, die Substratlösung also stabil (Abb. 8.18, Kapitel 8).

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit Sulfamethoxazol in Fließmittel gelöst und mittels HPLC analysiert. Es wurde der Konzentrationsbereich von 0,5 bis 500 µM kalibriert. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfläche der Sulfamethoxazolpeaks. Die Kalibrierung war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ( $r^2 = 1$ , Abb. 8.19, Kapitel 8). Die Richtigkeit für den untersuchten Bereich von 0,05 bis 500 µM betrug  $100,5 \pm 2,4\%$ , wobei an der Bestimmungsgrenze von 0,05 µM die Richtigkeit 104,6% betrug.

Zur Wiederfindung wurde der Metabolit Sulfamethoxazol in Fließmittel gelöst und über einen Konzentrationsbereich von 10 bis 500 µM einem Inkubationsansatz zugesetzt, der aus 50 µg abgekocheten SLMt # 13.01.10, 2 mM

Sulfamethoxazolhydroxylamin, gelöst in 50% DMSO mit 3 mM Ascorbinsäure und 50% 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 sowie 1 mM NADH (150 µl Ansatzvolumen) bestand. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion mit 150 µl eiskaltem Methanol abgestoppt, die Ansätze 5 min geschüttelt und 5 min bei 10000 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC vermessen. Die Wiederfindung war in dem ermittelten Konzentrationsbereich linear ( $r^2 = 0,9999$ , Abb. 8.19, Kapitel 8). Die Wiederfindungsrate betrug im Bereich von 10 bis 500 µM  $104,3 \pm 12,9\%$ , wobei an der Bestimmungsgrenze von 10 µM die Richtigkeit 80% betrug. Die Auswertung der Proben konnte mittels Kalibrierung erfolgen.

### 5.4. ERGEBNISSE

#### 5.4.1. Untersuchung subzellulärer porciner Fraktionen

##### 5.4.1.1. Sicherstellung geeigneter Inkubationsbedingungen

Die optimale Inkubationszeit für die Inkubationen betrug 20 Minuten. Sowohl für die subzellulären Fraktionen der Schweineleber als auch der -schilddrüse konnte gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von 60 Minuten die Bildung von Sulfamethoxazol proportional zur Inkubationszeit verlief (Abb. 8.20 und 8.21, Kapitel 8).

Das pH-Optimum, bei dem die Inkubationen stattfinden sollten, lag bei pH 6,0. Es wurde im Mehrkomponentenpuffer ermittelt. Dieser bestand zu gleichen Teilen aus 0,05 M MES (pKa 6,02), 0,1 M Tris-Base (pKa 8,00) und 0,05 M Eisessig (Acetat pKa 4,64). Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl eingestellt, die Ionenstärke mit 0,5 M NaCl korrigiert. Es wurden Mikrosomen und Mitochondrien aus der Schweineleber mit Sulfamethoxazolhydroxylamin in einem pH-Bereich von 2 bis 11 inkubiert (Abb. 8.22, Kapitel 8). In einer weiteren Inkubation wurde die Stabilität des Substrats im Bereich von pH 6 bis pH 7,6 im Mehrkomponentenpuffer überprüft (Daten nicht gezeigt). Im Chromatogramm war erkennbar, dass die Peakfläche bis pH 6,2 unverändert war. Das Substrat, gelöst in gleichen Teilen DMSO mit 3 mM Ascorbinsäure und Aqua bidest mit 1 mM Ascorbinsäure, war bis pH 6,2 stabil und für pH 6 wurde das Optimum in der Umsatzrate gezeigt.

Der optimale Puffer für die Inkubation subzellulärer Fraktionen war 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Er wurde mittels Inkubation von Schweinelebermitochondrien bzw. Schweineschilddrüsenmitochondrien mit Sulfamethoxazolhydroxylamin in drei verschiedenen Puffern ermittelt (Abb. 8.23, Kapitel 8).

Der gesättigte Bereich, in dem die Inkubationen stattfinden sollten, wurde sowohl für Schweinelebermitochondrien als auch für Mitochondrien aus der porcinen Schilddrüse bei einer Substratkonzentration von 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin ermittelt. Aus den Substratabhängigkeiten (Abb. 8.24 und 8.25, Kapitel 8) konnte der Beginn des gesättigten Bereichs bei einer Sulfamethoxazolhydroxylaminkonzentration von 5 mM abgelesen werden.

#### 5.4.1.2. Prüfung auf Beteiligung des *N*-reduktiven Enzymsystems an der Reduktion

Die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin zeigte mit NADH eine deutlich höhere spezifische Aktivität als mit NADPH. Dies wurde anhand von Inkubationen subzellulärer Fraktionen der Schweineleber (Abb. 5.3) und der Schweineschilddrüse (Abb. 5.4) mit den beiden Cosubstraten gezeigt.

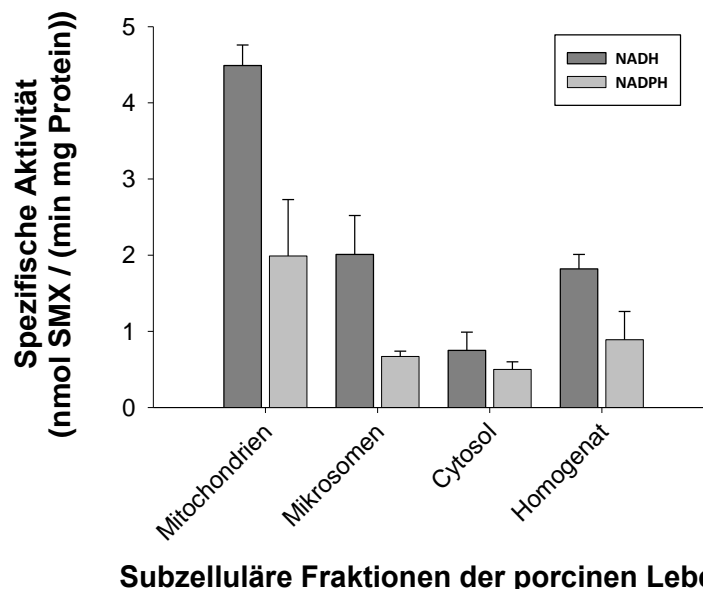
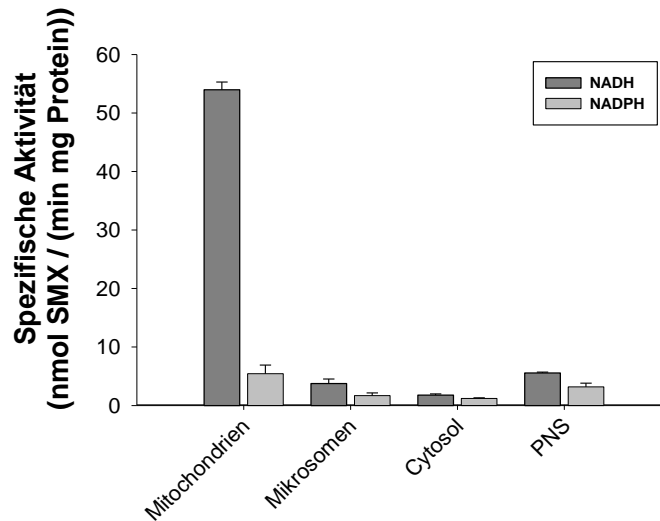


Abb. 5.3: NADH versus NADPH am Beispiel der subzellulären Fraktionen der porcinen Leber

Die Inkubationsansätze bestanden aus 100 µg SLHom, 100 µg SLCyt, 100 µg SLMs bzw. 25 µg SLMt, 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH bzw. NADPH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 3,3% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20

## 5 UNTERSUCHUNGEN AM SUBSTRAT SULFAMETHOXAZOLHYDROXYLAMIN

Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.



**Subzelluläre Fraktionen der porcinen Schilddrüse**

Abb. 5.4: NADH versus NADPH am Beispiel der subzellulären Fraktionen der porcinen Schilddrüse  
Die Inkubationsansätze bestanden aus 100  $\mu$ g SThyPNS, 200  $\mu$ g SThyCyt, 100  $\mu$ g SThyMs bzw. 10  $\mu$ g SThyMt, 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu$ l, enthielt 3,3% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Die Aktivität war in den mitochondrialen Subfraktionen angereichert. Dies wurde sowohl für das Substrat Benzamidoxim als auch für Sulfamethoxazolhydroxylamin gezeigt (Abb. 5.5). Die Inkubationsbedingungen waren dahingehend vereinheitlicht, dass jeder Inkubationsansatz 6,6% DMSO enthielt.

In der mitochondrialen Fraktion der Schweineleber war die Aktivität gegenüber dem Homogenat etwa um den Faktor 3,5 in der Reduktion von Benzamidoxim und etwa um den Faktor 2 in der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin angereichert. In der mitochondrialen Fraktion der Schweineschilddrüse betrug der Faktor der Anreicherung gegenüber dem PNS ca. 200 für die Reduktion Benzamidoxim und ca. 40 für die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin.

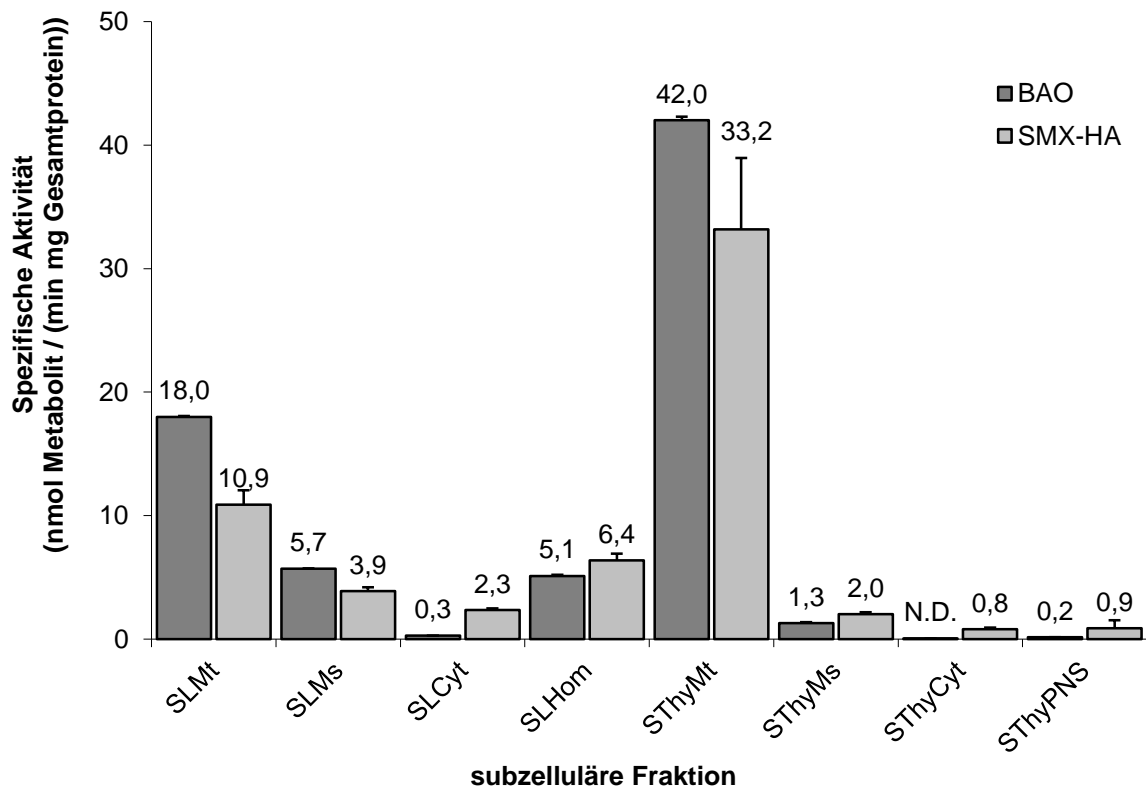


Abb. 5.5: Inkubation subzellulärer Fraktionen der Schweineleber und Schilddrüse

Die Inkubationsansätze bestanden aus 100 µg SThyPNS, 200 µg SThyCyt, 100 µg SThyMs bzw. 10 µg SThyMt, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 bzw. 100 µg SLHom, 100 µg SLCyt, 100 µg SLMs bzw. 25 µg SLMt, 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 15 bzw. 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin NADH-abhängig und in den mitochondrialen Subfraktionen der Schweineleber und -schilddrüse angereichert war. Das Dreikomponentensystem bestehend aus mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase war also an der Reduktion dieses Metaboliten beteiligt.

#### 5.4.1.3. Kinetische Parameter

Die Substratabhängigkeiten folgten der Kinetik nach Michaelis-Menten. Es wurden für die Schweineleber- und -schilddrüsenmitochondrien die  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werte der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin und der von Benzamidoxim bestimmt

## 5 UNTERSUCHUNGEN AM SUBSTRAT SULFAMETHOXAZOLHYDROXYLAMIN

und die  $V_{\max} : K_m$  - ratio als Maß für die Affinität berechnet (Tab. 5.1). Dabei wurde der DMSO-Gehalt im Ansatzvolumen konstant gehalten.

Proteinquelle	$V_{\max}$ (nmol Metabolit / (min mg Gesamtprotein))	$K_m$ (mM Substrat)	$V_{\max} : K_m$ ratio ( $\mu\text{l}$ / (min mg))
<b>BAO</b>			
SLMt	$12,5 \pm 1,1$	$0,14 \pm 0,07$	$89 \pm 10$
SThyMt	$47,6 \pm 4,6$	$0,63 \pm 0,23$	$76 \pm 29$
<b>SMX-HA</b>			
SLMt	$38,7 \pm 9,2$	$2,73 \pm 1,37$	$14 \pm 8$
SThyMt	$60,3 \pm 9,9$	$3,56 \pm 1,40$	$17 \pm 7$

Tab. 5.1: Kinetische Parameter der Reduktion von Benzamidoxim und Sulfamthoxazolhydroxylamin durch die mitochondriale Subfraktion der Schweineleber bzw. -schilddrüse

Die Inkubationsansätze bestanden aus 25  $\mu\text{g}$  SLMt bzw. 10  $\mu\text{g}$  SThyMt, 0,1 - 10 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 respektive 25  $\mu\text{g}$  SLMt bzw. 10  $\mu\text{g}$  SThyMt, 0,1 / 0,25 - 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM PBS mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu\text{l}$ , enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 15 respektive 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Die katalytische Effizienz des mitochondrialen Enzymsystems zum Substrat war in den jeweils untersuchten mitochondrialen Subfraktionen etwa gleich groß. Die Substratspezifität gegenüber Benzamidoxim war dagegen deutlich größer als die zu Sulfamethoxazolhydroxylamin.

### 5.4.2. Untersuchung der humanen rekombinant hergestellten mARC-Proteine

#### 5.4.2.1. Sicherstellung geeigneter Inkubationsbedingungen

Als optimale Inkubationszeit für die folgenden Inkubationen im rekombinanten Enzymsystem wurden 20 Minuten gewählt. Für mARC-1 und mARC-2 konnte gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von 30 Minuten die Bildung von Sulfamethoxazol proportional zur Inkubationszeit verlief (Abb. 8.26, Kapitel 8).



Der gesättigte Bereich, in dem die Inkubationen stattfinden sollten, wurde sowohl für mARC-1 als auch für mARC-2 bei einer Substratkonzentration von 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin ermittelt. Aus den Substratabhängigkeiten (Abb. 8.27 und 8.28, Kapitel 8) war der Beginn des gesättigten Bereichs bei einer Sulfamethoxazolhydroxylaminkonzentration von 2 mM ablesbar. Als optimale Substratkonzentration für die folgenden Inkubationen wurde 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin gewählt.

#### 5.4.2.2. Ermittlung der für die Reduktion notwendigen Komponenten

Im Standardinkubationsansatz wurden die Proteinkomponenten unterschiedlich miteinander kombiniert, um die für die Aktivität notwendigen Komponenten zu ermitteln. (Abb. 5.6)

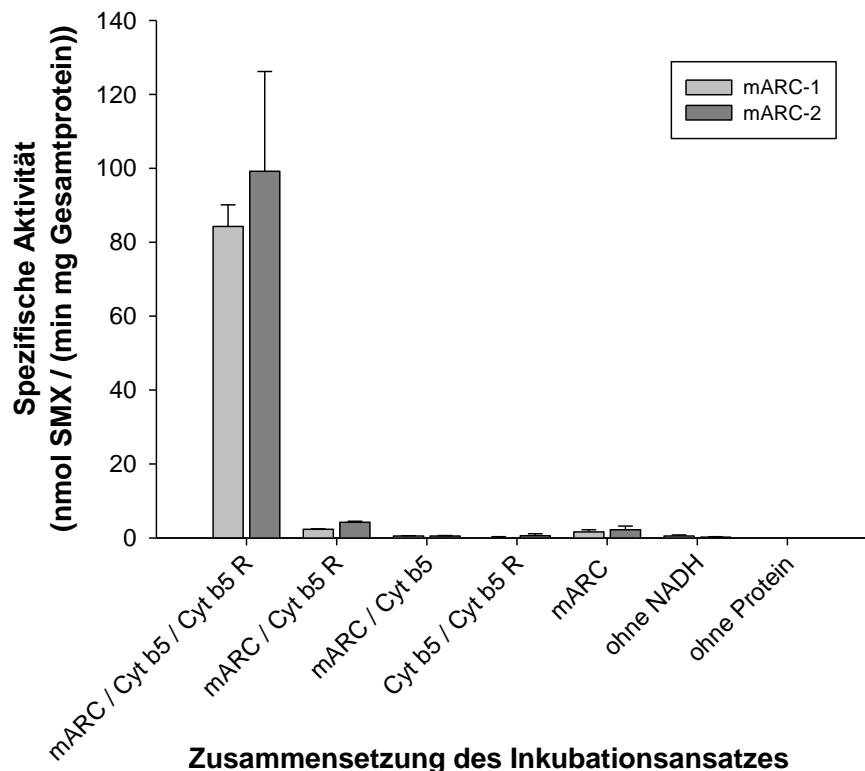


Abb. 5.6: Standardinkubationsansatz eines mARC-1 und eines mARC-2-Wildtypproteins

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10 bzw. mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin nur dann erfolgte, wenn alle drei Komponenten, das sind mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase, im Inkubationsansatz enthalten waren und die Reaktion mit NADH gestartet wurde.

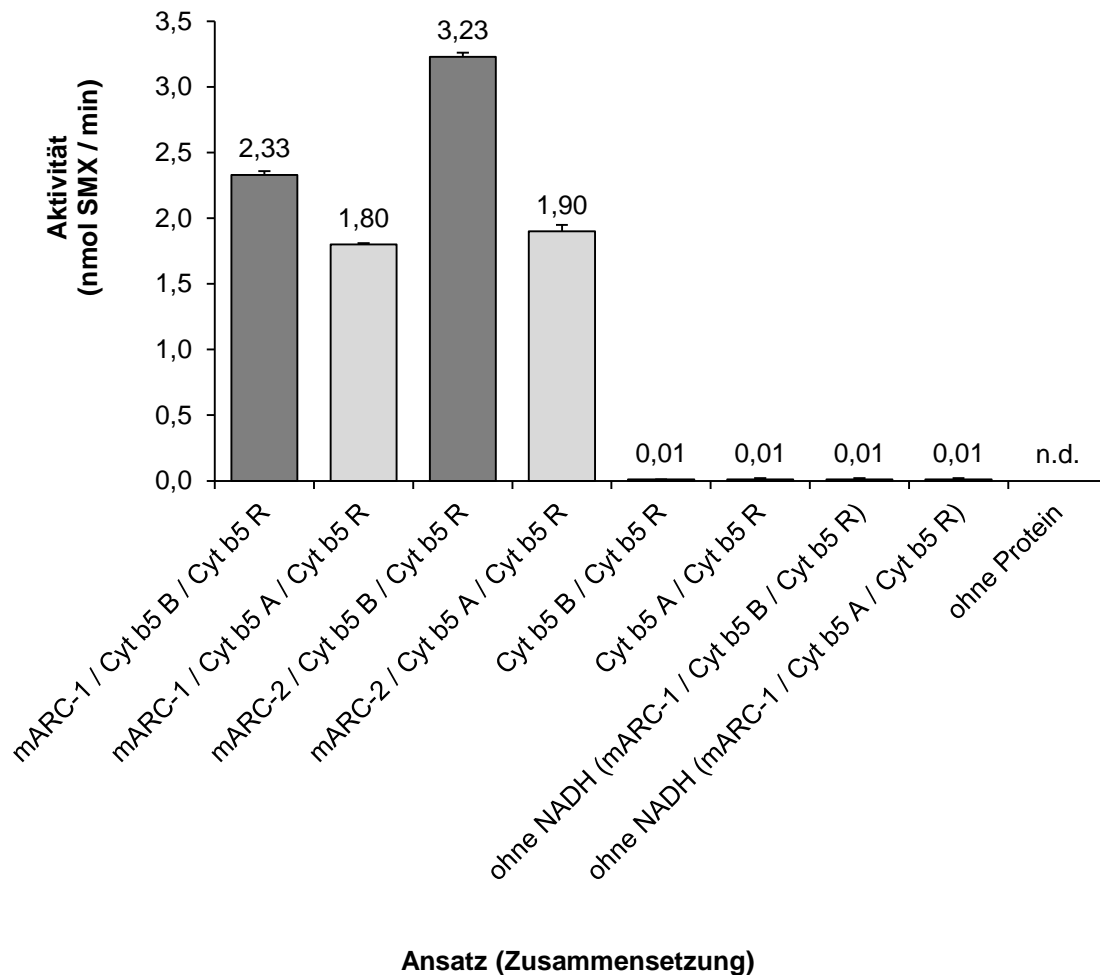


Abb. 5.7: In vitro Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin durch mARC-1 und mARC-2-Wildtyp in Kombination mit Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B und Cytochrom b<sub>5</sub> Typ A

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10 bzw. mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> B # 23.02.11a bzw. Cyt b<sub>5</sub> A # 16.03.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Bislang war in der Literatur nur beschrieben, dass die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin sowie auch die von Benzamidoxim im

Zweikomponentensystem, bestehend aus Cytochrom  $b_5$  Typ A und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, ablaufen sollte (Kurian *et al.* 2004).

*In vitro* zeigten sowohl Cytochrom  $b_5$  Typ B als auch Cytochrom  $b_5$  Typ A im Dreikomponentensystem *N*-reduktive Aktivität, wobei Cytochrom  $b_5$  Typ B die höhere spezifische Aktivität besaß. Im Inkubationsansatz des Zweikomponentensystems war nahezu keine Aktivität nachweisbar (Abb. 5.7).

*In vivo* ist für die Reduktion von Benzamidoxim mittlerweile die Beteiligung von Cytochrom  $b_5$  Typ B durch *knock down* Versuche nachgewiesen (Neve *et al.* 2012, Plitzko *et al. in preparation*).

#### 5.4.2.3. Auswirkungen eines Chargenwechsel der Wildtypproteine

Ein Wechsel der Cytochrom  $b_5$  Typ B-Charge wirkte sich auch am Substrat Sulfamethoxazolhydroxylamin auf die spezifische Aktivität aus (Abb. 5.8). Der Mittelwert der spezifischen Aktivität besaß eine relative Standardabweichung von 55%.

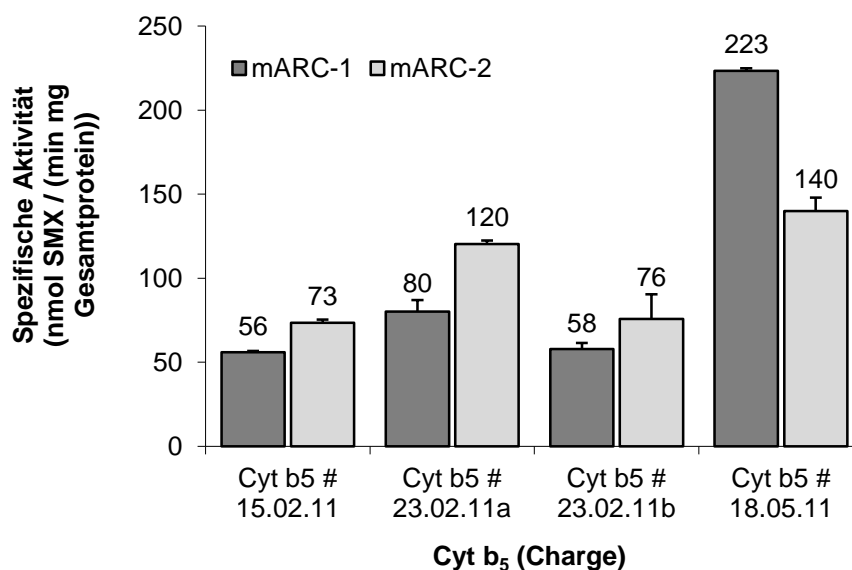


Abb. 5.8 Auswirkungen des Cytochrom  $b_5$ -Chargenwechsels auf die spezifische Aktivität

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 22.02.10 bzw. mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt  $b_5$ ) und 6 pmol FAD (Cyt  $b_5$  R # 27.01.10), 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu$ l, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Die Berechnung der Aktivität unabhängig vom Gesamtproteingehalt in „nmol BA / min“ ergab ebenfalls Unterschiede zwischen den Chargen (Abb. 5.9). Die relative Standardabweichung des Mittelwerts der spezifischen Aktivität war aber geringer und betrug 25%.

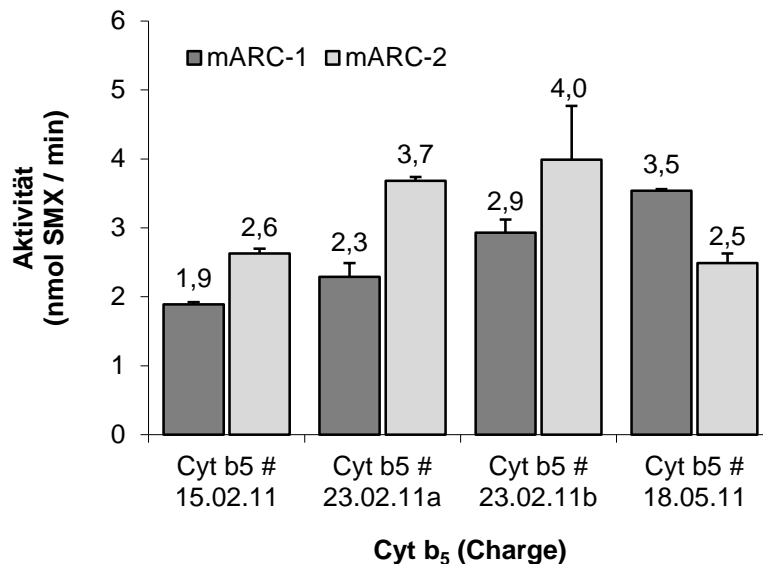


Abb. 5.9: Auswirkungen des Cytochrom b<sub>5</sub>-Chargenwechsels auf die Umsetzungsrate

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 22.02.10 bzw. mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub>) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Auch bei diesem Substrat war eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben, wenn man zur Ermittlung der spezifischen Aktivität Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen mit ähnlichem Hämgehalt benutzte. Ein Vergleich der Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen untereinander konnte über die proteinunabhängige Umsetzungsrate in „nmol BA /min“ erfolgen.

Alternativ könnte der Quotient aus der Aktivität der Variante und der des Wildtypen gebildet werden, man erhielt einen relativ konstanten Wert, der unabhängig von der eingesetzten Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Charge war (Abb. 5.10 und 5.11, Werte in Tab. 8.6, Kapitel 8). Die relative Standardabweichung des Mittelwerts betrug 6% für den Vergleich der mARC-1-Variante A165T mit dem Wildtypprotein und 13% für den Vergleich der mARC-2-Variante C245W mit dem Wildtypprotein.

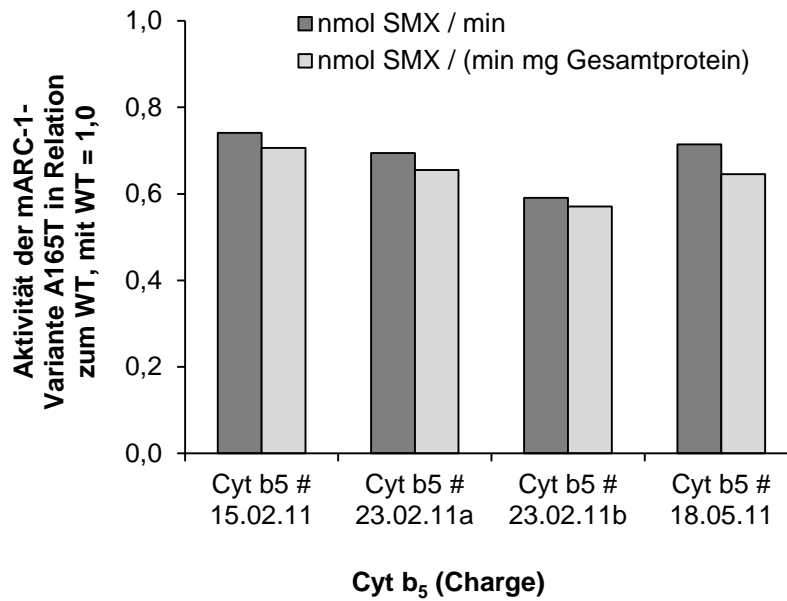


Abb. 5.10 Aktivität der mARC-1-Variante A165T in Relation zum Wildtypen mit vier verschiedenen Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen

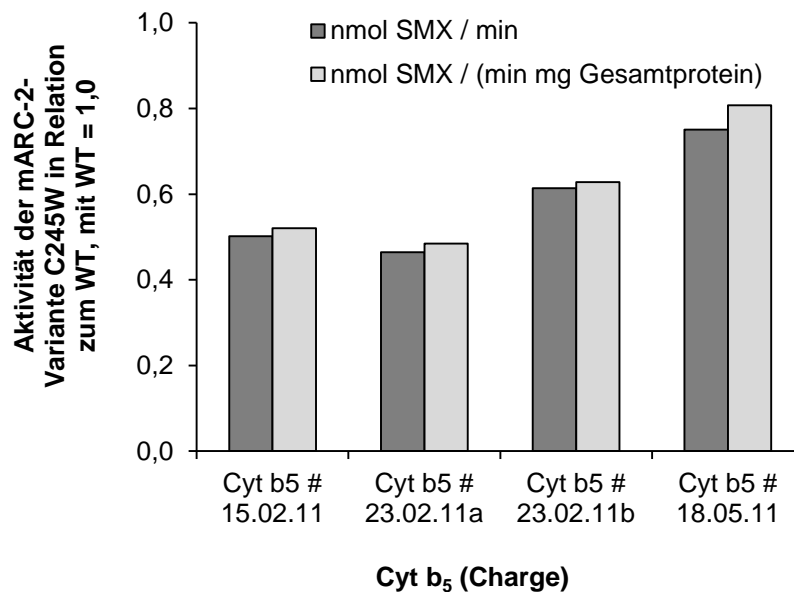


Abb. 5.11: Aktivität der mARC-2-Variante C245W in Relation zum Wildtypen mit vier verschiedenen Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen

Darüber hinaus machte es keinen Unterschied, in welcher Einheit die Aktivität angegeben wird.

#### 5.4.2.4. Einfluss von Zusätzen zum Inkubationsansatz auf die Aktivität

Um Sulfamethoxazolhydroxylamin in Lösung zu bringen, benötigte man DMSO. Dies könnte die Aktivität der Proteine beeinflussen (Tjernberg *et al.* 2006).

Dem Inkubationsansatz wurde DMSO hinzugefügt und die spezifische Aktivität bei DMSO-Konzentrationen von 2 bis 10% ermittelt.

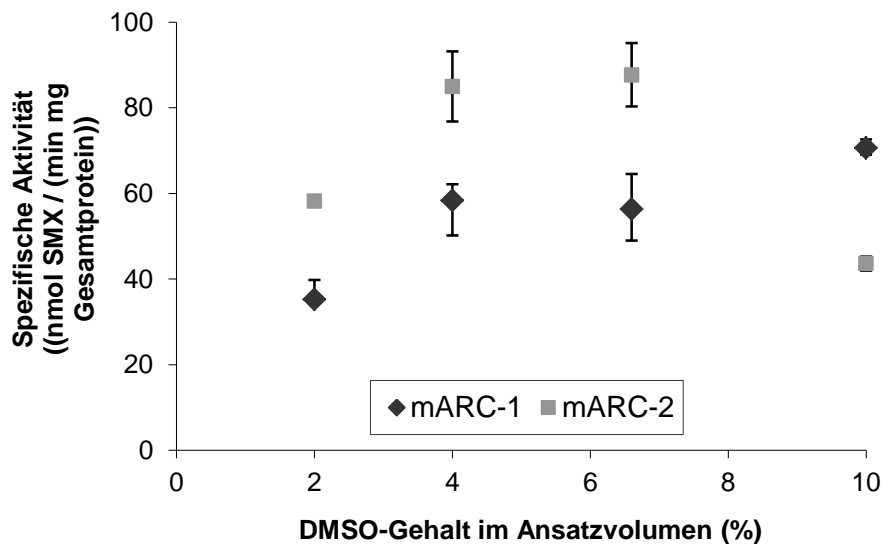


Abb. 5.12: Einfluss verschiedener DMSO-Konzentrationen im Ansatzvolumen auf die spezifische Aktivität

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10 bzw. mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt  $b_5$  # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt  $b_5$  R # 27.01.10), 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu$ l, enthielt 2 bis 10% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Bei DMSO-Konzentrationen von etwa 6,6% im Ansatzvolumen wird bei Inkubation mit rekombinant hergestellten humanen Proteinen ein Maximum an Aktivität durchlaufen (Abb. 5.12). Dies war vermutlich auf eine bestmögliche Löslichkeit des Substrats zurückzuführen.

Darüber hinaus war sicherzustellen, dass mögliche Veränderungen in den kinetischen Parametern der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin keine Artefakte waren, die auf Zusätzen im Inkubationsansatz beruhten. Dazu wurden die Substratabhängigkeiten je eines mARC-1- und eines mARC-2-Wildtypproteins mit Benzamidoxim unter DMSO- bzw. DMSO- und Ascorbinsäurezusatz inkubiert und vermessen.

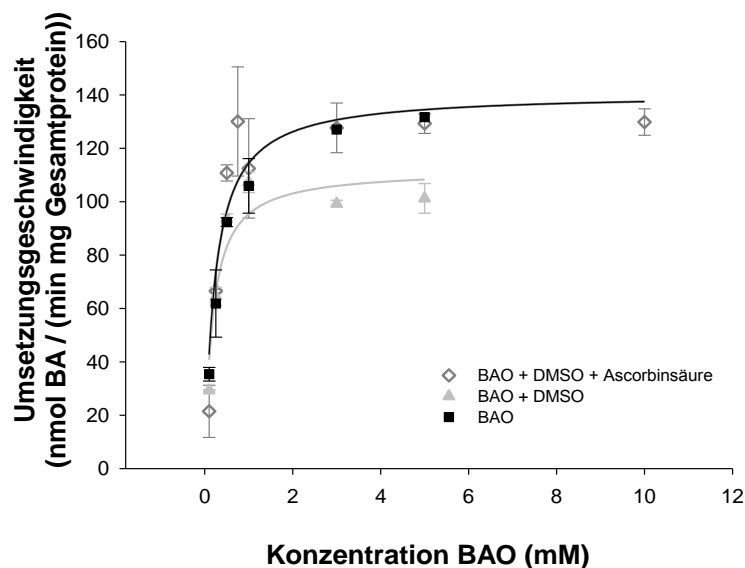


Abb. 5.13: Einfluss des DMSO- bzw. des DMSO- und Ascorbinsäurezusatzes auf die Umsetzungsgeschwindigkeit in der Substratabhängigkeit von BAO mit mARC-1

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 0,1 - 10 mM BAO, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

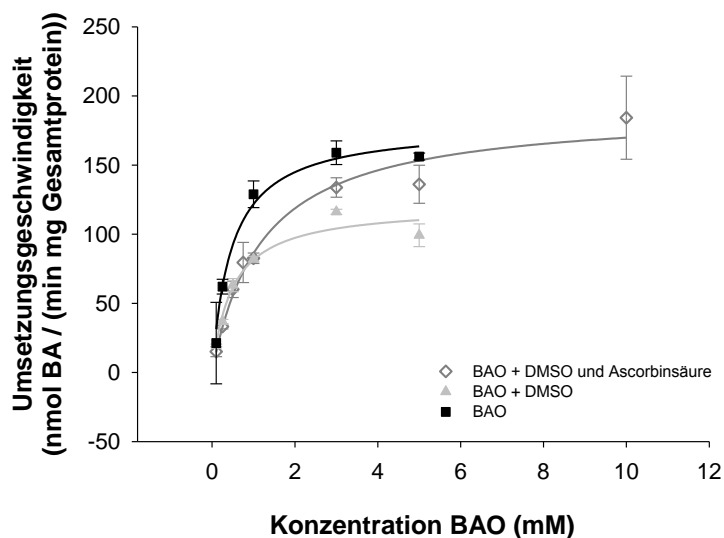


Abb. 5.14: Einfluss des DMSO- bzw. des DMSO- und Ascorbinsäurezusatzes auf die Umsetzungsgeschwindigkeit in der Substratabhängigkeit von BAO mit mARC-2

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-2 # 17.01.11), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 0,1 - 10 mM BAO, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

Der alleinige Zusatz von DMSO führte bei mARC-1 zu einem erniedrigten  $V_{\max}$ , während die Kurve mit DMSO und Ascorbinsäure im Ansatzvolumen identisch mit der Kurve ohne Zusätze war. Im aufsteigenden Ast der Kurve war die Steigung aller drei Kurven identisch (Abb. 5.13).

Bei mARC-2 führte der DMSO-Zusatz ebenfalls zu einem erniedrigten  $V_{\max}$ , während der aufsteigende Ast der Kurve etwas flacher verlief. Unter Zusatz von DMSO und Ascorbinsäure wurde  $V_{\max}$  wieder erreicht, allerdings bei einem etwas flacher ansteigenden Kurvenverlauf (Abb. 5.14).

### 5.4.2.5. Kinetische Parameter

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin wurden pro mARC-Protein drei Substratabhängigkeiten an drei verschiedenen Tagen untersucht.

Die einzelnen Michaelis-Menten-Kurven und die Angaben zur Zusammensetzung der jeweiligen Inkubationen finden sich in Kapitel 8.4.3 dieser Arbeit. Die Mittelwerte der kinetischen Parameter  $V_{\max}$ ,  $K_m$  und der katalytischen Effizienz der einzelnen Proteinchargen sind in Tab. 8.7 in Kapitel 8 zusammengefasst worden. Die katalytische Effizienz konnte als  $k_{\text{cat}} / K_m$  unter Einbeziehung des Cofaktorgehalts als Surrogat für den Anteil aktiven Enzyms berechnet werden.

Als Endergebnis wurde für alle kinetischen Parameter pro Proteinart, d.h. Wildtyp bzw. Variante, chargenübergreifend ein Mittelwert gebildet (Tab. 5.2).



## 5 UNTERSUCHUNGEN AM SUBSTRAT SULFAMETHOXAZOLHYDROXYLAMIN

mARC-Protein (Charge)	Chargen- anzahl (n)	$V_{\max}$ ((nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))	$V_{\max}$ (nmol SMX / min)	$K_m$ (mM SMX- HA)	$k_{cat} / K_m$ (1 / (s M))
<b>mARC-1</b>					
mARC-1	4	95 ± 40	2,9 ± 1,1	0,80 ± 0,53	408 ± 175
V96L	1	105 ± 24	3,1 ± 0,4	0,76 ± 0,32	398 ± 131
A165T	2	72 ± 17	2,3 ± 0,5	0,65 ± 0,42	391 ± 168
M187K	2	90 ± 28	2,7 ± 0,7	1,00 ± 0,57	301 ± 140
C246S	2	73 ± 26	2,2 ± 0,7	1,03 ± 0,47	226 ± 110
D247H	2	77 ± 44	2,5 ± 1,3	0,71 ± 0,23	346 ± 81
M268I	1	103 ± 5	3,0 ± 0,2	0,90 ± 0,23	310 ± 57
<b>mARC-2</b>					
mARC-2	3	135 ± 31 <sup>1</sup>	4,1 ± 0,7 <sup>3</sup>	0,47 ± 0,15	843 ± 263 <sup>5</sup>
G244S	1	130 ± 26	4,1 ± 0,5	0,61 ± 0,15	644 ± 234
C245W	2	88 ± 24 <sup>2</sup>	2,7 ± 0,6 <sup>4</sup>	0,45 ± 0,11	550 ± 93

Tab. 5.2: Chargenübergreifende kinetische Parameter der mARC-Proteine Wildtypen und Varianten  
Die Werte wurden aus den Einzelwerten (Tab. 8.7) errechnet. Statistisch signifikante Unterschiede (<sup>1-5</sup>) sind nachweisbar und im folgenden Text erläutert.

In den kinetischen Parametern waren statistisch signifikante Unterschiede nachweisbar: <sup>1</sup>  $V_{\max}$  des mARC-1 Wildtypen war statistisch signifikant erniedrigt im

Vergleich zum mARC-2 Wildtypen ( $p = 0,028$ , t-Test, SigmaPlot 11.0). <sup>2</sup>  $V_{\max}$  der C245W-Variante war statistisch signifikant erniedrigt im Vergleich zum mARC-2 Wildtypen ( $p < 0,050$ , ANOVA mit Dunnett's Post-Hoc-Test, SigmaPlot 11.0). <sup>3</sup>  $V_{\max}$  des mARC-1 Wildtypen war statistisch signifikant erniedrigt im Vergleich zum mARC-2 Wildtypen ( $p = 0,011$ , t-Test, SigmaPlot 11.0). <sup>4</sup>  $V_{\max}$  der C245W-Variante war statistisch signifikant erniedrigt im Vergleich zum mARC-2 Wildtypen ( $p < 0,050$ , ANOVA mit Dunnett's Post-Hoc-Test, SigmaPlot 11.0). <sup>5</sup> Die katalytische Effizienz des mARC-1 Wildtypenproteins war im Vergleich zum mARC-2 Wildtypenprotein statistisch signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ , t-Test, SigmaPlot 11.0).

In der katalytischen Effizienz konnte an diesem Substrat nur ein statistisch signifikanter Unterschied herausgearbeitet werden.

Ein Vergleich der kinetischen Parameter zwischen den beiden Substraten Benzamidoxim und Sulfamethoxazolhydroxylamin zeigte, dass sich die Werte für  $V_{\max}$  kaum unterschieden. Die mARC-1-Proteine und -Varianten erreichten einen geringfügig höheren  $V_{\max}$ -Wert mit dem Substrat Benzamidoxim, die mARC-2-Proteine mit dem Substrat Sulfamethoxazolhydroxylamin.

Betrachtete man die  $K_m$ -Werte, so wurde deutlich, dass die Werte bei der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin durchweg höher lagen als bei der Reduktion von Benzamidoxim.

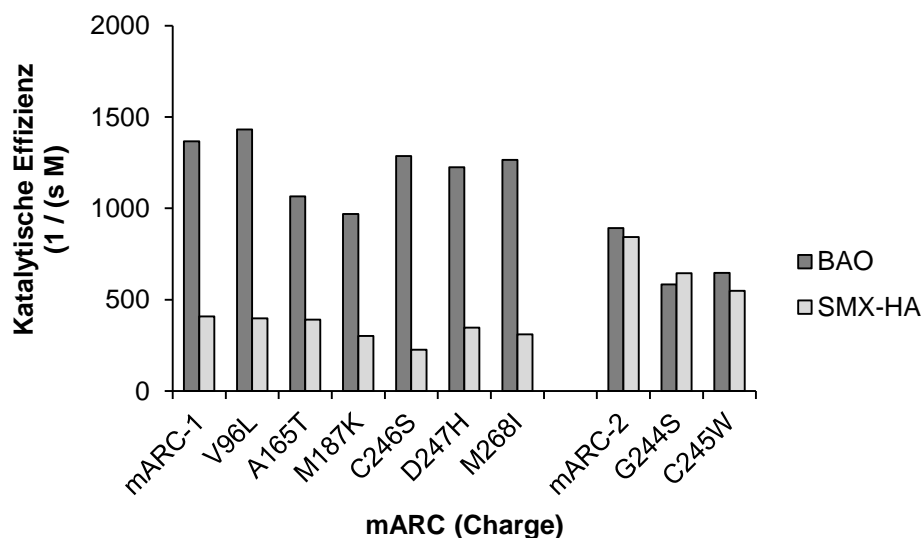


Abb. 5.15: Katalytische Effizienz der Reduktion von Benzamidoxim und von Sulfamethoxazolhydroxylamin, dargestellt sind die Mittelwerte.

Die höheren  $K_m$ -Werte in der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin wirkten sich in einer erniedrigten katalytischen Effizienz dieser Reduktion aus. So war die katalytische Effizienz der Reduktion von Benzamidoxim für das mARC-1-Protein deutlich größer als die für die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin (Abb. 5.15).

Stellte man nur die kinetischen Parameter der mARC-Wildtypproteine gegenüber (Tab. 5.3), so blieb abschließend festzuhalten, dass mARC-1 für das Substrat Benzamidoxim die höhere katalytische Effizienz im Vergleich zu mARC-2 aufwies, für das Substrat Sulfamethoxazolhydroxylamin war es dagegen mARC-2.

	$V_{max}$ (nmol Metabolit / (min mg Protein))	$K_m$ (mM Substrat)	Katalytische Effizienz (1 / (s M))
<b>BAO</b>			
mARC-1	105 ± 23	0,23 ± 0,10	1370 ± 425
mARC-2	119 ± 34	0,35 ± 0,08	890 ± 160
<b>SMX-HA</b>			
mARC-1	95 ± 40	0,78 ± 0,51	410 ± 175
mARC-2	135 ± 31	0,47 ± 0,15	840 ± 260

Tab. 5.3: Gegenüberstellung der kinetischen Parameter beider Substrate (BAO und SMX-HA) für mARC-1 und mARC-2 Wildtypproteine, angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen.

Ein Vergleich der Reduktion der beiden Substrate durch ein mARC-Wildtypprotein zeigte, dass mARC-1 eine höhere Substratspezifität für Benzamidoxim als für Sulfamethoxazolhydroxylamin besaß, während mARC-2 ähnliche Substratspezifitäten für beide Substrate aufwies.

#### 5.4.3. Untersuchung der Kombination von mARC- mit Cytochrom $b_5$ Typ B-Varianten

Es sollte die Kombination aller mARC-Varianten mit allen Cytochrom  $b_5$  Typ B-Varianten im Vergleich zur Wildtyp-Wildtyp-Kombination untersucht werden. Das

ergab 84 verschiedene Inkubationsansätze. Diese Anzahl war zu groß sowohl für eine einzige Inkubation als auch für einen einzigen Lauf in der HPLC. Daher wurde die Anzahl verschieden zusammengesetzter Ansätze pro Inkubation auf 5-8 reduziert. Eine Vergleichbarkeit zwischen den Inkubationen wurde durch das Mitführen einer Kontrolle erreicht. Der Kontrollansatz enthielt mARC-2 # 18.02.10 und Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11 und stand in jeder Inkubation an der gleichen Position.

Die Auswertung erfolgte unabhängig von der Proteinmenge im Ansatzvolumen über die Umsetzungsraten in „nmol Sulfamethoxazol / min“. Die Umsetzungsrate des Kontrollansatzes schwankte um 20% um den Mittelwert. Da dieser Kontrollansatz in jeder Inkubation als Konstante betrachtet werden sollte, wurde die Umsetzungsrate des Kontrollansatzes in jeder Inkubation gleich 100% gesetzt, und die Umsetzungsraten der anderen Ansätze aus derselben Inkubation dazu in Relation gesetzt (Tab. 5.4).

In Tab. 5.4 wurden die auf die Kontrolle normierten Umsetzungsraten in Prozent angegeben. In der linken Spalte wurde das Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Protein eingetragen, das im Inkubationsansatz enthalten war, in der zweiten Zeile das mARC-Protein. Alle Ansätze enthielten dieselbe Charge NADH- Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase. Die Umsetzungsraten eines mARC-Wildtyp-Proteins mit einem Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Wildtyp-Protein sollten im Idealfall gleiche Werte ergeben. Auch hier waren Schwankungen erkennbar. Die Schwankungsbreite reichte von 65 bis 140%. Dies wurde als Normbereich angesehen.

5 UNTERSUCHUNGEN AM SUBSTRAT SULFAMETHOXAZOLHYDROXYLAMIN

Cyt b <sub>5</sub>	mARC-1							mARC-2				
	A165T # 220210	M187K # 220210	D247H # 220210	WT # 220210	WT # 070910	V96L # 070910	C246S # 070910	M268I # 070910	G244S # 180210	WT # 180210	WT # 220710	C245W # 220710
T22A # 150211	70	60	80	90	120	60	60	90	80	140	120	80
WT # 150211	70	80	80	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	90	70	<b>100</b>	<b>90</b>	<b>50</b>
WT # 230211b	90	90	100	<b>90</b>	<b>110</b>	90	80	90	90	<b>140</b>	<b>80</b>	80
D14G # 230211	60	80	90	120	70	<b>50</b>	60	80	70	90	80	<b>50</b>
K16E # 230211	100	110	120	110	150	90	110	130	90	<b>200</b>	110	60
<b>Kontrolle</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>WT # 180511</b>	100	<b>160</b>	120	<b>130</b>	<b>90</b>	90	90	110	90	<b>150</b>	<b>90</b>	70
<b>S2F # 180511</b>	110	140	110	80	100	100	90	80	120	80	130	70
<b>Kontrolle</b>	100			100			100			100		

% Aktivität (nmol SMX / min), Kontrolle (WT mARC-2 # 180210 + WT Cyt b <sub>5</sub> # 150211) = 100%	
0-50%	60-150%
	160-200%

Tab. 5.4: Umsetzungsraten (nmol SMX / min) der Haplotypen in Relation zur Kontrolle, mit Kontrolle = 100%. Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub>) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthält 2% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. Als Kontrolle enthielt jede Inkubation den Ansatz mthmARC-2 # 18.02.10 und Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11.

Verminderte Umsetzungsraten waren für die mARC-1-Varianten V96L und C246S sowie für die mARC-2-Variante C245W erkennbar. Eine Steigerung in den Umsetzungsraten trat vereinzelt auf, d.h. sie war in Kombination mit einem anderen Wildtypprotein nicht reproduzierbar, z.B. bei der mARC-1-Variante M187K und bei der Cytochrom  $b_5$  Typ B-Variante K16E. Eine Potenzierung von Effekten auf die *N*-reduktive Aktivität durch die Kombination zweier Varianten trat nicht auf. Ebenso wenig war eine Reduktion der Aktivität um mehr als 50% möglich.

### 5.5. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Bisherige Untersuchungen zur Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin haben als *in vitro*-Testsystem porcine oder humane Lebermikrosomen eingesetzt. Die porcinen Mikrosomen zeigten eine Aktivität von  $0,86 \pm 0,06$  nmol SMX / (min mg Gesamtprotein) (Clement *et al.* 2005), bei humanen Lebermikrosomen reichte die Aktivität von  $0,38 \pm 0,01$  bis  $5,0 \pm 1,6$  nmol SMX / (min mg Gesamtprotein) (Clement *et al.* 2005; Sacco und Trepanier 2010; Bhusari *et al.* 2010). Mitochondrien wurden bislang nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin NADH-abhängig ist und dass die *N*-reduktive Aktivität in mitochondrialen porcinen subzellulären Fraktionen der Leber und Schilddrüse angereichert ist. Die Reduktion eines Substrates über das mARC-haltige Enzymsystem verbraucht überwiegend NADH, Cytochrom P450 abhängige Reaktionen dagegen eher NADPH. Die Präferenz der subzellulären Fraktionen für eines der beiden Cosubstrate zeigt an, welches Enzymsystem an der Reaktion beteiligt ist. Eine Anreicherung der Aktivität war nur in der mitochondrialen Fraktion erkennbar, nicht in der mikrosomalen. Die Reduktion kann also nicht über das Zweikomponentensystem erfolgen, da eine Anreicherung der Aktivität in mikrosomalen Subfraktionen bislang nicht gezeigt worden ist (Trepanier 2004; Sacco und Trepanier 2010).

In der mitochondrialen Subfraktion der porcinen Schilddrüse wurden alle Enzyme des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems nachgewiesen. Im rekombinanten Enzymsystem wurde sichergestellt, dass für die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin die Anwesenheit aller drei Komponenten, i.e. mARC, Cytochrom  $b_5$

Typ B und NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase, erforderlich war. Im Zweikomponentensystem war entgegen den Publikationen aus dem Arbeitskreis um L. A. Trepanier nahezu keine Aktivität nachweisbar. Diese Ergebnisse aus den *in vitro*-Versuchen zeigten, dass die Reduktion über das Dreikomponentensystem abläuft. Um die physiologische Relevanz sicherzustellen, bräuchte man allerdings ein Testsystem, das die Bedingungen *in vivo* besser widerspiegelt. Zellkulturversuche wären beispielsweise geeignet, die Beteiligung des *N*-reduktiven Enzymsystems an der Reduktion von Sulfamethoxazol-hydroxylamin *in vivo* zu bestätigen.

*In vitro* lassen sich Proteinvarianten einfach über ihre kinetischen Parameter charakterisieren. Es wurden die mARC-1-Proteinvarianten V96L, A165T, M187K, C246S, D247H und M268I, die mARC-2-Proteinvarianten G244S und C245W sowie die Cytochrom  $b_5$  Typ B-Varianten S2F, D14G, K16E und T22A untersucht. Es zeigte sich, dass die mARC-Proteinvarianten keinen Einfluss auf die kinetischen Parameter der Reduktion hatten. Eine Kombination von mARC- mit Cytochrom  $b_5$  Typ B-Varianten konnte die Aktivität des Enzymsystems nicht weiter verändern. Die untersuchten Proteinvarianten nahmen folglich keinen Einfluss auf die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin, d.h. sie verursachten keine Dysfunktion des Enzymsystems, die für Nebenwirkungen wie Hypersensitivitätsreaktionen prädisponieren könnte.

Der einzig signifikante Unterschied zeigte sich in der katalytischen Effizienz der beiden Wildtypproteine mARC-1 und mARC-2. Die katalytische Effizienz ist für die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin bei mARC-2 deutlich höher im Vergleich zu mARC-1. Dieses Ergebnis ist allein auf das Substrat zurückzuführen. Vorversuche zur Reduktion von Benzamidoxim unter Zusatz von DMSO und Ascorbinsäure konnten keinen Unterschied in der katalytischen Effizienz von mARC-1 detektieren, d.h. diese Zusätze hatten keinen Einfluß auf die katalytische Effizienz. Bei mARC-2 wurde durch die Zusätze eine leichte Verringerung der katalytischen Effizienz in der Reduktion von Benzamidoxim beobachtet, die sich aber in den mehrfach reproduzierten Daten zur Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin nicht bestätigen ließ.

Das gewebespezifische Muster in der RNA-Expression (<http://biogps.org>, Su 2004) für die beiden mARC-Proteine zeigt, dass der Median der Kopienzahl pro Zelle für mARC-1 fast dreimal so hoch ist als für mARC-2. Nähme man an, dass die Hypersensitivitätsreaktion auf einer unzureichenden Reduktion des

Hydroxylaminmetaboliten beruhte, so könnte über interindividuelle Unterschiede in der Proteinexpression eine Prädisposition geschaffen werden. Dabei muss man auch die anderen beiden Komponenten berücksichtigen. Cytochrom b5 Typ B weist im Median eine vergleichbare Anzahl von Kopien pro Zelle auf wie mARC-2, während für die NADH-Cytochrom b5 Reduktase eine 30-fach erhöhte Kopienzahl pro Zelle veröffentlicht ist (Su 2004).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin über das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem verläuft und sich für keine der untersuchten Proteinvarianten eine Assoziation zur Pathogenese der Hypersensitivitätsreaktion herstellen ließ.



## 6. BIOMARKERTEST

### 6.1. EINLEITUNG

Der direkte Thrombininhibitor Ximelagatran (Exanta<sup>®</sup>) ist ein doppeltes Prodrug, das zum einen durch Esterhydrolyse und zum anderen durch *N*-Reduktion aktiviert wird. Letztere wird durch das mARC-haltige *N*-reduktiven Enzymsystem katalysiert. Die Aktivierung verläuft vom Ximelagatran über das *N*-Hydroxymelagatran bzw. das Ethylmelagatran hin zum Melagatran (Clement und Lopian 2003, Abb. 1.6 in Kapitel 1). Das Prodrug ist oral verfügbar (Gustafsson *et al.* 2001).

In der Langzeitbehandlung mit Ximelagatran traten vereinzelt erhöhte ALAT-Spiegel im Blut auf, die schließlich zur Marktrücknahme von Exanta<sup>®</sup> geführt haben. Für diese Nebenwirkung wurde ein Immunmechanismus zwischen Melagatran bzw. Ximelagatran und dem MHC-Allel *DRB1\*0701* postuliert (Kindmark *et al.* 2008; Alfirevic *et al.* 2012).

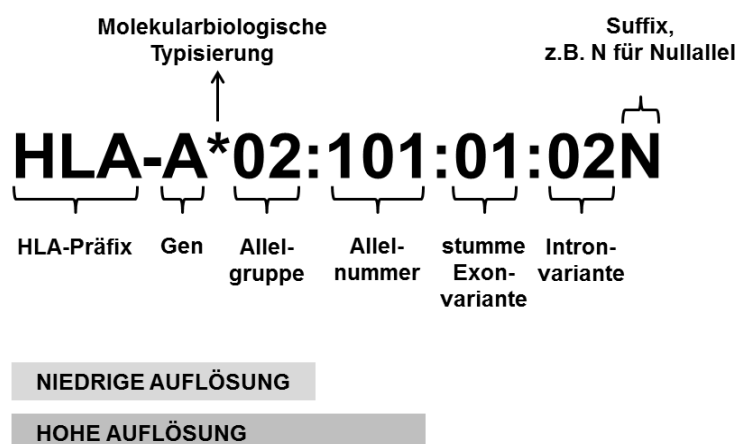


Abb. 6.1: HLA-Nomenklatur nach den Regeln des *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

Beim Menschen bezeichnet man den „*Major histocompatibility complex*“ (MHC) auch als humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA-System), das in die Klasse I (HLA-A, -B und -C) und die Klasse II (HLA-DR, -DP und -DQ) unterteilt wird. Sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle gehören zum adaptiven Immunsystem.

Die Regeln für die Bezeichnung dieser Proteine werden vom *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* festgelegt und laufend aktualisiert (Marsh 2013) (Abb. 6.1).

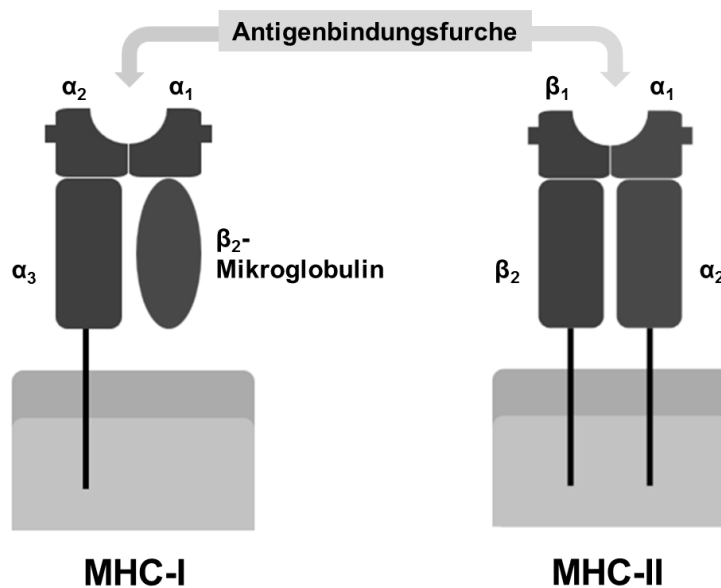


Abb. 6.2: Schematische Darstellung der MHC-Klasse I- und -Klasse II-Moleküle in Anlehnung an *MHC class 1.svg* und *MHC class 2.svg*, *Wikimedia Commons*, lizenziert unter *CreativeCommons Lizenz by-sa-3.0-de*, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/legalcode>

MHC-Klasse-I-Moleküle (Abb. 6.2) bestehen aus einer α-Kette, die die Plasmamembran durchquert und in die drei Domänen α<sub>1</sub> bis α<sub>3</sub> unterteilt ist, sowie einem β<sub>2</sub>-Mikroglobulin, das als lösliches Protein zur Stabilisierung der α-Kette dient. Die α<sub>1</sub>- und α<sub>2</sub>-Domänen bilden eine Antigenbindungsfurche, in der Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren präsentiert werden können. MHC-Klasse-II-Moleküle (Abb. 6.2) bestehen aus zwei Ketten, einer α- und einer β-Kette mit jeweils zwei extrazellulären Domänen. Beide Ketten durchqueren die Plasmamembran. Die Antigenbindungsfurche ist an den Rändern offen, so dass hier Peptide mit einer Länge von 18 bis 25 Aminosäuren präsentiert werden können (Martin und Klaus 2009).

MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren prozessierte Antigene aus zytosolischen Proteinen. Diese Komplexe werden von CD8-positiven T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor erkannt.

MHC-II-Moleküle werden von den antigenpräsentierenden Zellen, i.e. dendritische Zellen, Makrophagen und aktivierte B-Lymphozyten, exprimiert und präsentieren prozessierte Antigene, die aus dem Extrazellulärraum oder von der Zelloberfläche aufgenommen werden. Die gebildeten Komplexe werden von CD4-positiven T-Zellen erkannt. Hier kann die T-Zell-Antwort durch ein kostimulatorisches Signal zwischen CD80/CD86 der antigenpräsentierenden Zellen und CD28 der T-Zelle maximiert werden (Graefe *et al.* 2011; Martin und Klaus 2009).

Eine retrospektive, pharmakogenetische Fall-Kontroll-Studie untersuchte 2008 das Auftreten erhöhter ALAT-Werte unter Ximelagatran. Es wurde eine Genotypisierung durchgeführt, für die 690 Kandidatengene aus vier Gruppen von Genen ausgewählt worden sind: (i) Gene, die am Wirkmechanismus von Ximelagatran beteiligt waren, (ii) Gene, die in der Literatur mit erhöhten Leberenzymen assoziiert waren, (iii) Gene, die aus zusätzlichen präklinischen Studien von Ximelagatran abgeleitet waren, und (iv) Gene, die in der Literatur zu genetisch assoziierten Arzneimittelnebenwirkungen zu finden waren. Über diese Genotypisierung wurde eine Assoziation zu 10 Genen hergestellt. 10 Fälle und 16 Kontrollen wurde im Anschluß auf diese 10 Gene hin näher untersucht und es wurde eine starke genetische Assoziation zu den MHC-Allelen *DRB1\*07* und *DQA1\*02* gefunden. Darüber hinaus deuteten immunologische Studien darauf hin, dass Ximelagatran die Fähigkeit hat, als Kontaktallergen zu agieren. Sieben von 20 Arbeitern, die während des Herstellungsprozesses Ximelagatran ausgesetzt waren, zeigten Hautreaktionen. Zwei von 21 weiteren Patienten zeigten schwach positive Reaktionen im Lymphozytentransformationstest, der für den Nachweis einer zellulären Immunreaktion eingesetzt worden ist. Diese beiden Patienten wiesen erhöhte ALAT-Blutspiegel auf, einer der beiden war heterozygot für das *DRB1\*07*-Allel (Kindmark *et al.* 2008).

Ein Zusammenhang zur Prodrugaktivierung konnte nicht hergestellt werden. Sowohl Ximelagatran als auch Melagatran bilden keine reaktiven Metabolite (Kenne *et al.* 2008).

In einem „*Competition binding assay*“ mit rekombinant hergestellten löslichen HLA-Molekülen sowie Ximelagatran und seinen Metaboliten Melagatran und Ethylmelagatran ist gezeigt worden, dass Arzneistoff und Metabolit ein zuvor an das

lösliche MHC-Molekül gebundenes, fluoreszenzmarkiertes Peptid nur dann aus der Bindung verdrängen können, wenn DRB1\*0701 als lösliches MHC-Molekül verwendet wird (Kindmark *et al.* 2008).

Einen neuen Ansatz, Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffen und Proteinen zu untersuchen und dadurch Wirkmechanismen von Arzneimitteln aber auch Arzneimittelnebenwirkungen aufzuklären, bietet die *Capture Compound Mass Spectrometry* (CCMS) Technologie der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH.

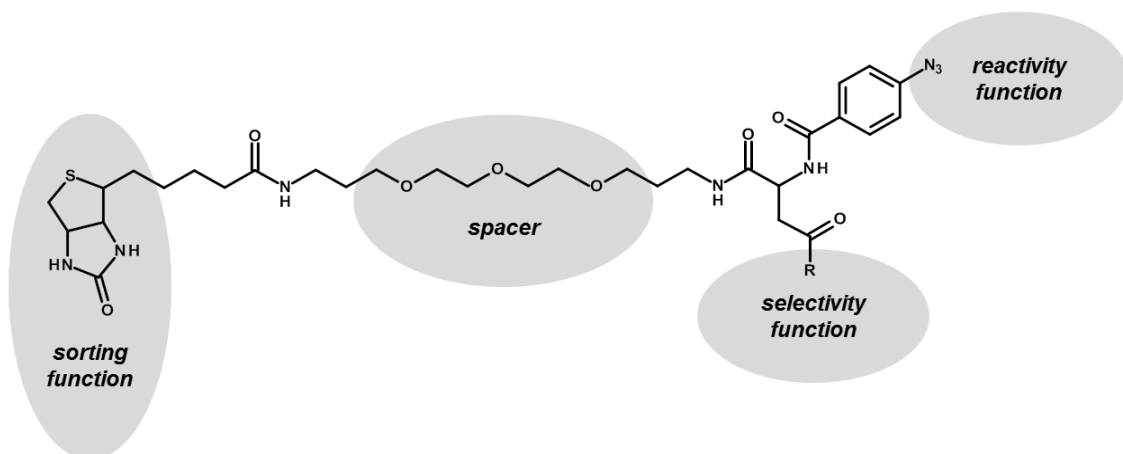


Abb. 6.3: Aufbau einer *Capture Compound*

Dazu wird eine *Capture Compound* (CC) synthetisiert, die aus dem zu untersuchenden Arzneistoff (*selectivity function*), einer photoaktivierbaren Azidgruppe (*reactivity function*), einem Abstandshalter (*spacer*) sowie Biotin (*sorting function*) besteht (Abb. 6.3) und mit Proteinen in Wechselwirkung treten kann. Die Technologie kann sowohl für die gezielte Untersuchung eines Proteins als auch für Proteomanalysen eingesetzt werden (Köster *et al.* 2007).

Kennt man die Genvariante bzw. das HLA-Allel, die die Nebenwirkung verursachen, so kann man die Behandlung individualisieren, Patienten mit einem erhöhten Nebenwirkungsrisiko durch einen prädiktiven Gentest identifizieren und gegebenenfalls von der Therapie ausschließen. Dies erfolgt beispielsweise bei einer Behandlung mit Abacavir, von der Träger des *HLA-B\*5701*-Allels wegen der Gefahr von Hypersensitivitätsreaktionen ausgeschlossen werden (Mallal *et al.* 2002). In Deutschland sind für 20 zugelassene Arzneistoffe prädiktive Gentests Pflicht und für weitere sieben Arzneistoffe empfohlen (<http://www.vfa.de/de/arzneimittelforschung/datenbanken-zu-arzneimitteln/individualisierte-medizin.html>). Die Bio-

markerliste der FDA „*Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels*“ ist deutlich umfangreicher.

## 6.2. ZIELSETZUNG

Kindmark *et al.* haben postuliert, dass ein auf dem MHC-Allel *DRB1\*0701* basierender prädiktiver Biomarkertest Patienten erkennen könnte, die ein erhöhtes Risiko für erhöhte ALAT-Werte unter Ximelagatran haben. Diese Aussage beruht auf den Patientendaten aus der EXGEN-Studie, die in einer Vierfeldertafel dargestellt sind (Tab. 6.1). Aus diesen Zahlen lassen sich die Ergebnisparameter eines Biomarkertests berechnen.

	ALAT erhöht	ALAT normal
Träger eines DRB1*07 Allels	35	22
Kein Träger eines DRB1*07 Allels	39	108

Tab. 6.1: Darstellung der Patientendaten aus der EXGEN-Studie in der Vierfeldertafel

Die Sensitivität eines Tests ist definiert als die Wahrscheinlichkeit beim Vorliegen einer Erkrankung ein positives diagnostisches Testergebnis zu haben. Sie berechnet sich als  $35 / (35+39)$  und beträgt 47%. Als Spezifität eines Tests bezeichnet man die Wahrscheinlichkeit beim Nicht-Vorliegen einer Erkrankung ein negatives diagnostisches Testergebnis zu haben. Sie berechnet sich als  $108 / (108+22)$  und beträgt 83% (Kindmark *et al.* 2008).

Ziel ist es, zu überprüfen, ob mit einem *in vitro* Test eine Wechselwirkung zwischen MHC-Allel und Arzneistoff mit Hilfe der *Capture Compound* Technologie detektiert werden kann. Dazu werden *Capture* Versuche mit rekombinant hergestellten löslichen HLA-Molekülen und einer Melagatran *Capture Compound* von der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH, Berlin, durchgeführt. Darüber hinaus sollen Frequenzdaten für das Vorliegen des MHC-Allels *DRB1\*0701* an der Kohorte aus 342 gesunden Kaukasier aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, UKSH, Campus Kiel, erhoben werden.

### 6.3. METHODEN

#### 6.3.1. HLA-Typisierung

Die HLA-Typisierung fand am Institut für Immunologie, UKSH, Campus Kiel unter der Leitung von Dr. Matthias Marget statt. Die DNA stammte aus der Kohorte 342 gesunder Kaukasier und wurde vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, UKSH, Campus Kiel, zur Verfügung gestellt.

Über eine PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) konnten homo- und heterozygote Träger des *DRB1\*07*-Allels identifiziert werden.

Bei diesem Verfahren wurde ein vorgegebenes Allel spezifisch von den Primern erkannt. War am 3'-Ende ein sogenannter Basenmismatch vorhanden, so erfolgte keine Amplifikation. Am Ende war eine Auswertung direkt über das Gelbild möglich, nur bei Trägern des HLA-Allels war eine Bande erkennbar.

Da für die folgende PCR mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (PCR-SSO) größere Mengen DNA benötigt wurden, wurde eine *whole genome amplification* (WGA) durchgeführt. Sie erfolgte mit Hilfe des illustra™ GenomiPhi V2 DNA Amplification Kits. Dieses Kit enthielt Proben- und Reaktionspuffer, einen Enzymmix und Kontroll-DNA. 4 bis 7 µg DNA waren aus 10 ng gereinigter humaner genomischer DNA herstellbar.

Die Amplifikation der DNA erfolgte in vier Schritten. Im ersten Schritt wurde das DNA-*template* hitzedenaturiert. Hierzu wurden 1 µl DNA-template mit 9 µl Probenpuffer gemischt, für drei Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis auf 4°C abgekühlt. Im zweiten Schritt wurde die Amplifikation vorbereitet. Für jede Reaktion wurden 9 µl Reaktionspuffer mit 1 µl Enzymmix unter Eiskühlung gemischt. Die abgekühlte Probe aus dem ersten Schritt wurde hinzugegeben. Im dritten Schritt wurde die Probe für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Im vierten Schritt wurde die Amplifikation durch Hitze gestoppt. Dazu wurde die Probe für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und abschließend auf 4°C abgekühlt.

Zur Kontrolle wurde die Konzentration und Reinheit der DNA stichprobenartig photometrisch überprüft. Hierzu wurde die DNA-Lösung in eine Quarzküvette gegeben und bei Wellenlängen von 260, 280 und 230 nm vermessen. Eine  $OD_{260} = 1$  entsprach 50 µg / ml doppelsträngiger DNA.

Das Absorptionmaximum für Proteine basiert auf der Absorption der aromatischen Reste und lag bei 280 nm. Das Verhältnis  $OD_{260} / OD_{280}$  zeigte an, wie stark die

DNA-Lösung mit Alkohol oder Proteinresten verunreinigt war. Eine reine DNA-Isolierung zeigte ein Verhältnis von 1,8.

Darüber hinaus wurde der Quotient  $OD_{230} / OD_{260}$  bestimmt. Dies war ein Indikator für weitere Verunreinigungen, z.B. mit Polysacchariden, und sollte bei 0,45 liegen.

Zur Unterscheidung homozygoter *DRB1\*07*-Träger von heterozygoten erfolgte dann eine PCR mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (PCR-SSO), den RELI™ SSO Assay.

Für diesen Assay wurde zunächst eine PCR mit biotinylierten Primern durchgeführt. Sequenzspezifische Oligonukleotide waren an einer Nylonmembran immobilisiert. War ihre Sequenz zu der des PCR-Produkts komplementär, so konnten diese hybridisieren. Anschließend wurden die Proben gewaschen. Das gebundene PCR-Produkt ging über das Biotin mit SA-HRP (*streptavidin horseradish peroxidase conjugate*) in Gegenwart von  $H_2O_2$  und Tetramethylbenzidin eine blaue Farbreaktion ein.

### 6.3.2. Capture-Versuche

Mittels *in vitro* Capture-Versuchen sollte zunächst untersucht werden, ob eine Wechselwirkung zwischen dem Melagatran der *Capture Compound* und dem HLA-Allel *DRB1\*0701* auftritt. Dies wurde mit rekombinant hergestellten löslichen HLA-Molekülen (PureProtein L.L.C., Oklahoma City, USA) durchgeführt. Als Positivkontrolle diente das *DRB1\*0701*, als Negativkontrolle *DRB1\*1502*. In beiden löslichen HLA-Molekülen war auch die Alpha-Kette *DRA\*0101* enthalten.

Ein SDS-Page wurde zur Überprüfung der Reinheit der Proteine durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde die PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Silber gefärbt (PlusOne Silver Staining Kit, Protein).

Für die *Capture*-Versuche musste zunächst eine sogenannte *Capture Compound* (CC) synthetisiert werden. Für die anstehenden Versuche wurde Melagatran als *reactivity function* eingesetzt. Es wurde über den sogenannten „*CC attachment point*“ so ansynthetisiert, dass in der einen Melagatran *Capture Compound* die Amidfunktion frei war und in der anderen die Säurefunktion (Abb 6.4).

Der Versuch selbst war so aufgebaut, dass zunächst die *Capture Compound* mit der Proteinprobe inkubiert wurde, damit das Zielprotein mit der Selektivitätsfunktion der *Capture Compound* in Wechselwirkung treten konnte. Diese Wechselwirkung

basierte auf der Affinität der beiden Zielstrukturen zueinander und war reversibel. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe von UV-Licht die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen *Capture Compound* und Protein über die Azid-Funktion initiiert. Abschließend wurde die biotinylierte *Capture Compound* mit dem daran gebundenen Protein über Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel (1 µm) isoliert und die Proteine wurden mittels SDS-Page identifiziert.

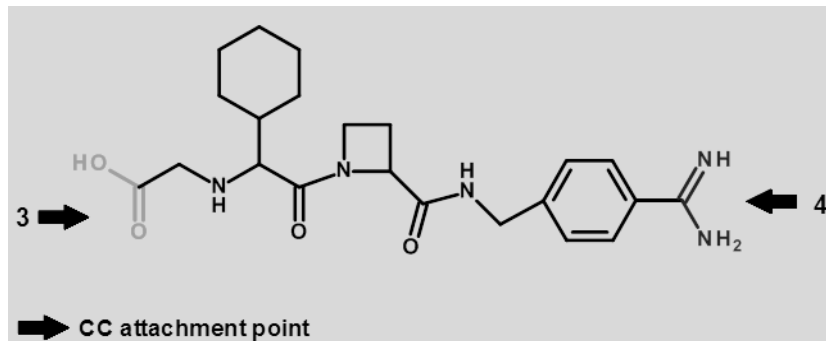


Abb. 6.4: Melagatran *Capture Compound*

Die *Capture Compound* wurde entweder mit der Säurefunktion (3) oder mit der Amidinfunktion (4) des Melagatrans verknüpft.

Als Kontrolle („*Competition*“) diente die Zugabe des Arzneistoffs zu dem Inkubationsansatz. Beim Vorliegen einer tatsächlichen Wechselwirkung zwischen Arzneistoff und Protein musste der Arzneistoff besser als die *Capture Compound* mit dem Protein reagieren, so dass kein Protein mehr für die Wechselwirkung mit der *Capture Compound* zur Verfügung stand (caprotec<sup>TM</sup> Brochure, <http://www.caprotec.com/>).

Die *Capture* Experimente wurden von der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH, Berlin, durchgeführt.

## 6.4. ERGEBNISSE

### 6.4.1. HLA-Typisierung

Die HLA-Typisierung von 342 Kaukasiern konnte 4 homozygote und 71 heterozygote Träger des *DRB1\*0701*-Allels ermitteln. 249 trugen kein *DRB1\*0701*-Allel, 18 Proben zeigten kein Ergebnis. Daraus ergab sich in dieser Kohorte eine Häufigkeit von 1,2% für dieses Allel.



#### 6.4.2. Prüfung der rekombinant hergestellten löslichen HLA-Moleküle auf Reinheit

In dem SDS-Gel (Abb. 6.5) war die DRB1-Bande deutlich in beiden Proben zu erkennen. Darüber lag die DRA1-Bande. Weitere schwächere Banden könnten vermutlich auf Verunreinigungen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen sein.

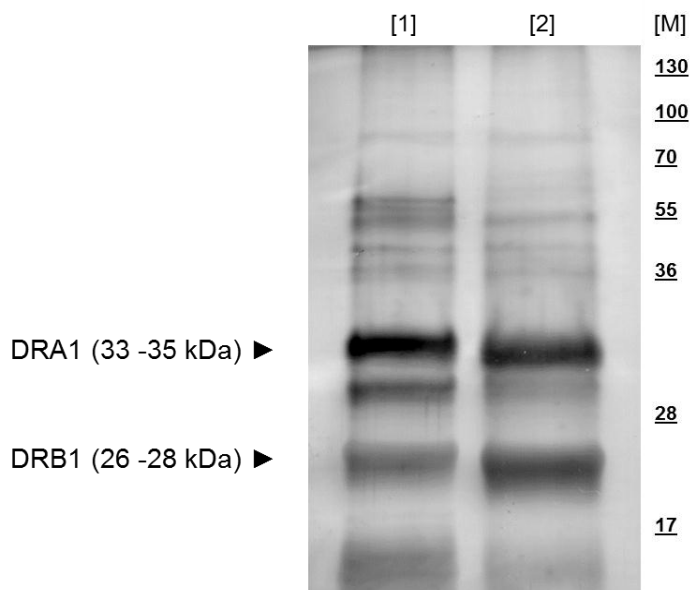


Abb. 6.5: SDS-Page der löslichen HLA-Moleküle

2 µg lösliche HLA wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und mit Silber gefärbt; [1] DRB1\*0701ZP # 16.05.11, [2] DRB1\*1502ZP # 16.05.11, [M] PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

#### 6.4.3. Capture-Versuche mit rekombinant hergestellten löslichen HLA-Molekülen

Die ersten *Capture*-Versuche der Firma caprotec™ bioanalytics GmbH Berlin, waren so aufgebaut, dass die beiden löslichen HLA-Moleküle jeweils mit einer Melagatran *Capture Compound*, die eine freie Amidfunktion enthielt, und mit einer zweiten Melagatran *Capture Compound*, die eine freie Säurefunktion enthielt, versetzt wurden. Zu jedem Versuch wurde die „*Competition*“ als Kontrollreaktion durchgeführt. Die isolierten Proteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und zunächst mit Silber angefärbt (Abb. 6.6). Die reinen löslichen HLA-Moleküle waren mittels Silberfärbung

detektierbar. Die gecaptureten Proteine konnten in einem BiotinBlot sichtbar gemacht werden (Abb 6.7).

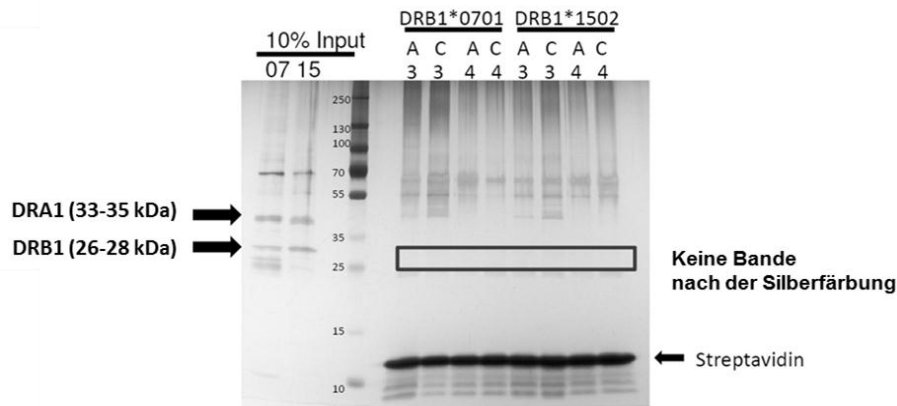


Abb. 6.6: SDS-PAGE der ersten *Capture*-Versuche nach Silberfärbung

Der Versuch wurde von der Firma caprotec™ bioanalytics GmbH, Berlin, durchgeführt. (07 = sHLA DRB1\*0701, 15 = sHLA DRB1\*1502, A = Analyse / Capture Versuch, C = Competition, 3 = CC ist mit der Säurefunktion des Melagatrans verknüpft, 4 = CC ist mit der Amidinfunktion des Melagatrans verknüpft)

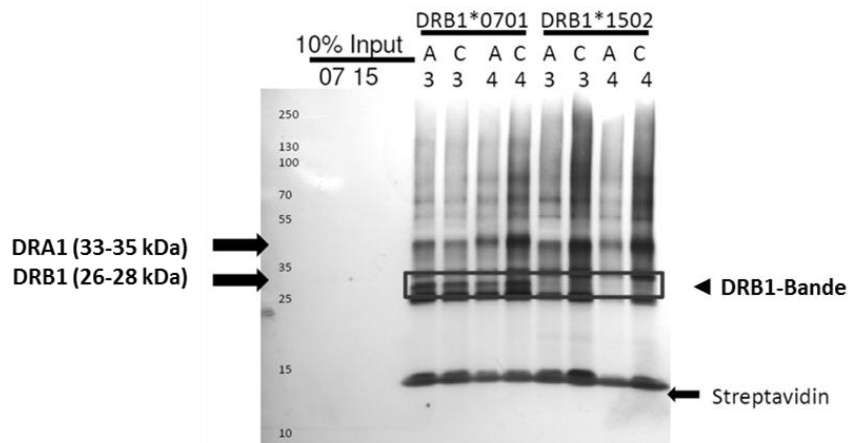


Abb. 6.7: BiotinBlot der ersten *Capture*-Versuche nach 3 min Belichtungszeit

Der Versuch wurde von der Firma caprotec™ bioanalytics GmbH, Berlin, durchgeführt. (07 = sHLA DRB1\*0701, 15 = sHLA DRB1\*1502, A = Analyse / Capture Versuch, C = Competition, 3 = CC ist mit der Säurefunktion des Melagatrans verknüpft, 4 = CC ist mit der Amidinfunktion des Melagatrans verknüpft)

Es wurden vier DRB1\*0701-Banden sichtbar, d.h. das lösliche HLA-Molekül war in der Analyse (A) mit beiden Melagatran *Capture Compounds* in Wechselwirkung getreten. Es machte keine Unterschied, ob die Säure- oder die Amidinfunktion des

Melagatran frei war. Allerdings waren auch in jeder Kontrollinkubation, den *Competitions* (C), eine Bande erkennbar.

Die Negativkontrolle, das lösliche HLA-Molekül DRB1\*1502, zeigte mit der Melagatran *Capture Compound* keine Wechselwirkung.

Im oberen Molekulargewichtsbereich waren sowohl im SDS-Page als auch im BiotinBlot schwache Banden erkennbar. Diese Banden wurden vermutlich durch Verunreinigungen, die unspezifisch gefärbt wurden, oder auch durch Protein-Protein-Wechselwirkungen verursacht.

### 6.5. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Die Etablierung eines prädiktiven Biomarkertest bezüglich der ALAT-Erhöhung unter Ximelagatran sollte mit Hilfe von *Capture*-Versuchen erfolgen. Diese können eine Wechselwirkung zwischen Arzneistoff, i.e. die Wirkform Melagatran, und dem für die Nebenwirkung verantwortlichen HLA-Molekül DRB1\*0701 deutlich besser herausarbeiten, als der von Kindmark *et al.* verwendete *Competition binding assay*. In dem *Competition binding assay* musste die Wechselwirkung zwischen Arzneistoff und Zielprotein stärker sein als die zwischen einem fluoreszenzmarkierten Protein und dem Zielprotein. Dieser Schwellenwert ist in den *Capture*-Versuchen nicht zu überwinden.

Erste *Capture*-Versuche zeigen, dass die Melagatran *Capture Compound* mit dem rekombinant hergestellten löslichen HLA-Molekül DRB1\*0701 in Wechselwirkung treten kann. Für diese Wechselwirkung gibt es keine bevorzugte Orientierung des Melagatran-Moleküls, sie ist sowohl über eine freie Säurefunktion als auch über eine freie Amidfunktion möglich. Mit der Negativkontrolle DRB1\*1502 tritt keine Wechselwirkung auf. Das heißt, in der Struktur des DRB1\*0701 Moleküls ist eine Basis für die Wechselwirkung mit der Melagatran *Capture Compound* zu finden.

Da die *Competition* nicht zweifelsfrei funktioniert hat, sind die Versuchsbedingungen zu optimieren. Dies kann beispielsweise über eine Verminderung der Konzentration an *Capture Compound* oder an Protein erfolgen.

In der untersuchten Kohorte Kaukasier sind 1,2% homozygote Träger des HLA *DRB1\*0701*-Allels. Ein optimierter Biomarkertest kann aufgrund seiner Sensitivität von 47% aber nur jeden zweiten Patienten mit dem Risiko einer ALAT-Erhöhung

unter Ximelagatran detektieren. Daher kann ein solcher Biomarkertest, wenn überhaupt, erst in dem Moment praktische Bedeutung erlangen, in dem man sich von Ximelagatran einen Zusatznutzen gegenüber anderen Arzneistoffen erhofft.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass erste Versuche, einen prädiktiven Biomarkertest für Nebenwirkungen unter Ximelagatran zu etablieren, Wechselwirkungen zwischen DRB1\*0701 und Melagatran gezeigt haben. Auch wenn die *Competition* nicht zweifelsfrei funktioniert hat, so ist dennoch gezeigt worden, dass zwei Allele, die Positivprobe (DRB1\*0701) und die Negativkontrolle (DRB1\*1502), unter definierten Bedingungen unterschieden werden können.

In anschließenden Versuchen müsste die Probenanzahl von positiven und negativen Proben erhöht werden, um die Zuverlässigkeit der Detektion des DRB1\*0701-Allels zu bestimmen. Ebenso ist zu klären, ob man auch eine Wechselwirkung mit dem DQA1\*02-Allel detektieren könnte, das in der Untersuchung von Kindmark *et al.* zunächst eine starke genetische Assoziation gezeigt hatte, aber in den folgenden immunologischen Studien nicht detektiert wurde.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung genetischer Variationen im mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystem, das aus mARC-, Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B und NADH Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase besteht und in der Lage ist, *N*-hydroxylierte Verbindungen in Gegenwart von NADH zu reduzieren.

Genetische Polymorphismen können einen großen Einfluss auf den Arzneistoffmetabolismus und somit auf die Arzneimitteltherapie haben. Sie können einerseits die gewünschten Wirkungen der Arzneimittel verstärken (*CYP2C19*\*17-Allel unter Clopidogrel) oder abschwächen (*CYP2C19*\*2 und \*3-Allele unter Clopidogrel) und andererseits unerwünschte Wirkungen hervorrufen (*UGT1A1*\*28-Allel unter Irinotecan) oder gar zur Wirkungslosigkeit des Arzneimittels führen (*CYP2D6*\*4 und \*10-Allele unter Tamoxifen). Optimal wäre es, wenn man unerwünschte Wirkungen mit nahezu 100%iger Sicherheit vorhersagen und die Auswahl des einzusetzenden Arzneimittels vom Genotyp des Patienten abhängig machen könnte (*HLA-B*\*5701-Allel unter Abacavir).

Für die Gene der Komponenten des *N*-reduktiven Enzymsystems sind zahlreiche Polymorphismen beschrieben, die in allen Bereichen der Gene auftreten können, aber nicht funktionell charakterisiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zum Aminosäureaustausch führenden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) näher untersucht. Vier SNPs in *MARC1* (c.493A>G, c.560T>A, c.736T>A und c.739G>C) und zwei SNPs in *MARC2* (c.730G>A und c.735T>G) wurden für eine Genotypisierung ausgewählt und die Genotypenfrequenzen an einer Kohorte von 340 gesunden Kaukasiern mittels Pyrosequencing bestimmt. Die Ergebnisse zeigten insgesamt eine nur geringe Frequenzhäufigkeit der Varianten in der untersuchten Kohorte. Lediglich für einen SNP in *MARC1* (c.493A>G) konnte die homozygote Variante mit einer Frequenz von 7,1% detektiert werden. Dieser führte zur Proteinvariante A165T.

Die Proteinvarianten sollten in *E. coli* exprimiert und am Modellsubstrat der Amidoxim-Prodrugs, Benzamidoxim, funktionell charakterisiert werden.

Alle ausgewählten mARC-Proteinvarianten (mARC-1: V96L, A165T, M187K, C246S, D247H und M268I; mARC-2: G244S und C245W) waren in *E. coli* exprimierbar und besaßen den für die Aktivität notwendigen Molybdäncofaktor. Im optimierten *in vitro* Testsystem wurden die kinetischen Parameter am Substrat Benzamidoxim erhoben. Die katalytische Effizienz war für die Varianten G244S und C245W im Vergleich zu ihrem Wildtypprotein ( $p < 0,05$ , ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test) signifikant erniedrigt, auch die katalytische Effizienz des mARC-2-Wildtypproteins war im Vergleich zum mARC-1-Wildtypprotein deutlich geringer ( $p = 0,005$ , t-Test). Die einzige Proteinvariante, für die homozygote Träger in der Kohorte nachgewiesen wurden, A165T, zeigte dagegen keinen Unterschied in der katalytischen Effizienz gegenüber ihrem Wildtypprotein.

Die vier anhand von Datenbankfrequenzen ausgewählten Cytochrom  $b_5$  Typ B-Varianten S2F, D14G, K16E und T22A ließen sich ebenfalls problemlos in *E. coli* exprimieren und hatten alle Häm als Cofaktor gebunden. *In vitro* verhielten sie sich unauffällig und zeigten am Modellsubstrat Benzamidoxim *N*-reduktive Aktivität, die Werte lagen innerhalb der Standardabweichung der Werte der Wildtypproteine.

Unter den untersuchten 12 Proteinvarianten des *N*-reduktiven Enzymsystems befand sich also keine, die die *N*-reduktive Aktivität *in vitro* signifikant beeinflusste und homozygote Träger bei Kaukasiern aufwies. Folglich dürfte die Prodrugaktivierung von diesen 12 Proteinvarianten nicht beeinflusst werden.

Auf Mehrfachmutationen reagierte das System empfindlicher. Es wurden in *MARC1* nacheinander sechs Mutationen in der Reihenfolge einer abnehmenden Wahrscheinlichkeit für das variante Allel eingebracht, d.h. die resultierenden Proteine wurden nacheinander um jeweils einen Aminosäureaustausch in der Reihenfolge A165T > M187K > V96L > C246S > D247H > M268I ergänzt. Alle Varianten ließen sich exprimieren und hatten den Molybdäncofaktor gebunden. Ab der Dreifachvariante sank die katalytische Effizienz auf Werte unter 20% im Vergleich zum Wildtypen. Da die Einfachvarianten keine Unterschiede in der katalytischen Effizienz zeigten, waren vermutlich mehrere Aminosäuren gleichzeitig an der Substratbindung beteiligt.

Polymorphismen können zu Arzneimittelnebenwirkungen führen. Die Beteiligung des *N*-reduktiven Enzymsystems an der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin wurde *in vitro* sichergestellt. Die Aktivität war in den subzellulären porcinen Fraktionen der Leber und Schilddrüse angereichert und verlief NADH-abhängig. Im

Enzymsystem aus rekombinanten humanen Proteinen lief die Reduktion nur in Gegenwart aller drei Komponenten ab. Es wurde der Einfluss der mARC- und Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Proteinvarianten auf die Reduktion untersucht. Es konnten aber keine signifikanten Veränderungen in der jeweiligen Aktivität nachgewiesen werden, d.h die untersuchten Proteinvarianten üben wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Pathogenese der Hypersensitivitätsnebenwirkung unter Sulfamethoxazol aus. Das Substrat zeigte im Gegensatz zu Benzamidoxim eine höhere katalytische Effizienz für mARC-2. Ein Einfluss auf die Pathogenese wäre nur noch über das Ausmaß der Proteinexpression denkbar.

Erste Versuche, einen prädiktiven Biomarkertest bezüglich der ALAT-Erhöhung unter Ximelagatran zu etablieren, zeigten Wechselwirkungen zwischen dem rekombinant hergestellten löslichen HLA-Molekül DRB1\*0701 und Melagatran. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Allele, die Positivprobe (DRB1\*0701) und der Negativkontrolle (DRB1\*1502), unter definierten Bedingungen unterschieden werden konnten.

Diese *Capture* Versuche wurden von der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH durchgeführt.

Es gibt viele Arten von genetischen Polymorphismen und Datenmengen darüber, die stetig wachsen. Um allgemeingültige Aussagen bezüglich der Beeinflussung der Funktion des humanen *N*-reduktiven Enzymsystems machen zu können, muss es noch vollständiger charakterisiert werden. Mögliche weitere Ansätze sind: (i) Die Durchsequenzierung der vier Gene des *N*-reduktiven Enzymsystems an einer großen Kohorte. Dadurch kann man zum einen überprüfen, ob es noch weitere häufige SNPs gibt, die funktionell zu charakterisieren sind, und zum anderen bestätigen, dass in Positionen, für die keine Frequenzdaten in Datenbanken verfügbar sind, auch tatsächlich keine SNPs auftreten. (ii) Die Untersuchung der Auswirkungen von Varianten des Membranankers auf das mitochondriale Targeting der mARC-Proteine nach der von Klein *et al.* 2012 vorgestellten Methode. (iii) Die Untersuchung der Auswirkungen von SNPs in der 3'-UTR auf die Proteinexpression mittels Reporterassay. (iv) Die Untersuchung der Auswirkungen synonyme SNPs und SNPs im intronischen Bereich auf die Pharmakokinetik nach Gabe eines zugelassen Amidoximprodrugs. (v) Epigenetische Untersuchungen.

Desweiteren ist die Substratbindung am mARC-Protein noch nicht geklärt. Diese Arbeit lieferte den ersten Hinweis, dass in mARC-1 wahrscheinlich mehrere

Aminosäuren an der Substratbindung beteiligt sind. Die Expression weiterer Mehrfachvarianten und deren Untersuchung an verschiedenen Substraten könnten entscheidende Hinweise für die Substratbindung liefern.

Bezüglich des Biomarkertest könnte in anschließenden *Capture*-Versuchen in Kooperation mit der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH die Probenanzahl von positiven und negativen Proben erhöht werden, um die Zuverlässigkeit der Detektion des DRB1\*0701-Allels zu bestimmen. Ebenso wäre zu klären, ob man auch eine Wechselwirkung mit dem DQA1\*02-Allel detektieren könnte, das in der Untersuchung von Kindmark *et al.* zunächst eine starke genetische Assoziation gezeigt hatte, aber in den folgenden immunologischen Studien nicht detektiert worden ist.



## 8. ANHANG

### 8.1. ANHANG ZU KAPITEL 2

#### 8.1.1. Abbildungen

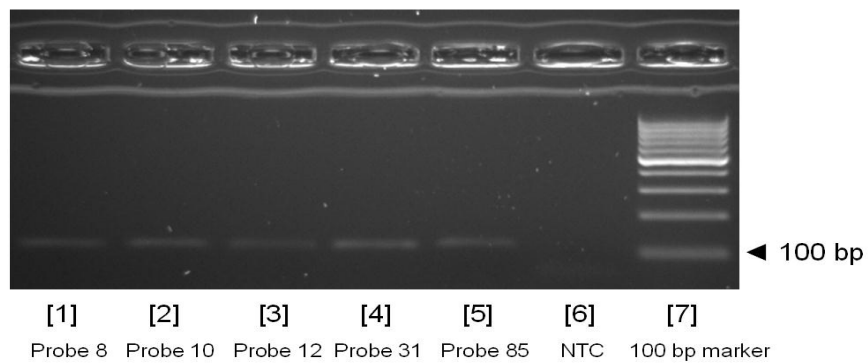


Abb. 8.1: Kontrolle der Länge des PCR-Produktes mittels Elektrophorese. Gezeigt ist das Gelbild aus Platte I MARC1\_A576T vom 24.08.2009 mit [1] bis [5] = Proben, [6] = NTC, *no template containing*, Negativkontrolle, [7] = *DNA ladder*

## 8.2. ANHANG ZU KAPITEL 3

### 8.2.1. Abbildungen

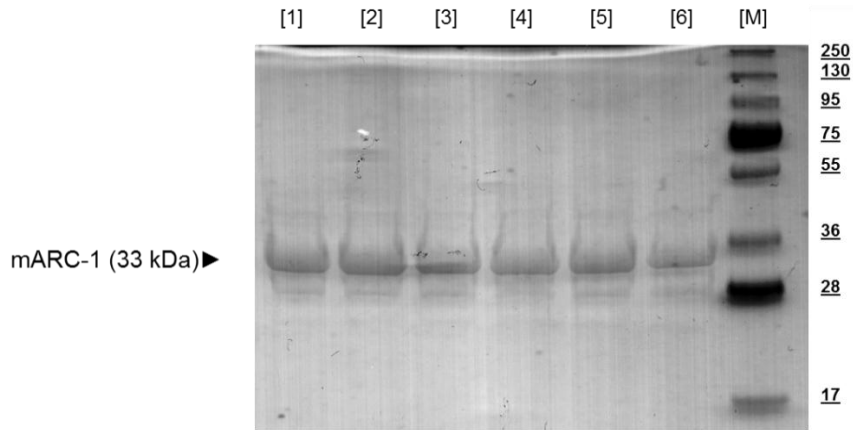


Abb. 8.2: Prüfung der rekombinant hergestellten Proteine auf Reinheit. Das SDS-Gel zeigt mARC-1-Wildtypproteine und Varianten.

10 µg Protein wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie (Roti<sup>®</sup>-Blue) gefärbt. [1] mARC-1 # 07.09.10, [2] V96L # 07.09.10, [3] C246S # 07.09.10, [4] M268I # 07.09.10, [5] mARC-1 # 25.01.10, [6] C246S # 25.01.10, [M] PageRuler<sup>™</sup> Plus Prestained Protein Ladder (250, 130, 95, 75, 55, 36, 28, 17 kDa)

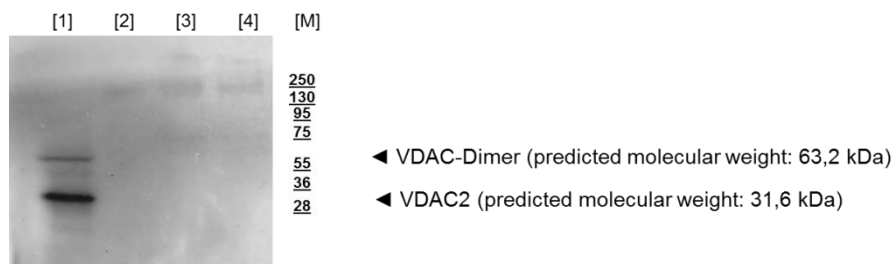


Abb. 8.3 Westernblotanalyse der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen mit dem anti-VDAC2-Antikörper

10 µg Protein wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot wurde mit dem anti-VDAC2-Primärantikörper (1:1.000) und dem anti-goat-Sekundärantikörper (1:10.000) inkubiert und 3,5 Minuten entwickelt; [1] SThyMt, [2] SThyMs, [3] SThyCyt, [4] SThyPNS, [M] PageRuler<sup>™</sup> Plus Prestained Protein Ladder (250, 130, 95, 75, 55, 36, 28, 17 kDa).

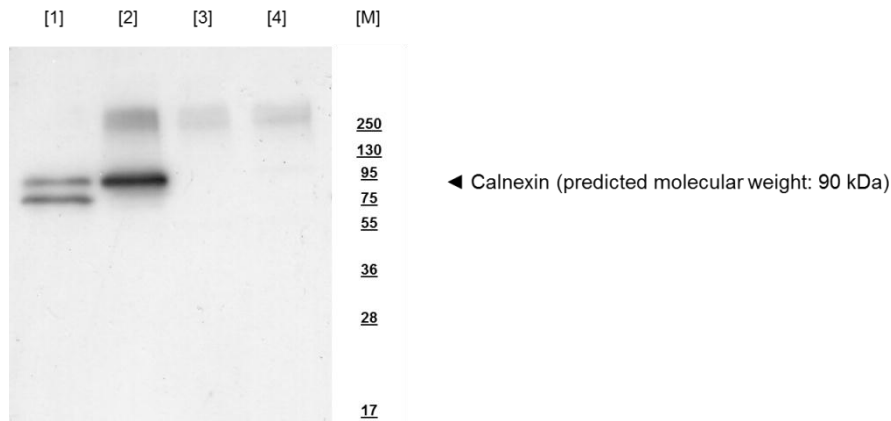


Abb. 8.4: Westernblotanalyse der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen mit dem anti-Calnexin-Antikörper

10 µg Protein wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot wurde mit dem anti-Calnexin-Primärantikörper (1:10.000) und dem anti-rabbit-Sekundärantikörper (1:10.000) inkubiert und 1 Minute entwickelt; [1] SThyMt, [2] SThyMs, [3] SThyCyt, [4] SThyPNS, [M] PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (250, 130, 95, 75, 55, 36, 28, 17 kDa).

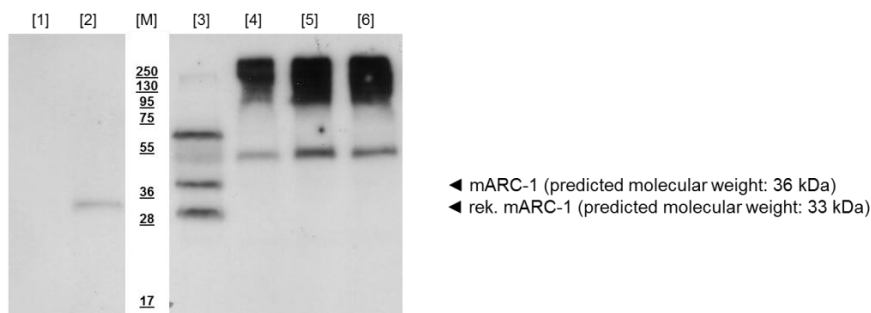


Abb. 8.5: Westernblot der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen mit dem anti-mARC-1-Antikörper

Jeweils 10 µg Protein aus den subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen und 0,01 µg der rekombinant hergestellten mARC-1- und mARC-2-Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot wurde mit dem anti-mARC-1-Primärantikörper (1:10.000) und dem anti-rabbit-POD-Sekundärantikörper (1:10.000) inkubiert und 5 Minuten entwickelt; [1] rekombinantes mARC-2 [2] rekombinantes mARC-1 [M] PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (250, 130, 95, 75, 55, 36, 28, 17 kDa) [3] SThyMt, [4] SThyMs, [5] SThyCyt, [6] SThyPNS.

## 8 ANHANG (ZU KAPITEL 3)

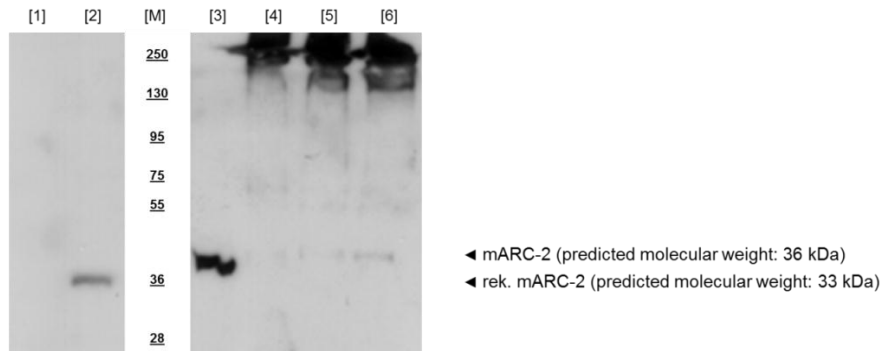


Abb. 8.6: Westernblot der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen mit dem anti-mARC-2 - Antikörper

Jeweils 10 µg Protein aus den subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen und 0,05 µg der rekombinant hergestellten mARC-1- und mARC-2-Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot wurde mit dem anti-mARC-2-Primärantikörper (1:10.000) und dem anti-rabbit-POD-Sekundärantikörper (1:10.000) inkubiert und 30 Sekunden entwickelt; [1] rekombinantes mARC-1 [2] rekombinantes mARC-2 [M] PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (250, 130, 95, 75, 55, 36, 28, 17 kDa) [3] SThyMt, [4] SThyMs, [5] SThyCyt, [6] SThyPNS.

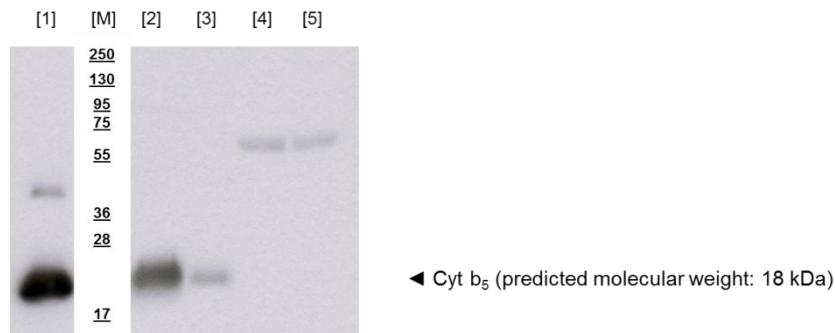


Abb. 8.7: Westernblot der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen mit dem anti-CYB5B-Antikörper

Jeweils 10 µg Protein aus den subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen und 0,05 µg des rekombinant hergestellten Cyt b<sub>5</sub> Typ B wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot wurde mit dem anti-CYB5B-Primärantikörper (1:10.000) und dem anti-rabbit-POD-Sekundärantikörper (1:10.000) inkubiert und 3 Minuten entwickelt; [1] rek. Cyt. b<sub>5</sub> Typ B, [M] PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (250, 130, 95, 75, 55, 36, 28, 17 kDa), [2] SThyMt, [3] SThyMs, [4] SThyCyt, [5] SThyPNS

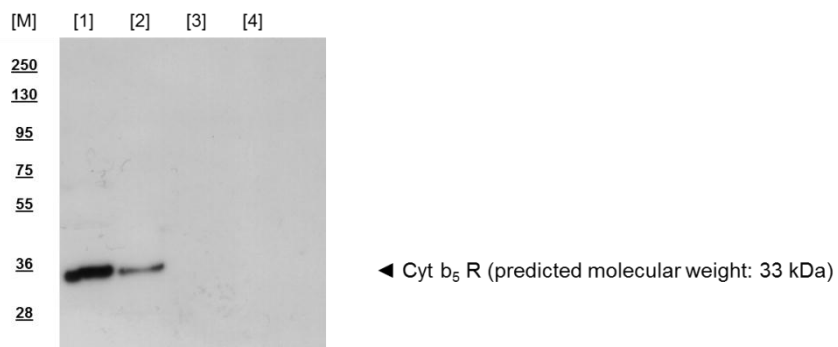


Abb. 8.8: Westernblot der subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen

Jeweils 12 µg Protein aus den subzellulären porcinen Schilddrüsenfraktionen und 0,083 µg der rekombinant hergestellten NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase wurden unter reduzierenden Bedingungen über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mit dem anti-CYB5BR3-Primärantikörper (1:1.000) und dem anti-rabbit-POD-Sekundärantikörper (1:10.000) inkubiert und 30 Sekunden entwickelt; [M] PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (250, 130, 95, 75, 55, 36, 28, 17 kDa), [1] SThyMt, [2] SThyMs, [3] SThyCyt, [4] SThyPNS.

## 8.2.2. Tabellen

WT	Variante	Protein- gehalt (mg / ml)	Molybdän- gehalt (nmol / mg)	Häm- gehalt (nmol / mg)	FAD- Gehalt (nmol / mg)
<b>mARC</b>					
mARC-1 # 25.01.10		15,89	23,46		
	C246S # 25.01.10	5,65	22,34		
mARC-1 # 22.02.10		9,83	17,76		
	A165T # 22.02.10	6,82	18,00		
	M187K # 22.02.10	6,77	24,78		
	D247H # 22.02.10	8,90	16,73		
mARC-1 # 07.09.10		3,53	24,22		
	V96L # 07.09.10	2,75	26,34		
	C246S # 07.09.10	3,28	24,95		
	M268I # 07.09.10	2,70	29,14		
mARC-1 # 12.10.11		16,21	17,79		
	A165T # 12.10.11	16,05	14,35		
	M187K # 12.10.11	14,50	22,98		
	D247H # 12.10.11	14,41	18,03		
mARC-1 # 23.07.12		5,71	22,27		
	1-fach Mutante # 23.07.12	5,32	18,73		
	2-fach Mutante # 23.07.12	5,06	22,33		
	4-fach Mutante # 23.07.12	4,28	25,55		
mARC-1 # 30.07.12		8,13	20,38		
	3-fach Mutante # 30.07.12	5,81	25,88		
	5-fach Mutante # 30.07.12	4,22	21,59		
	6-fach Mutante # 30.07.12	4,46	20,92		
mARC-2 # 18.02.10		8,61	17,29		

8 ANHANG (ZU KAPITEL 3)

	G244S # 18.02.10	9,14	17,44		
mARC-2 # 22.07.10		3,77	24,31		
	C245W # 22.07.10	3,63	21,19		
mARC-2 # 17.01.11		2,05	26,16		
	C245W # 17.01.11	1,95	22,16		
mARC-2 # 01.08.12		8,74	12,50		
	1-fach Mutante # 01.08.12	7,27	12,94		
	2-fach Mutante # 01.08.12	5,69	14,65		
<b>Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B</b>					
Cyt b <sub>5</sub> # 27.01.10		19,93		2,87	
Cyt b <sub>5</sub> # 15.02.11		12,18		2,11	
	T22A # 15.02.11	9,44		1,71	
Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11a		13,24		2,58	
Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11b		15,54		1,32	
	D14G # 23.02.11	13,37		2,34	
	K16E # 23.02.11	11,29		5,76	
Cyt b <sub>5</sub> # 18.05.11		16,42		5,70	
	S2F # 18.05.11	14,36		7,07	
<b>NADH Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase</b>					
Cyt b <sub>5</sub> R # 27.01.10		16,48			16,93

Tab. 8.1: Zusammenfassende Übersicht der Mittelwerte der Protein- und Cofaktorgehalte der untersuchten rekombinant hergestellten humanen Proteine

8 ANHANG (ZU KAPITEL 3)

	<b>Mo-Gehalt verdünnte Probe (nmol / mg Protein)</b>	<b>Mo-Gehalt umgepufferte Probe (nmol / mg Protein)</b>	<b>MW (nmol / mg Protein)</b>	<b>STABW (nmol / mg Protein)</b>	<b>STABW (%)</b>
<b>mARC-1</b>					
mARC-1 # 25.01.10	20,34	26,57	23,46	4,41	19
C246S # 25.01.10	21,55	23,13	22,34	1,12	5
mARC-1 # 22.02.10	18,18	17,33	17,76	0,60	3
A165T # 22.02.10	17,85	18,15	18,00	0,21	1
M187K # 22.02.10	21,17	28,39	24,78	5,11	21
D247H # 22.02.10	15,72	17,73	16,73	1,42	8
mARC-1 # 07.09.10	27,13	21,30	24,22	4,12	17
V96L # 07.09.10	30,18	22,49	26,34	5,44	21
C246S # 07.09.10	28,37	21,53	24,95	4,84	19
M268I # 07.09.10	33,25	25,03	29,14	5,81	20
<b>mARC-2</b>					
mARC-2 # 18.02.10	15,59	18,99	17,29	2,40	14
G244S # 18.02.10	14,89	19,99	17,44	3,61	21
mARC-2 # 22.07.10	24,50	24,12	24,31	0,27	1
C245W # 22.07.10	22,02	20,36	21,19	1,17	6

Tab. 8.2: Molybdängehalte vor und nach Umpuffern der einzelnen Proben, angegeben sind jeweils die Mittelwerte



8 ANHANG (ZU KAPITEL 3)

<b>mARC-Protein</b>	<b>Mo-Gehalt (nmol / mg Protein)</b>	<b>Mo-Saturierung (%)</b>
Messung 1		
mARC-1 # 25.01.10	23,46	78
C246S # 25.01.10	22,34	74
mARC-1 # 22.02.10	17,76	59
A165T # 22.02.10	18,00	60
M187K # 22.02.10	24,78	82
D247H # 22.02.10	16,73	55
mARC-1 # 07.09.10	24,22	80
V96L # 07.09.10	26,34	87
C246S # 07.09.10	24,95	83
M268I # 07.09.10	29,14	97
mARC-2 # 18.02.10	17,29	58
G244S # 18.02.10	17,44	58
mARC-2 # 22.07.10	24,31	81
C245W # 22.07.10	21,19	71
Messung 2		
mARC-1 # 12.10.11	17,79	59
A165T # 12.10.11	14,35	48
M187K # 12.10.11	22,98	76
D247H # 12.10.11	18,03	60
mARC-2 # 17.01.11	26,16	87
C245W # 17.01.11	22,16	74
Messung 3		
mARC-1 # 23.07.12	22,27	74
1-fach Mutante # 23.07.12	18,73	62
2-fach Mutante # 23.07.12	22,33	74
4-fach Mutante # 23.07.12	25,55	85

8 ANHANG (ZU KAPITEL 3)

mARC-1 # 30.07.12	20,38	68
3-fach Mutante # 30.07.12	25,88	86
5-fach Mutante # 30.07.12	21,59	72
6-fach Mutante # 30.07.12	20,92	69
mARC-2 # 01.08.12	12,50	41
1-fach Mutante # 01.08.12	12,94	43
2-fach Mutante # 01.08.12	14,65	49

Tab. 8.3: Mittelwerte der Molybdängehalte der mARC-Proteine und deren Saturierung mit Molybdän

Subzelluläre Fraktionen der Schweineleber # 13.01.10			
Proteingehalt (mg / ml)			
SLMt	SLMs	SLCyt	SLHom
38,6 ± 1,5	57,8 ± 4,0	20,3 ± 1,6	37,6 ± 2,1
Subzelluläre Fraktionen der Schweineschilddrüse # 06.04.11			
Proteingehalt (mg / ml)			
SThyMt	SThyMs	SThyCyt	SThyPNS
0,9 ± 0,3	7,8 ± 0,2	12,5 ± 0,8	13,6 ± 1,2

Tab. 8.4: Proteingehalte der in dieser Arbeit untersuchten subzellulären porcinen Fraktionen

## 8.3. ANHANG ZU KAPITEL 4

## 8.3.1. Abbildungen

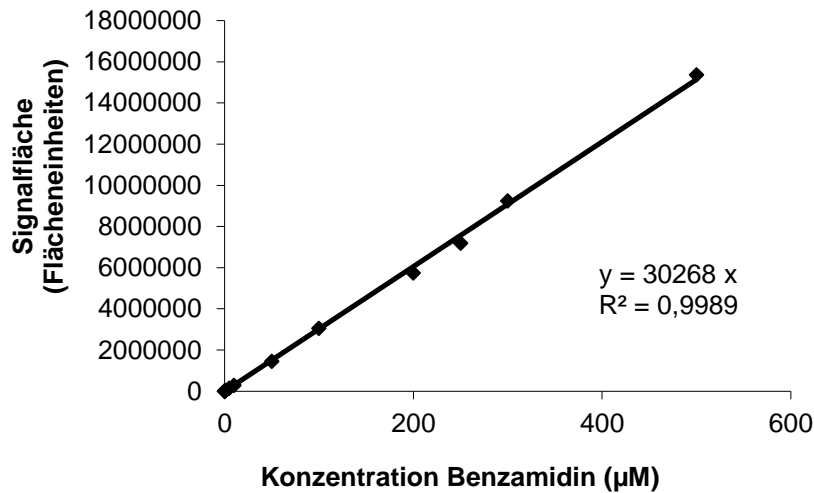


Abb. 8.9: Kalibrierung von Benzamidin in Fließmittel im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 500 µM. Die ermittelten Flächeneinheiten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei Ansätzen, die doppelt vermessen wurden.

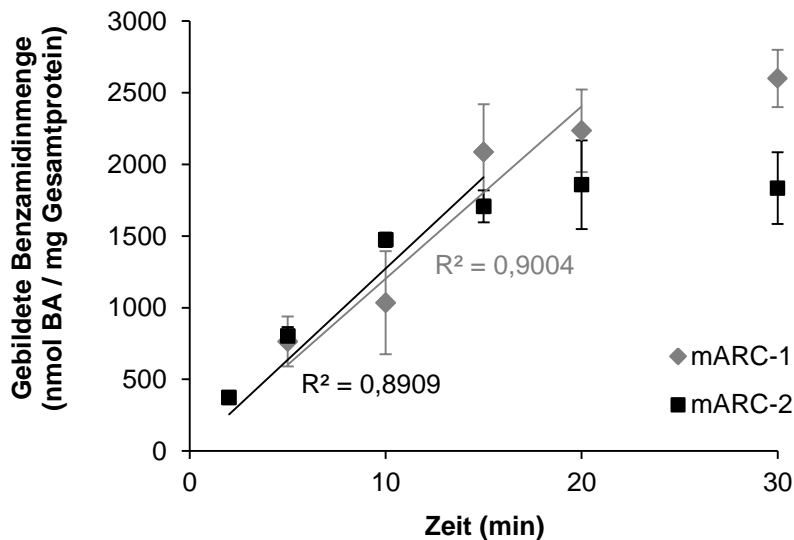


Abb. 8.10: Zeitabhängigkeiten für mARC-1 und mARC-2

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 22.02.10 bzw. mARC-2 # 18.02.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 0 bis 30 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

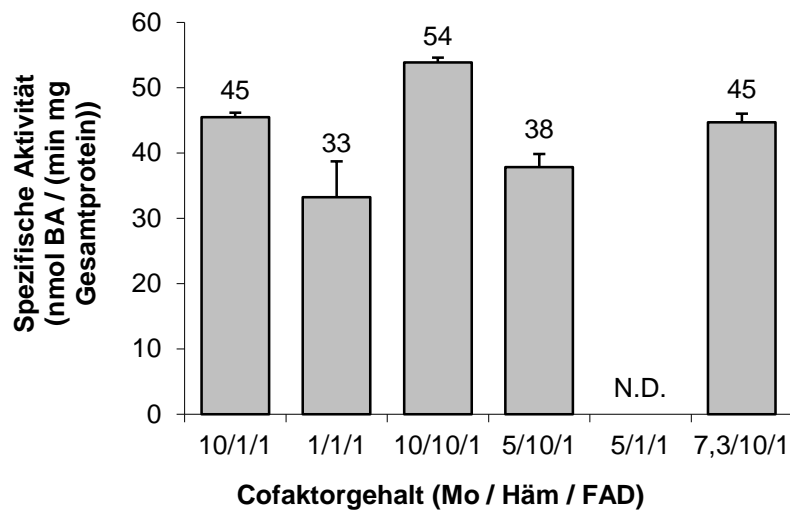


Abb. 8.11: Ermittlung der optimalen Stöchiometrie bei einem Gesamtcofaktorgehalt von 125 pmol. Die Inkubationsansätze bestanden aus 125 pmol Cofaktoren (mARC-2 # 18.02.10, Cyt  $b_5$  # 27.01.10 und Cyt  $b_5$  R # 27.01.10 in wechselnden Verhältnissen), 0,5 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu$ l). Für die mARC-Charge wurde zunächst ein Molybdängehalt von 10 nmol Mo / mg Protein angenommen. Nach der ICP-MS-Messung wurde festgestellt, dass er tatsächlich bei 17 nmol /mg Protein lag. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

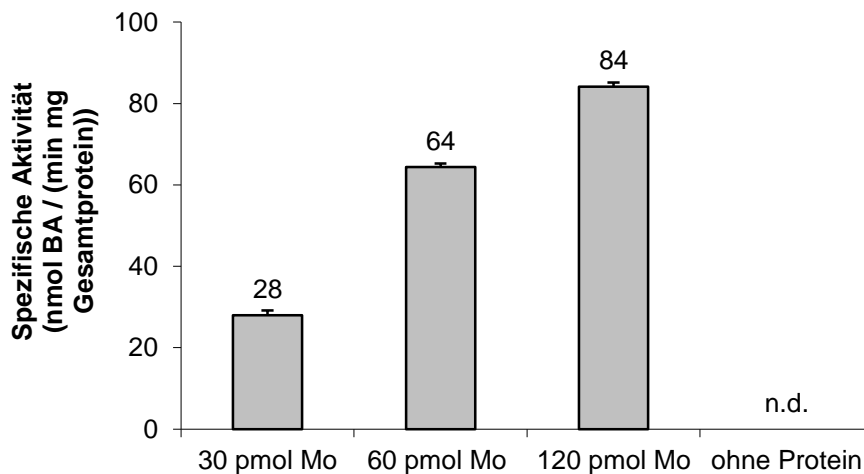


Abb. 8.12: spezifische Umsatzraten bei variabler Mo-Cofaktormenge im Inkubationsansatz. Die Inkubationsansätze bestanden aus 30 bis 120 pmol Mo (mARC-2 # 18.02.10), 60 pmol Häm (Cyt  $b_5$  # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt  $b_5$  R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu$ l). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. (n.d. = nicht detektierbar)

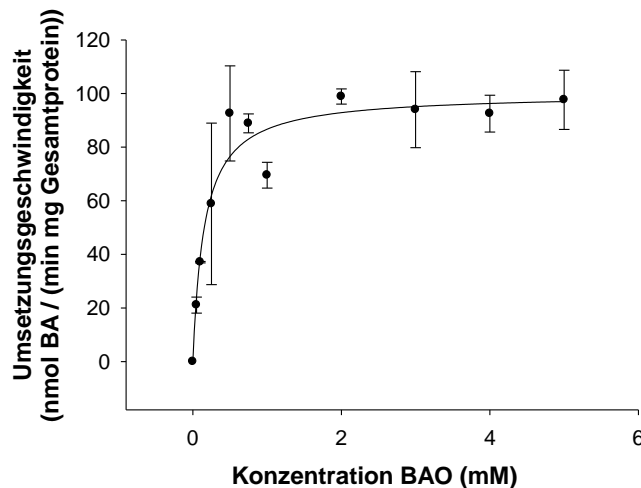


Abb. 8.13: Substratabhängigkeit Benzamidoxim eines mARC-1-Wildtyp-Proteins

Die Inkubationsansätze bestanden aus 6  $\mu\text{g}$  mARC (mARC-1 # 25.01.10), 60 pmol Häm (Cyt  $b_5$  # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt  $b_5$  R # 27.01.10), 0 bis 5 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu\text{l}$ ). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden mit SigmaPlot 11.0 ermittelt.

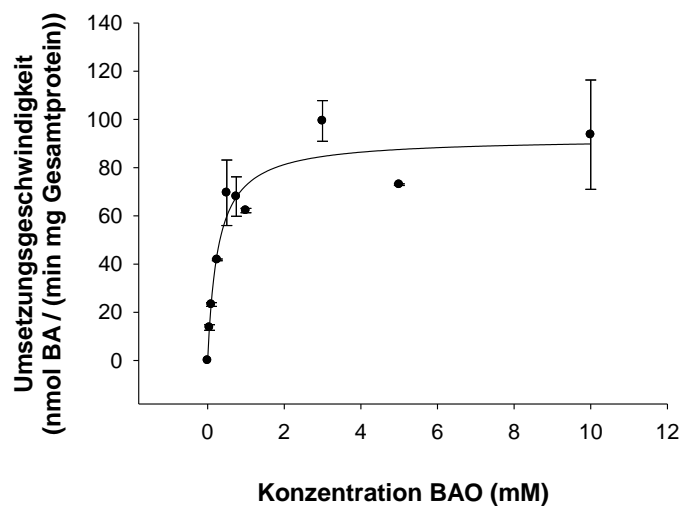


Abb. 8.14: Substratabhängigkeit Benzamidoxim eines mARC-2-Wildtyp-Proteins

Die Inkubationsansätze bestanden aus 6  $\mu\text{g}$  mARC (mARC-2 # 18.02.10), 60 pmol Häm (Cyt  $b_5$  # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt  $b_5$  R # 27.01.10), 0 bis 10 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu\text{l}$ ). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden mit SigmaPlot 11.0 ermittelt.

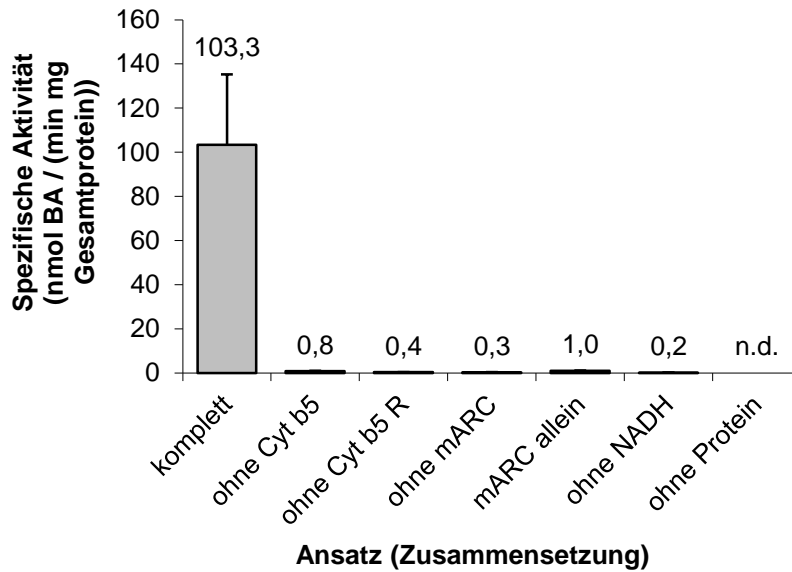


Abb. 8.15: Standardinkubationssatz mit mARC-1

Der Komplettansatz bestand aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 22.02.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. (n.d. = nicht detektierbar)

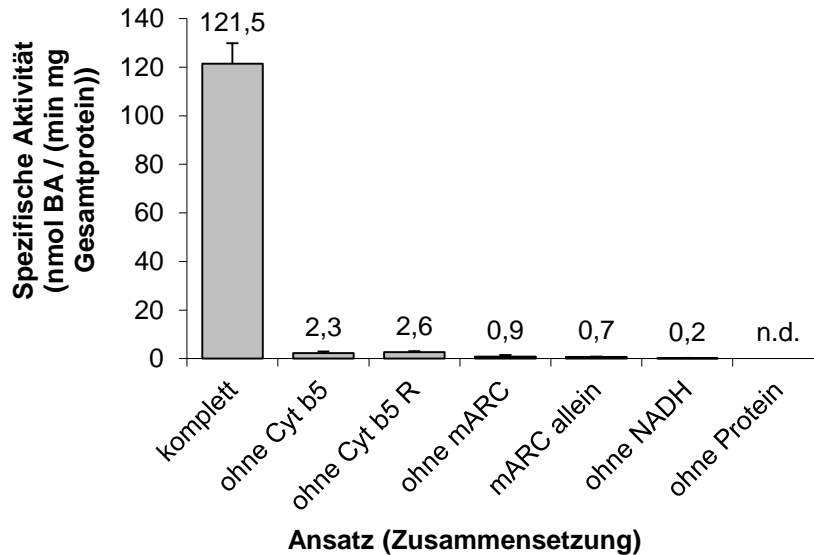


Abb. 8.16: Standardinkubationssatz mit mARC-2

Der Komplettansatz bestand aus 120 pmol Mo (mARC-2 # 17.01.11), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. (n.d. = nicht detektierbar)

## 8.3.2. Tabellen

mARC-Protein (Charge)	$V_{\max}$ ((nmol BA / (min mg Gesamtprotein))	$V_{\max}$ (nmol BA / min)	$K_m$ (mM BAO)	$k_{\text{cat}} / K_m$ (1 / (s M))
<b>mARC-1</b>				
mARC-1 # 25.01.10	100,3 ± 18,5	2,78 ± 0,60	0,21 ± 0,13	1317 ± 415
C246S # 25.01.10	98,3 ± 22,9	2,73 ± 0,64	0,22 ± 0,15	1326 ± 552
mARC-1 # 22.02.10	122,1 ± 12,0	3,45 ± 0,57	0,24 ± 0,11	1459 ± 406
A165T # 22.02.10	99,7 ± 5,8	2,81 ± 0,33	0,22 ± 0,09	1266 ± 336
M187K # 22.02.10	119,5 ± 10,7	3,52 ± 0,44	0,32 ± 0,16	1260 ± 826
D247H # 22.02.10	115,9 ± 19,4	3,30 ± 0,49	0,25 ± 0,09	1382 ± 439
mARC-1 # 07.09.10	119,9 ± 21,8	3,50 ± 0,43	0,20 ± 0,08	1629 ± 362
V96L #07.09.10	138,2 ± 24,3	4,08 ± 1,15	0,28 ± 0,13	1431 ± 464
C246S # 07.09.10	88,0 ± 22,1	2,53 ± 0,35	0,19 ± 0,05	1247 ± 368
M268I # 07.09.10	94,0 ± 18,0	2,65 ± 0,21	0,21 ± 0,07	1265 ± 546
mARC-1 # 12.10.11	78,4 ± 9,5	2,57 ± 0,06	0,26 ± 0,14	1062 ± 517
A165T # 12.10.11	149,8 ± 7,4	4,97 ± 0,56	0,54 ± 0,17	863 ± 167
M187K # 12.10.11	88,6 ± 19,7	2,70 ± 0,60	0,36 ± 0,08	678 ± 40
D247H # 12.10.11	110,6 ± 19,8	3,58 ± 1,00	0,30 ± 0,06	1067 ± 185
<b>mARC-2</b>				
mARC-2 # 18.02.10	106,1 ± 12,8	3,00 ± 0,55	0,35 ± 0,09	826 ± 101
G244S # 18.02.10	84,1 ± 10,3	2,36 ± 0,16	0,39 ± 0,07	583 ± 36
mARC-2 # 22.07.10	90,2 ± 8,0	2,51 ± 0,30	0,28 ± 0,05	809 ± 154
C245W # 22.07.10	39,4 ± 2,6	1,09 ± 0,07	0,21 ± 0,07	502 ± 145
mARC-2 # 17.01.11	161,0 ± 17,7	4,78 ± 0,26	0,42 ± 0,06	1039 ± 129
C245W # 17.01.11	55,7 ± 10,7	1,70 ± 0,26	0,19 ± 0,04	791 ± 33

Tab. 8.5: Kinetische Parameter der einzelnen mARC-Proteine

## 8 ANHANG (ZU KAPITEL 4)

---

Die Inkubationsansätze bestanden aus mARC, Cyt b<sub>5</sub> und Cyt b<sub>5</sub> R, 0 bis max. 10 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 20 mM MES pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen drei Inkubationen mit zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden mit SigmaPlot 11.0 ermittelt. Bei Vorliegen einer Substratüberschusshemmung wurden die apparenten kinetischen Parameter berechnet.



## 8.3.3. Substratabhängigkeiten der mARC-Proteine mit Benzamidoxim

## mARC-1 # 25.01.10

	<p>Inkubation vom 21.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 99,98 \pm 4,72</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,15 \pm 0,04</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 18.06.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 81,93 \pm 4,58</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 0,11 \pm 0,03</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 07.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 118,96 \pm 5,27</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 0,36 \pm 0,04</math> mM BAO</p>

mARC-1 C246S # 25.01.10

	<p>Inkubation vom 25.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 119,57 \pm 2,70 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,17 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 18.06.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 3 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 74,13 \pm 2,34 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,10 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 101,22 \pm 0,51 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,39 \pm 0,01 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 30.04.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 110,48 \pm 4,05 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,17 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 28.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 3 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 121,41 \pm 3,40 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,19 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 134,42 \pm 1,03 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,37 \pm 0,01 \text{ mM BAO}</math></p>

mARC-1 A165T # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 07.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 110,71 \pm 4,04 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,19 \pm 0,04 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 28.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 3 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 93,46 \pm 5,87 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,16 \pm 0,04 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 104,84 \pm 1,10 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,32 \pm 0,01 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 M187K # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 19.09.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 130,75 \pm 0,82 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,14 \pm 0,00 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 109,55 \pm 0,40 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,36 \pm 0,01 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 21.03.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 118,17 \pm 1,54 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,45 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 D247H # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 10.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 99,39 \pm 4,94 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,17 \pm 0,04 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 28.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 3 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 137,29 \pm 0,76 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,23 \pm 0,01 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 111,14 \pm 1,63 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,35 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 14.12.10 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 123,82 \pm 5,98 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,16 \pm 0,04 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 31.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 139,45 \pm 8,75 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,29 \pm 0,05 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 09.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 96,48 \pm 4,28 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,17 \pm 0,04 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 V96L # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 14.12.10 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 110,29 \pm 4,79 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,13 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 31.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 150,08 \pm 8,31 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,34 \pm 0,07 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 09.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 154,31 \pm 1,85 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,38 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>



## mARC-1 C246S # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 14.12.10 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 106,66 \pm 5,87 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,15 \pm 0,04 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 31.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 93,74 \pm 2,60 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,25 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 09.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 63,59 \pm 1,07 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,17 \pm 0,01 \text{ mM BAO}</math></p>

mARC-1 M268I # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 14.12.10 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 108,03 \pm 5,41 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,13 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 31.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 100,26 \pm 1,76 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,26 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 09.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 73,62 \pm 1,84 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,23 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 19.12.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 85,51 \pm 1,77 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,41 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 04.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 82,19 \pm 5,49 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,14 \pm 0,05 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 28.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 67,58 \pm 2,23 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,19 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 A165T # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 19.12.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 141,80 \pm 4,90 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,46 \pm 0,06 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 04.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 156,31 \pm 1,15 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,45 \pm 0,01 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 28.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 151,27 \pm 3,14 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,73 \pm 0,18 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 M187K # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 02.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 109,54 \pm 4,53 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,43 \pm 0,07 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 04.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 70,50 \pm 5,97 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,28 \pm 0,10 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 01.03.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 85,68 \pm 1,90 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,36 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-1 D247H # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 02.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 100,12 \pm 7,58 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,24 \pm 0,08 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 04.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 98,25 \pm 0,20 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,31 \pm 0,00 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 01.03.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 133,43 \pm 5,28 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,35 \pm 0,05 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-2 # 18.02.10

	<p>Inkubation vom 30.04.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 10 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 92,28 \pm 6,03</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,27 \pm 0,08</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 31.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 3 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 108,29 \pm 4,98</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,34 \pm 0,06</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 06.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 117,65 \pm 1,19</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 0,45 \pm 0,02</math> mM BAO</p>

## mARC-2 G244S # 18.02.10

	<p>Inkubation vom 18.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 85,56 \pm 2,02</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,40 \pm 0,04</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 31.05.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 4 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 93,65 \pm 5,41</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,45 \pm 0,09</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 06.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 73,20 \pm 2,20</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 0,32 \pm 0,04</math> mM BAO</p>



## mARC-2 # 22.07.10

	<p>Inkubation vom 15.12.10 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim..</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 86,29 \pm 1,71 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,24 \pm 0,02 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 06.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 84,94 \pm 1,71 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,34 \pm 0,03 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 99,38 \pm 4,66 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m = 0,27 \pm 0,05 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-2 C245W # 22.07.10

	<p>Inkubation vom 25.10.10 mit 6 µg mARC, 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,05 bis 5 mM Benzamidoxim..</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> $V_{\max \text{ apparent}} = 37,12 \pm 2,05 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)},$ $K_m \text{ apparent} = 0,17 \pm 0,05 \text{ mM BAO}$
	<p>Inkubation vom 15.12.10 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> $V_{\max \text{ apparent}} = 42,23 \pm 1,84 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)},$ $K_m \text{ apparent} = 0,16 \pm 0,03 \text{ mM BAO}$
	<p>Inkubation vom 06.02.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> $V_{\max \text{ apparent}} = 38,75 \pm 1,39 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)},$ $K_m \text{ apparent} = 0,29 \pm 0,04 \text{ mM BAO}$

## mARC-2 # 17.01.11

	<p>Inkubation vom 11.04.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim..</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 143,63 \pm 3,78 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,36 \pm 0,04 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 04.04.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 160,44 \pm 6,21 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,41 \pm 0,06 \text{ mM BAO}</math></p>
	<p>Inkubation vom 05.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 178,93 \pm 9,16 \text{ nmol BA / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m = 0,47 \pm 0,10 \text{ mM BAO}</math></p>

## mARC-2 C245W # 17.01.11

	<p>Inkubation vom 19.03.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 47,92 \pm 3,73</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,19 \pm 0,07</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 05.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 51,03 \pm 4,13</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,16 \pm 0,06</math> mM BAO</p>
	<p>Inkubation vom 03.01.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Benzamidoxim.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 68,09 \pm 5,43</math> nmol BA / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,24 \pm 0,09</math> mM BAO</p>

## 8.4. ANHANG ZU KAPITEL 5

## 8.4.1. Abbildungen

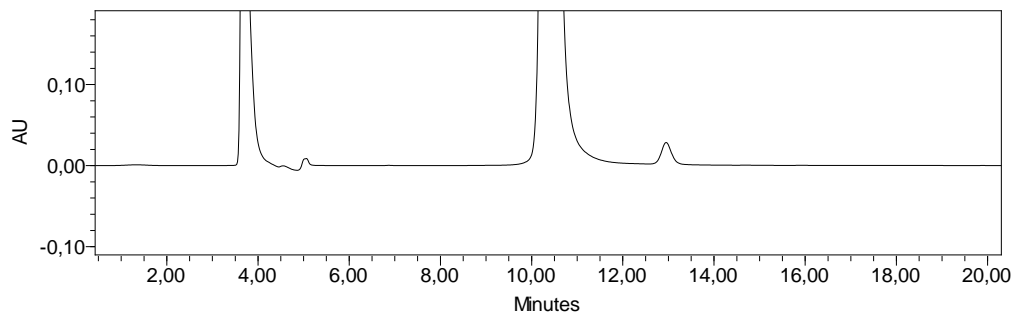


Abb. 8.17: HPLC-Chromatogramm zur Reinheit des Substrats SMX-HA

Es wurde eine 2 mM Lösung von SMX-HA in Fließmittel mit einem Zusatz von 0,3 mM Ascorbinsäure hergestellt und per HPLC vermessen. (Retentionszeit: SMX-HA 10,37 min, SMX 12,95 min)

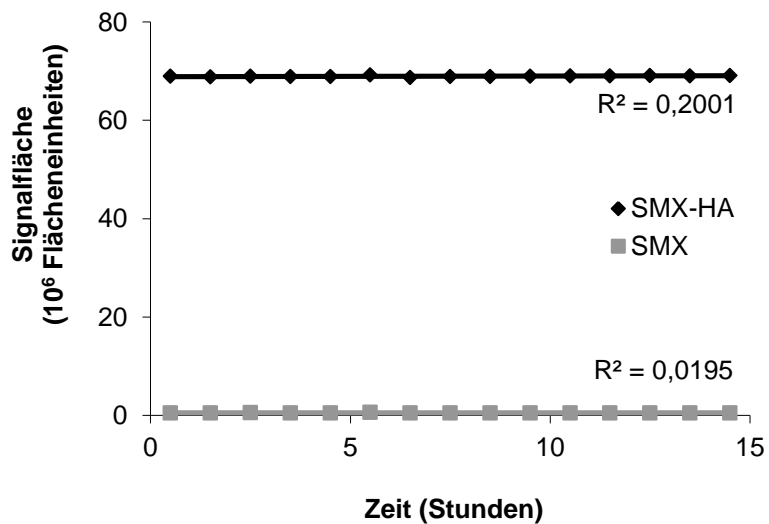


Abb. 8.18: Stabilität des Substrats SMX-HA nach Zusatz von Ascorbinsäure über 15 Stunden

Die ermittelten Flächeneinheiten sind Einzelwerte aus einem Ansatz, der zu 15 verschiedenen Zeitpunkten vermessen wurde.

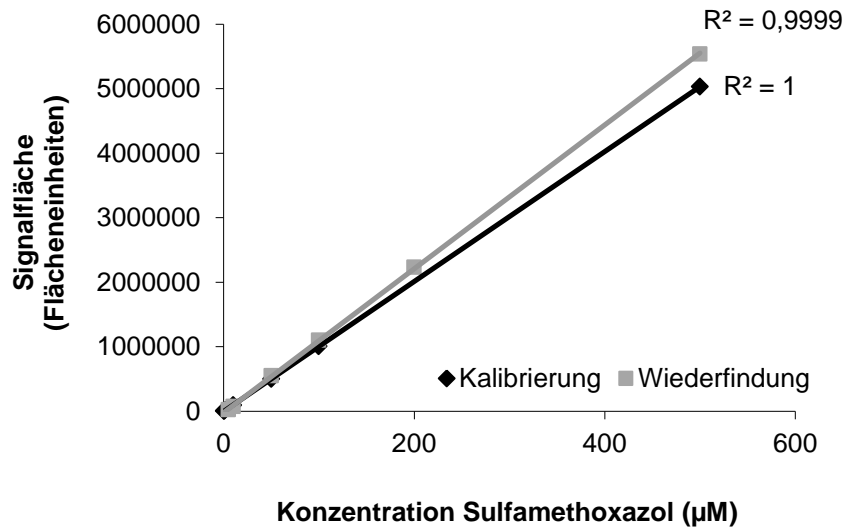


Abb. 8.19: Kalibrierung und Wiederfindung Sulfamethoxazol

Die ermittelten Flächeneinheiten sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die doppelt vermessen wurden.

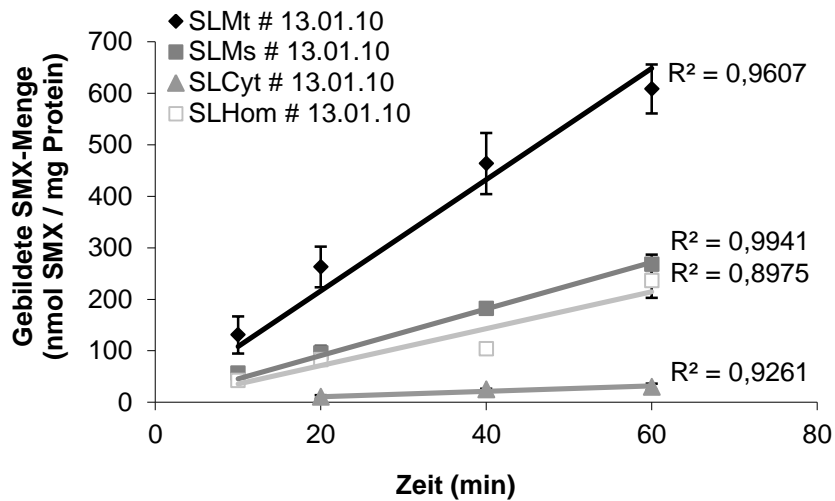


Abb. 8.20: Zeitabhängigkeit der subzellulären Fraktionen der Schweineleber

Die Inkubationsansätze bestanden aus 100 µg SLHom, 100 µg SLCyt, 100 µg SLMs bzw. 25 µg SLMt, 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 3,3% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 10 bis 60 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

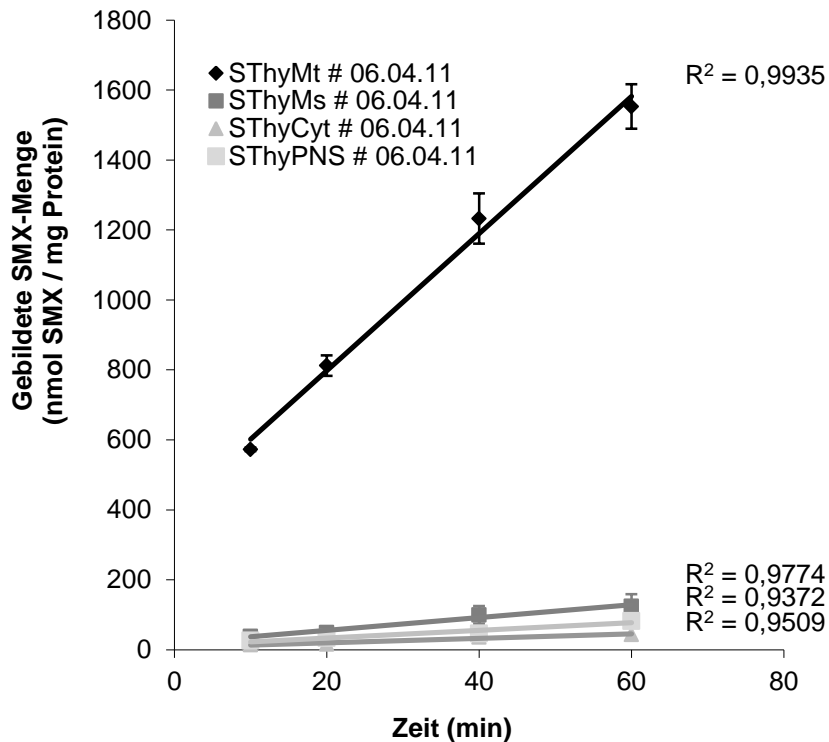


Abb. 8.21: Zeitabhängigkeit der subzellulären Fraktionen der Schweineschilddrüse

Die Inkubationsansätze bestanden aus 100 µg SThyPNS, 200 µg SThyCyt, 100 µg SThyMs bzw. 10 µg SThyMt, 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 3,3% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 10 bis 60 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

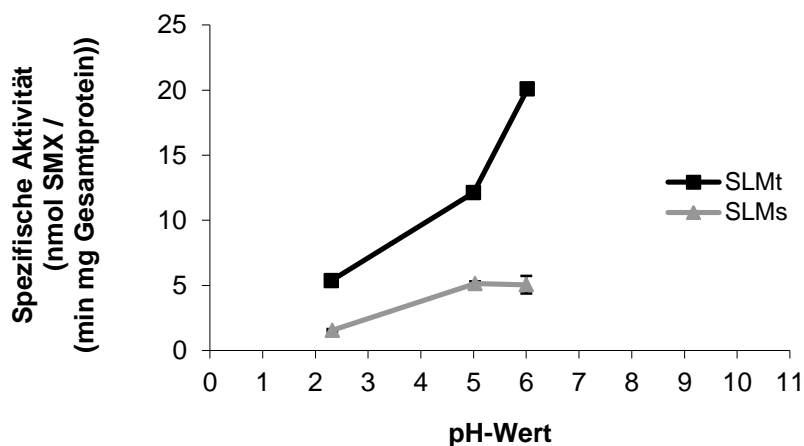


Abb. 8.22: pH-Abhängigkeit SLMs # 13.01.10 und SLMt # 13.01.10

Die Inkubationsansätze bestanden aus 100 µg SLMs bzw. 25 µg SLMt, 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in Mehrkomponentenpuffer eingestellt auf verschiedene pH-Werte (Endvolumen 150 µl, enthielt 3,3% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

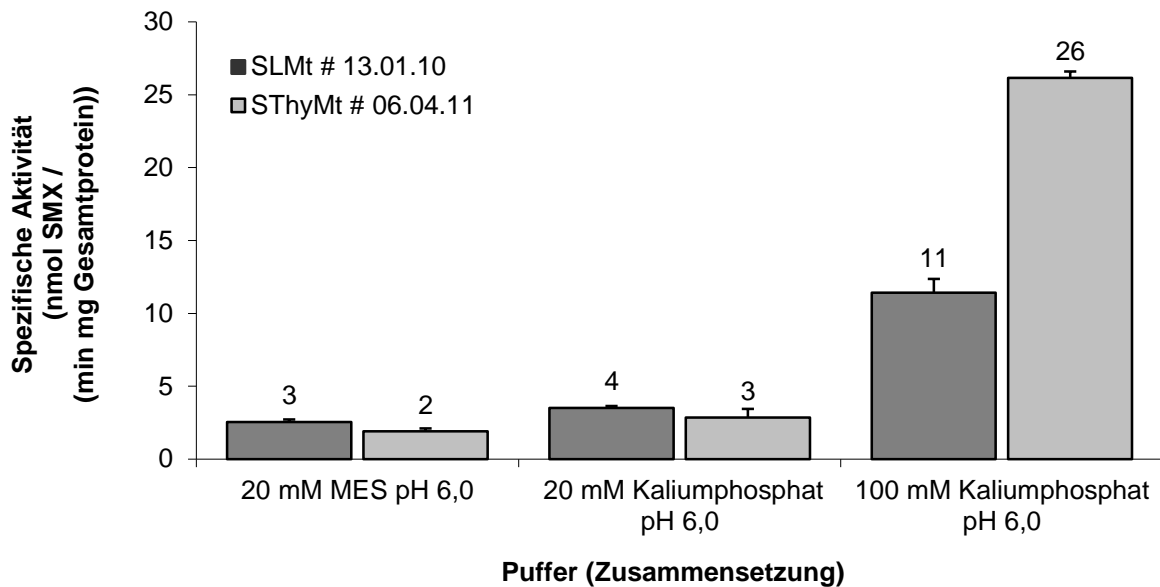


Abb. 8.23: Ermittlung des optimalen Puffers

Die Inkubationsansätze bestanden aus 25  $\mu\text{g}$  SLMt bzw. 10  $\mu\text{g}$  SThyMt, 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in Puffer mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu\text{l}$ , enthielt 3,3% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

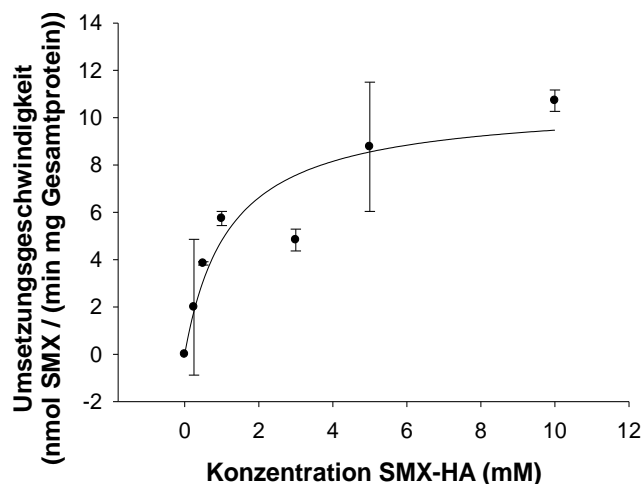


Abb. 8.24: Substratabhängigkeit Sulfamethoxazolhydroxylamin mit SLMt # 13.01.10

Die Inkubationsansätze bestanden aus 25  $\mu\text{g}$  SLMt, 0 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Endvolumen 150  $\mu\text{l}$ , enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.



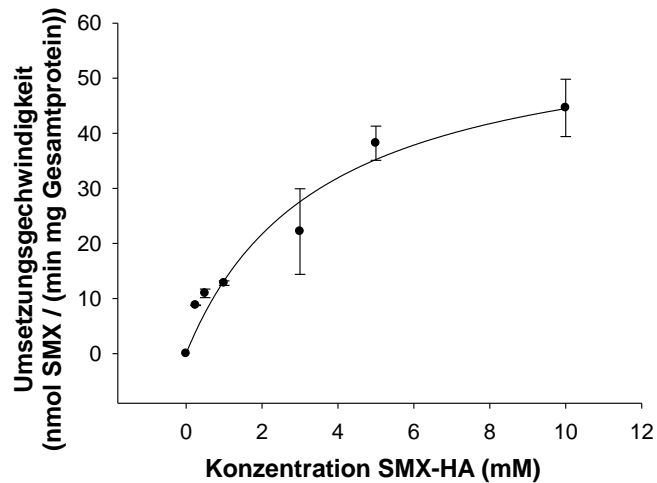


Abb. 8.25: Substratabhängigkeit Sulfamethoxazolhydroxylamin mit SThyMt # 06.04.11

Die Inkubationsansätze bestanden aus 10 µg SThyMt, 0 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

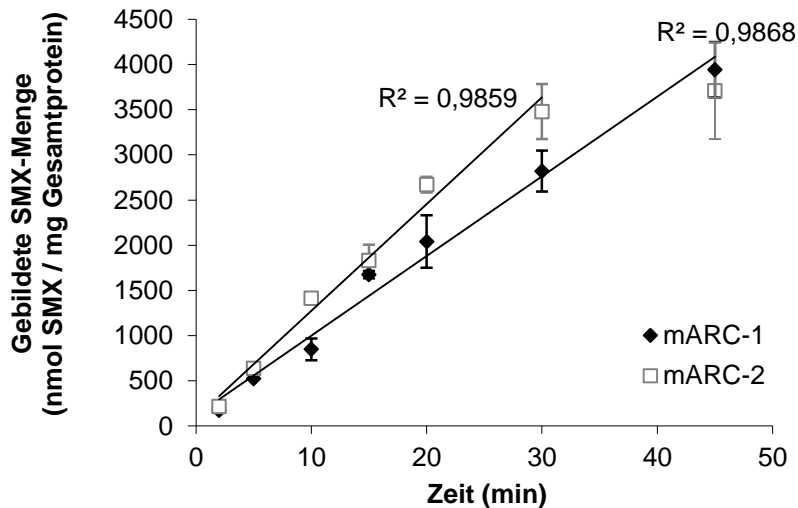


Abb. 8.26: Zeitabhängigkeiten für mARC-1 und mARC-2

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10 bzw. mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 27.01.10) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 2 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 0 bis 45 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsdaten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

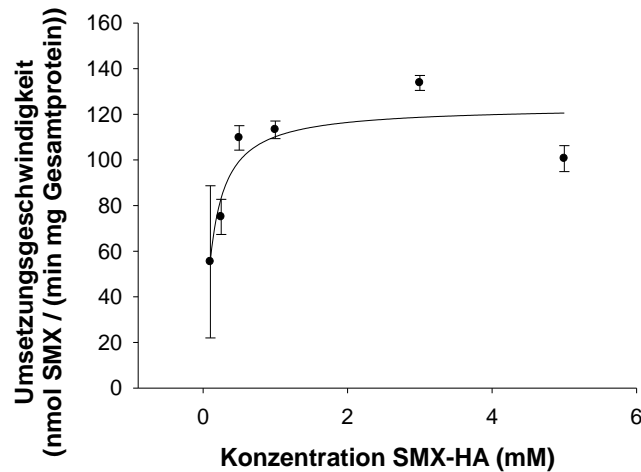


Abb. 8.27: Substratabhängigkeit Sulfamethoxazolhydroxylamin eines mARC-1-Wildtyp-Proteins

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-1 # 07.09.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 0 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

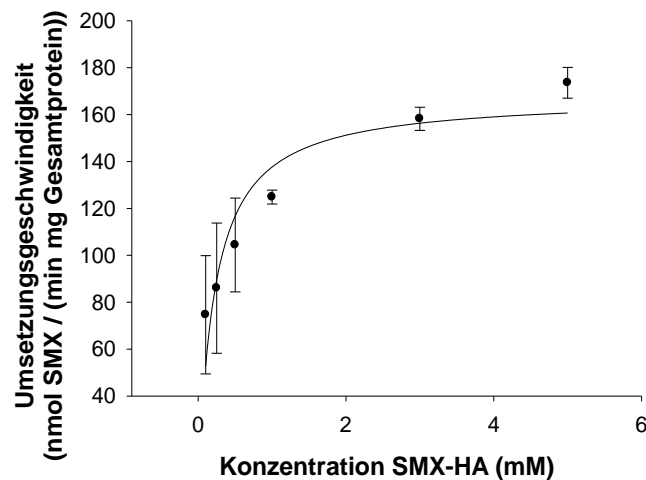


Abb. 8.28: Substratabhängigkeit Sulfamethoxazolhydroxylamin eines mARC-2-Wildtyp-Proteins

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC-2 # 22.07.10), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 0 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

## 8.4.2. Tabellen

Ansatz (Zusammensetzung)	Umsetzungsrate (nmol SMX / min)	Spezifische Aktivität (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))
mARC-1 # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 15.02.11	1,89 ± 0,03	55,9 ± 0,8
mARC-1 # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11a	2,29 ± 0,20	80,1 ± 6,8
mARC-1 # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11b	2,93 ± 0,19	57,8 ± 3,7
mARC-1 # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 18.05.11	3,54 ± 0,02	223,4 ± 1,5
A165T # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 15.02.11	1,40 ± 0,34	39,4 ± 9,4
A165T # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11a	1,59 ± 0,64	52,5 ± 21,1
A165T # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11b	1,73 ± 0,28	33,0 ± 5,4
A165T # 22.02.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 18.05.11	2,53 ± 0,50	144,1 ± 28,3
mARC-2 # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 15.02.11	2,63 ± 0,07	73,5 ± 1,9
mARC-2 # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11a	3,68 ± 0,06	120,4 ± 2,0
mARC-2 # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11b	3,99 ± 0,78	75,7 ± 14,8
mARC-2 # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 18.05.11	2,49 ± 0,14	140,0 ± 7,9
C245W # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 15.02.11	1,32 ± 0,04	38,2 ± 1,1
C245W # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11a	1,71 ± 0,06	58,3 ± 2,2
C245W # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 23.02.11b	2,45 ± 0,81	47,6 ± 15,8
C245W # 22.07.10 / Cyt b <sub>5</sub> # 18.05.11	1,87 ± 0,35	113,0 ± 21,1

Tab 8.6.: Ergebnis der Inkubationen je eines mARC-1- und mARC-2-Wildtypen mit einer dazugehörigen Variante jeweils mit vier verschiedenen Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Chargen

Die Inkubationsansätze bestanden aus 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub>) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10), 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsrate sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden.

8 ANHANG (ZU KAPITEL 5)

mARC-Protein (Charge)	$V_{\max}$ ((nmol SMX / min mg Gesamtprotein))	$V_{\max}$ (nmol SMX / min)	$K_m$ (mM SMX-HA)	$k_{cat} / K_m$ (1 / (s M))
mARC-1				
mARC-1 # 25.01.10	143,7	4,13	1,85	200
C246S # 25.01.10	79,8 ± 31,7	2,41 ± 0,82	1,00 ± 0,61	273 ± 149
mARC-1 # 22.02.10	111,8 ± 34,7	3,53 ± 0,85	0,74 ± 0,50	518 ± 203
A165T # 22.02.10	73,3 ± 9,5	2,23 ± 0,29	0,52 ± 0,32	467 ± 209
M187K # 22.02.10	95,4 ± 18,9	2,84 ± 0,33	0,63 ± 0,05	409 ± 62
D247H # 22.02.10	97,8 ± 58,4	3,11 ± 1,71	0,84 ± 0,64	369 ± 88
mARC-1 # 07.09.10	105,0 ± 36,8	3,12 ± 0,90	0,82 ± 0,43	394 ± 176
V96L #07.09.10	105,5 ± 23,7	3,11 ± 0,43	0,76 ± 0,32	398 ± 131
C246S # 07.09.10	67,0 ± 23,4	2,02 ± 0,65	1,06 ± 0,44	179 ± 41
M268I # 07.09.10	102,8 ± 5,4	3,03 ± 0,20	0,90 ± 0,23	310 ± 57
mARC-1 # 12.10.11	52,4 ± 13,5	1,66 ± 0,30	0,47 ± 0,30	381 ± 157
A165T # 12.10.11	71,6 ± 25,3	2,38 ± 0,70	0,78 ± 0,53	315 ± 98
M187K # 12.10.11	85,2 ± 39,2	2,55 ± 1,03	1,37 ± 0,63	193 ± 100
D247H # 12.10.11	56,6 ± 16,0	1,89 ± 0,55	0,58 ± 0,34	324 ± 85
mARC-2				
mARC-2 # 18.02.10	125,8 ± 14,8	4,05 ± 0,32	0,41 ± 0,21	1015 ± 402
G244S # 18.02.10	129,7 ± 25,9	4,13 ± 0,52	0,61 ± 0,15	644 ± 234
mARC-2 # 22.07.10	136,6 ± 36,3	4,08 ± 0,83	0,45 ± 0,04	818 ± 127
C245W # 22.07.10	82,5 ± 19,8	2,56 ± 0,61	0,40 ± 0,09	575 ± 15
mARC-2 # 17.01.11	142,4 ± 45,1	4,18 ± 1,02	0,55 ± 0,18	696 ± 146
C245W # 17.01.11	93,8 ± 30,5	2,84 ± 0,74	0,50 ± 0,13	523 ± 138

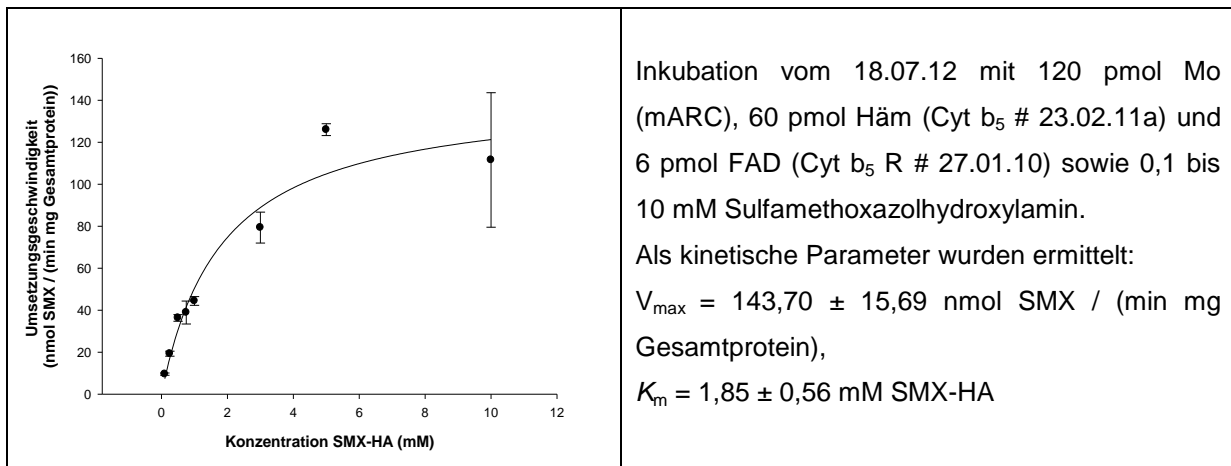
Tab. 8.7 Kinetische Parameter der einzelnen mARC-Proteine

Die Inkubationsansätze bestanden aus mARC, Cyt b<sub>5</sub> und Cyt b<sub>5</sub> R, 0 bis max. 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 20 mM MES mit 1 mM Ascorbinsäure pH 6,0 (Endvolumen 150 µl, enthielt 6,6% DMSO). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen drei Inkubationen mit zwei parallel

inkubierten Reaktionsansätzen, die doppelt vermessen wurden. Kinetische Parameter wurden mit SigmaPlot 11.0 ermittelt. Bei Vorliegen einer Substratüberschusshemmung wurden die apparenten kinetischen Parameter berechnet.

### 8.4.3. Substratabhängigkeiten der mARC-Proteine mit Sulfamethoxazolhydroxylamin

#### mARC-1 # 25.01.10



Diese mARC-Charge wurde nur einmal mit dem Substrat SMX-HA inkubiert, da für weitere Inkubation kein Protein mehr zur Verfügung stand:

## mARC-1 C246S # 25.01.10

	<p>Inkubation vom 29.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 68,96 \pm 2,70 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,51 \pm 0,08 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 14.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 54,94 \pm 2,12 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 1,67 \pm 0,18 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 17.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 115,46 \pm 14,27 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m = 0,82 \pm 0,34 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

## mARC-1 # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 04.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 124,79 \pm 10,54</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,58 \pm 0,18</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 09.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 72,49 \pm 2,54</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 0,34 \pm 0,05</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 18.07.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,25 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 138,24 \pm 9,40</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 1,13 \pm 0,26</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-1 A165T # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 28.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,25 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 71,98 \pm 2,13 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,41 \pm 0,05 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 10.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,25 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 64,57 \pm 0,14 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,26 \pm 0,00 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 02.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 83,48 \pm 4,25 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m = 0,89 \pm 0,13 \text{ mM SMX-HA}</math></p>



## mARC-1 M187K # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 23.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 107,58 \pm 6,96 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,66 \pm 0,15 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 11.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 73,56 \pm 5,94 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m = 0,64 \pm 0,18 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 20.07.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 104,92 \pm 8,21 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m = 0,57 \pm 0,17 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

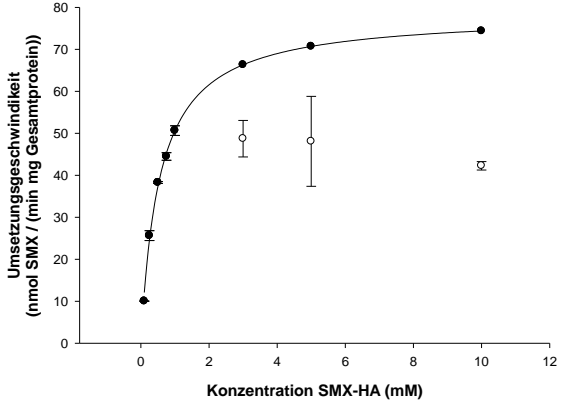
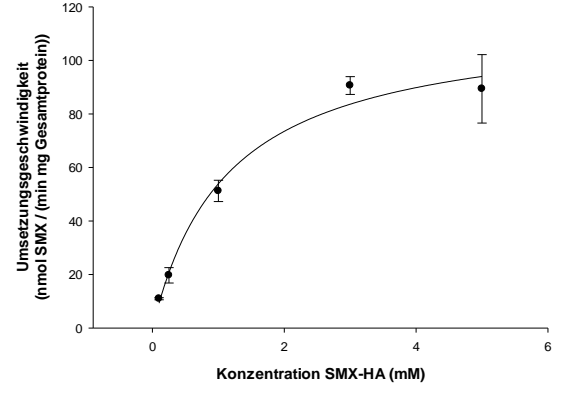
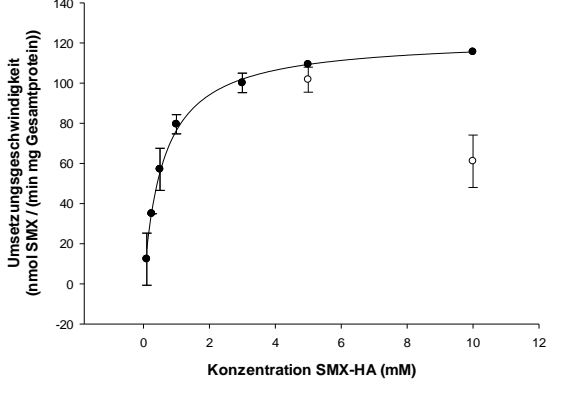
## mARC-1 D247H # 22.02.10

	<p>Inkubation vom 15.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 55,32 \pm 4,14</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,47 \pm 0,13</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 24.11.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 73,70 \pm 2,44</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,44 \pm 0,06</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 21.07.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 164,41 \pm 2,59</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 1,57 \pm 0,08</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-1 # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 05.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 144,44 \pm 8,63</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,69 \pm 0,14</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 16.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 71,67 \pm 7,22</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,47 \pm 0,18</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 20.12.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 98,98 \pm 19,82</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 1,32 \pm 0,77</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-1 V96L # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 18.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 78,48 \pm 0,88 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,55 \pm 0,02 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 14.12.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 115,48 \pm 9,45 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m = 1,14 \pm 0,29 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 25.07.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 122,50 \pm 2,48 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,60 \pm 0,05 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

## mARC-1 C246S # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 22.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 60,87 \pm 3,31 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 1,35 \pm 0,22 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 92,86 \pm 7,51 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m = 1,27 \pm 0,26 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 22.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 47,28 \pm 4,11 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m = 0,56 \pm 0,18 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

## mARC-1 M268I # 07.09.10

	<p>Inkubation vom 24.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 101,91 \pm 6,35</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,70 \pm 0,15</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 21.05.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 97,88 \pm 3,18</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 1,15 \pm 0,12</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 05.09.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 108,56 \pm 14,99</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,85 \pm 0,42</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-1 # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 15.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 36,87 \pm 1,42 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,25 \pm 0,04 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 01.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 60,75 \pm 1,99 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,35 \pm 0,05 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 11.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 59,53 \pm 4,24 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m = 0,82 \pm 0,19 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

## mARC-1 A165T # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 17.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 49,94 \pm 1,61 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,47 \pm 0,06 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 02.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 65,42 \pm 2,60 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,48 \pm 0,07 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 12.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 99,30 \pm 4,58 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m = 1,39 \pm 0,19 \text{ mM SMX-HA}</math></p>



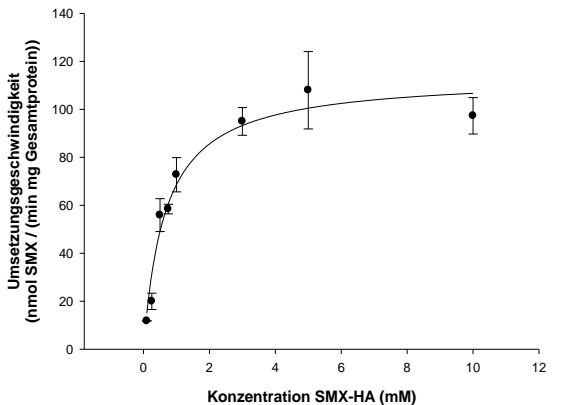
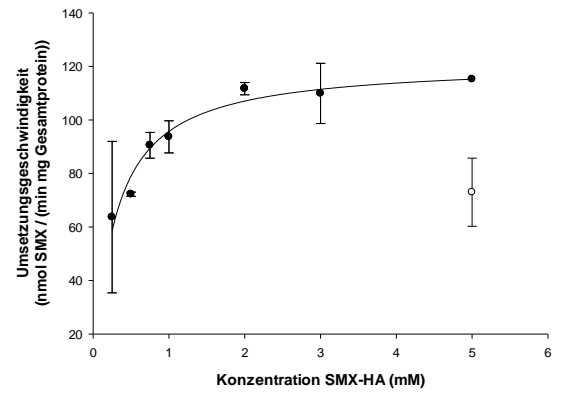
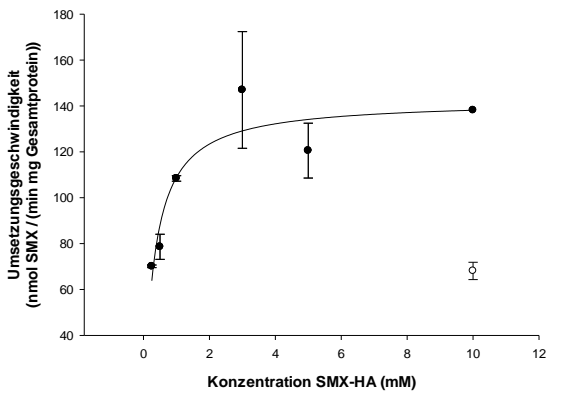
## mARC-1 M187K # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 20.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 54,18 \pm 3,12 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 2,05 \pm 0,32 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 03.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor. Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 72,13 \pm 1,82 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,82 \pm 0,07 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 13.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 129,25 \pm 6,85 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,</p> <p><math>K_m = 1,23 \pm 0,20 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

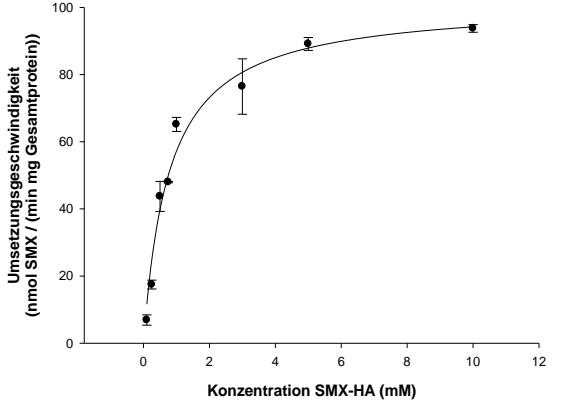
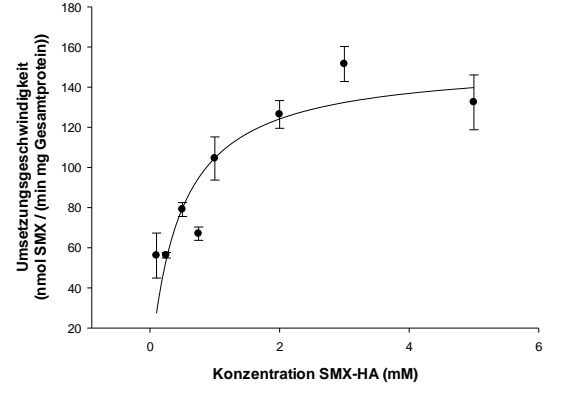
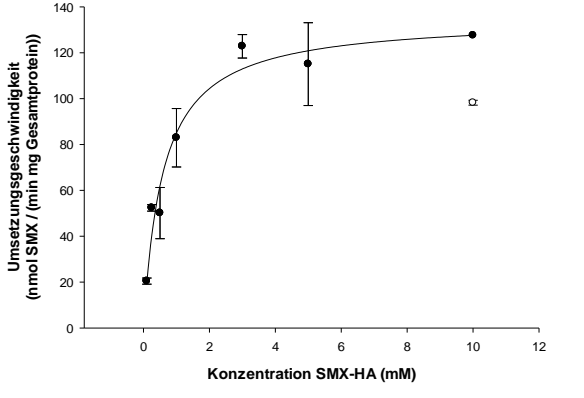
## mARC-1 D247H # 12.10.11

	<p>Inkubation vom 30.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 69,63 \pm 1,70 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,96 \pm 0,08 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 21.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 38,60 \pm 1,58 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,31 \pm 0,06 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 06.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 61,28 \pm 2,33 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,48 \pm 0,07 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

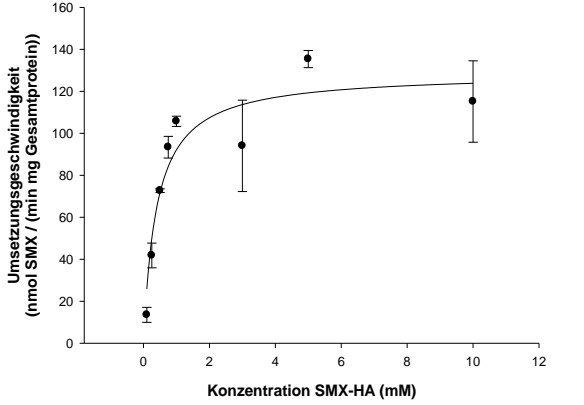
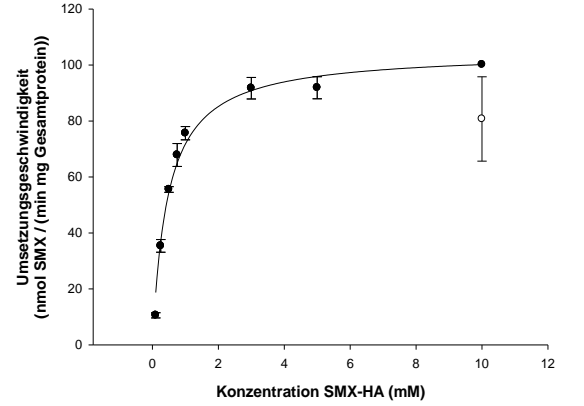
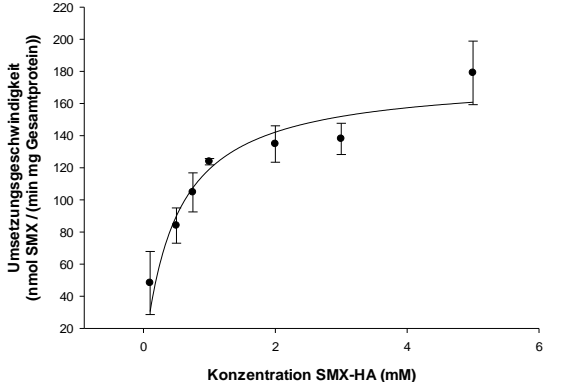
## mARC-2 # 18.02.10

 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 27.06.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 113,72 \pm 6,66</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m = 0,66 \pm 0,13</math> mM SMX-HA</p>
 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 23.04.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,25 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 121,43 \pm 3,67</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,27 \pm 0,04</math> mM SMX-HA</p>
 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 05.07.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,25 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 142,38 \pm 9,06</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,31 \pm 0,10</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-2 G244S # 18.02.10

 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 28.06.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 101,51 \pm 5,00</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m = 0,78 \pm 0,13</math> mM SMX-HA</p>
 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 24.04.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,25 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 152,55 \pm 17,44</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m = 0,46 \pm 0,0,19</math> mM SMX-HA</p>
 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 15.07.11 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 135,10 \pm 7,75</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,59 \pm 0,13</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-2 # 22.07.10

 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 29.06.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 128,77 \pm 10,57</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m = 0,40 \pm 0,13</math> mM SMX-HA</p>
 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 13.06.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max \text{ apparent}} = 104,76 \pm 3,32</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m \text{ apparent} = 0,46 \pm 0,06</math> mM SMX-HA</p>
 <p>Umsetzungsgeschwindigkeit (nmol SMX / (min mg Gesamtprotein))</p> <p>Konzentration SMX-HA (mM)</p>	<p>Inkubation vom 25.04.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:</p> <p><math>V_{\max} = 176,18 \pm 14,27</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),</p> <p><math>K_m = 0,48 \pm 0,15</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-2 C245W # 22.07.10

	<p>Inkubation vom 02.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 103,08 \pm 6,21</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,46 \pm 0,11</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 26.06.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 80,81 \pm 4,15</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m \text{ apparent} = 0,42 \pm 0,08</math> mM SMX-HA</p>
	<p>Inkubation vom 26.04.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 63,58 \pm 3,59</math> nmol SMX / (min mg Gesamtprotein),  <math>K_m = 0,30 \pm 0,06</math> mM SMX-HA</p>

## mARC-2 # 17.01.11

	<p>Inkubation vom 27.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 155,38 \pm 4,11 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,73 \pm 0,07 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 09.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 89,25 \pm 2,87 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,38 \pm 0,05 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 06.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 3 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 179,48 \pm 13,25 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m = 0,55 \pm 0,15 \text{ mM SMX-HA}</math></p>

## mARC-2 C245W # 17.01.11

	<p>Inkubation vom 13.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 15.02.11) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 66,01 \pm 2,09 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,37 \pm 0,05 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 07.08.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Es lag eine Substratüberschusshemmung vor.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max \text{ apparent}} = 88,93 \pm 1,09 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m \text{ apparent} = 0,62 \pm 0,03 \text{ mM SMX-HA}</math></p>
	<p>Inkubation vom 10.07.12 mit 120 pmol Mo (mARC), 60 pmol Häm (Cyt b<sub>5</sub> # 23.02.11a) und 6 pmol FAD (Cyt b<sub>5</sub> R # 27.01.10) sowie 0,1 bis 10 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin.</p> <p>Als kinetische Parameter wurden ermittelt:  <math>V_{\max} = 126,43 \pm 12,80 \text{ nmol SMX / (min mg Gesamtprotein)}</math>,  <math>K_m = 0,50 \pm 0,19 \text{ mM SMX-HA}</math></p>



## 9. GERÄTE UND MATERIALIEN

### 9.1. SUBSTANZEN

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders in der Tabelle aufgeführt, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim. Alle Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
10x Blue Juice™ Gel Loading Buffer	Invitrogen, Darmstadt
10x PCR Rxn Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen, Darmstadt
Acetic Acid	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ascorbinsäure	Synopharm, Barsbüttel
Agarose NEEO Ultra Qualität Roti® Garose f.d. DNA/RNA Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, UK
Annealing Buffer	Biotage, Uppsala, Schweden
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Roth, Karlsruhe
Binding Buffer	Biotage, Uppsala, Schweden
Borsäure	Merck, Darmstadt
Compat-Able™ ProteinAssay Preparation Reagent Set	Thermo Scientific, USA

9 GERÄTE UND MATERIALIEN

DMSO für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
dNTP (2,5M dNTP 10mM Lösung)	Biozym, Hessisch Oldendorf
DTT (1,4-Dithiothreit)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidium Bromide Solution 10 mg / ml	Invitrogen, Darmstadt
Fermentas Unstained Molecular Weight Marker	Fermentas, Darmstadt
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas, Darmstadt
Glycerol 86% (m/V)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
illustra™ GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare, Freiburg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Darmstadt
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
PlusOne Silver Staining Kit, Protein	GE Healthcare, Freiburg
PyroMark Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden
Roti®-Blue	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel30	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MES	Roth, Karlsruhe
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe

## 9 GERÄTE UND MATERIALIEN

MgCl <sub>2</sub> 50 mM	Invitrogen, Darmstadt
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
NADH	Merck, Darmstadt
NADPH, Tetranatriumsalz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Roti <sup>®</sup> -Blue	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, Holland
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
Streptavidin Sepharose <sup>™</sup> High Performance	GE Healthcare, Freiburg
Sulfamethoxazolhydroxylamin	Dalton, Toronto, Kanada
Taq DNA Polymerase, rekombinant	Invitrogen, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Ultra Pure Water	Biochrom AG, Berlin
Washing Buffer 10x	Biotage, Uppsala, Schweden

### 9.2. MATERIALIEN

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
2-Way-Stopcock	Bio-Rad, München
8er Domed Cap Strips	peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
96 Well Microplates, F-bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

## 9 GERÄTE UND MATERIALIEN

96 Well PCR Plates	peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
Multiply <sup>®</sup> -Pro Gefäß, 0,2 ml	Sarstedt, Nürnberg
Omni Tube Plate	Thermo Scientific, Darmstadt
PD MiniTrap G-25	GE Healthcare, Freiburg
Pipettenspitze 20 µl, farblos	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitze 200 µl, gelb	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitze 1000 µl, blau	Sarstedt, Nürnberg
PSQ <sup>™</sup> HS Capillary Dispensing Tip	Biotage, Uppsala, Schweden
PSQ <sup>™</sup> HS Reagent Dispensing Tip	Biotage, Uppsala, Schweden
PSQ HS 96 CDT Holder	Biotage, Uppsala, Schweden
PSQ HS 96 Plate	Biotage, Uppsala, Schweden
Power PacHC <sup>™</sup>	Bio-Rad, München
Röhre 15 ml, PP	Sarstedt, Nürnberg
Röhre 50 ml, PP	Sarstedt, Nürnberg
Safe-seal Reagiergef. 2ml, PP	Sarstedt, Nürnberg
Safe-seal Reagiergef. 1,5ml	Sarstedt, Nürnberg
Sub-Cell <sup>®</sup> Modell 192	Bio-Rad, München
Thermowell <sup>™</sup> Sealers	Corning Incorporated
UV-Küvette mikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Vacuum Prep Tool Filter Probes	Biotage, Uppsala, Schweden
Vacuum Prep Tool Throughs	Biotage, Uppsala, Schweden

**9.3. GERÄTE**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Cary 50	Varian, Australien
CP225D	Sartorius, Göttingen
eppendorf Multipette® Plus	eppendorf, Hamburg
eppendorf Research	eppendorf, Hamburg
eppendorf Research pro	eppendorf, Hamburg
eppendorf Reference	eppendorf, Hamburg
GFL 1083 Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Geltrocknungsrahmen	Roth, Karlsruhe
Gene Amp® PCR System 9700, Version 3.08	Applied Biosystems, Darmstadt
IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Kodak Image Station 400CF	Kodak, Stuttgart
Microwave 800	Severin, Sundern
Mikro 200	Hettich, Tuttlingen
Monoshake	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Navigator™	OHAUS, Zürich
PSQ HS 96	Biotage, Uppsala, Schweden
Sonorex Super RK510H	Bandelin, Berlin
Vacuum Prep Stand	Biotage, Uppsala, Schweden
Vortex Genie® 2	Scientific Industries, USA
VWR™ MiniVortexer 945304	Henry Troemmer, USA

## 10. LITERATURVERZEICHNIS

ABERG, K., ADKINS, D. E., BUKSZAR, J., WEBB, B. T., CAROFF, S. N., MILLER DEL, D. *ET AL.* (2010) Genomewide association study of movement-related adverse antipsychotic effects. *Biological Psychiatry* 67, 279–282.

AHMADIAN, A., EHN, M., HOBER, S. (2006) Pyrosequencing. history, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 363, 83–94.

ALFIREVIC, A., STALFORD, A. C., VILAR, F. J., WILKINS, E. G., PARK, B. K., PIRMOHAMED, M. (2003) Slow acetylator phenotype and genotype in HIV-positive patients with sulphamethoxazole hypersensitivity. *British Journal of Clinical Pharmacology* 55, 158–165.

ALFIREVIC, A., GONZALEZ-GALARZA, F., BELL, C., MARTINSSON, K., PLATT, V., BRETLAND, G. *ET AL.* (2012) In silico analysis of HLA associations with drug-induced liver injury: use of a HLA-genotyped DNA archive from healthy volunteers. *Genome Medicine* 4, 51.

ALTSHULER, D. M., GIBBS, R. A., PELTONEN, L., DERMITZAKIS, E., SCHAFFNER, S. F., YU, F. *ET AL.* (2010) Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467, 52–58.

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 Microbiology. Letters* 207, 55–61.

APPLEMAN, L. J., BOUSSIOTIS, V. A. (2003) T cell anergy and costimulation. *Immunological Reviews* 192, 161–180.

BÄRLOCHER, F. (2008) Biostatistik. Praktische Einführung in Konzepte und Methoden ; 20 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

- BANDO, S., TAKANO, T., YUBISUI, T., SHIRABE, K., TAKESHITA, M., NAKAGAWA, A. (2004) Structure of human erythrocyte NADH-cytochrome b5 reductase. *Acta Crystallographica Section. D: Biological Crystallography* 60, 1929–1934.
- BARTOSZEWSKI, R. A., JABLONSKY, M., BARTOSZEWSKA, S., STEVENSON, L., DAI, Q., KAPPES, J. *ET AL.* (2010) A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 28741–28748.
- BEHRENS, D. (1999) Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen durch Cytochrom P450 Isoenzyme aus Schweineleber und humaner Leber. Dissertation. Kiel.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L.; GATTO, G. J. (2013) Biochemie. 7.Aufl. Heidelberg: Springer Spektrum.
- BHUSARI, S., ABOURAYA, M., PADILLA, M. L., PINKERTON, M. E., DRESCHER, N. J., SACCO, J. C., TREPANIER, L. A. (2010) Combined ascorbate and glutathione deficiency leads to decreased cytochrome b5 expression and impaired reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine. *Archives of Toxicology* 84, 597–607.
- BICKEBÖLLER, H.; FISCHER, C. (2007) Einführung in die Genetische Epidemiologie. 1. Aufl. Berlin: Springer.
- BINDER, A., MAY, D., BARON, R., MAIER, C., TÖLLE, T. R., TREEDE, R.-D. *ET AL.* (2011) Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS ONE* 6, e17387.
- BISSWANGER, H. (2000) Enzymkinetik. Theorie und Methoden 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- BORGESE, N., D'ARRIGO, A., SILVESTRIS, M. DE, PIETRINI, G. (1993) NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*. 325, 70–75.
- BROOKES, A. J. (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234, 177–186.
- BROWN, T. A. (2007) Genome und Gene. Lehrbuch der molekularen Genetik. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag
- BUSHBY, S. R., HITCHINGS, G. H. (1968) Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 33, 72–90.

- CALLAN, H. E., JENKINS, R. E., MAGGS, J. L., LAVERGNE, S. N., CLARKE, S. E., NAISBITT, D. J., PARK, B. K. (2009) Multiple adduction reactions of nitroso sulfamethoxazole with cysteinyl residues of peptides and proteins. implications for hapten formation. *Chemical Research in Toxicology* 22, 937–948.
- CAPEN, C. C. (1994) Mechanisms of chemical injury of thyroid gland. *Progress in Clinical and Biological Research* 387, 173–191.
- CHAMIZO-AMPUDIA, A., GALVAN, A., FERNANDEZ, E., LLAMAS, A. (2011) The Chlamydomonas reinhardtii Molybdenum Cofactor Enzyme crARC Has a Zn-Dependent Activity and Protein Partners Similar to Those of Its Human Homologue. *Eukaryotic Cell* 10, 1270–1282.
- CHENG, L., STEWART, B. J., YOU, Q., PETERSEN, D. R., WARE, J. A., PICCOTTI, J. R. ET AL. (2008) Covalent binding of the nitroso metabolite of sulfamethoxazole is important in induction of drug-specific T-cell responses in vivo. *Molecular Pharmacology* 73, 1769–1775.
- CLEMENT, B., BEHRENS, D., MOLLER, W., CASHMAN, J. R. (2000) Reduction of amphetamine hydroxylamine and other aliphatic hydroxylamines by benzamidoxime reductase and human liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology* 13, 1037–1045.
- CLEMENT, B. (2002) Reduction of N-hydroxylated compounds. amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metabolism Reviews* 34, 565–579.
- CLEMENT, B., LOPIAN, K. (2003) Characterization of in vitro biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals* 31, 645–651.
- CLEMENT, B., BEHRENS, D., AMSCHLER, J., MATSCHKE, K., WOLF, S., HAVEMEYER, A. (2005) Reduction of sulfamethoxazole and dapsone hydroxylamines by a microsomal enzyme system purified from pig liver and pig and human liver microsomes. *Life Sciences* 77, 205–219.
- COHEN, H. N., BEASTALL, G. H., RATCLIFFE, W. A., GRAY, C., WATSON, I. D., THOMSON, J. A. (1980) Effects on human thyroid function of sulphonamide and trimethoprim combination drugs. *British Medical Journal* 281, 646–647.
- CRIBB, A. E., MILLER, M., LEEDER, J. S., HILL, J., SPIELBERG, S. P. (1991) Reactions of the nitroso and hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole with reduced



glutathione. Implications for idiosyncratic toxicity. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals* 19, 900–906.

CRIBB, A. E., SPIELBERG, S. P. (1992) Sulfamethoxazole is metabolized to the hydroxylamine in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics* 51, 522–526.

CRIBB, A. E., SPIELBERG, S. P., GRIFFIN, G. P. (1995) N4-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P4502C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 23, 406–414.

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. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 41566–41571.

DELOMENIE, C., GRANT, D. M., MATHÉLIER-FUSADE, P., JACOMET, C., LEYNADIER, F., JACQZ-AIGRAIN, E. ET AL. (1994) N-acetylation genotype and risk of severe reactions to sulphonamides in AIDS patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 38, 581–582.

DINGERMAN T., ZÜNDORF. I. (2013) Genetische Biomarker in der stratifizierten Arzneimitteltherapie. *Pharmakon* 1, 12–20.

DU, M., SHIRABE, K., TAKESHITA, M. (1997) Identification of alternative first exons of NADH-cytochrome b5 reductase gene expressed ubiquitously in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 235, 779–783.

DURLEY, R. C., MATHEWS, F. S. (1996) Refinement and structural analysis of bovine cytochrome b5 at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallographica Section. D: Biological Crystallography* 52, 65–76.

ELSHEIKH, A., LAVERGNE, S. N., CASTREJON, J. L., FARRELL, J., WANG, H., SATHISH, J. ET AL. (2010) Drug antigenicity, immunogenicity, and costimulatory signaling. evidence for formation of a functional antigen through immune cell metabolism. *Journal of Immunology* 185, 6448–6460.

ESTABROOK, R. W., WERRINGLOER, J. (1978) The measurement of difference spectra. application to the cytochromes of microsomes. *Methods in Enzymology* 52, 212–220.

- FRAZER, K. A., BALLINGER, D. G., COX, D. R., HINDS, D. A., STUVE, L. L., GIBBS, R. A. ET AL. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851–861.
- FRIEDRICH, S. (2003) Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzyms. Dissertation, Kiel.
- GARRETT, R. M., JOHNSON, J. L., GRAF, T. N., FEIGENBAUM, A., RAJAGOPALAN, K. V. (1998) Human sulfite oxidase R160Q: identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient and expression and characterization of the mutant enzyme. *PNAS* 95, 6394–6398.
- GHATAK, A., FAHEEM, O., THOMPSON, P. D. (2010) The genetics of statin-induced myopathy. *Atherosclerosis* 210, 337–343.
- GILL, H. J., MAGGS, J. L., MADDEN, S., PIRMOHAMED, M., PARK, B. K. (1996) The effect of fluconazole and ketoconazole on the metabolism of sulphamethoxazole. *British journal of clinical pharmacology* 42, 347–353.
- GRAEFE, K.-H.; LUTZ, W.; BÖNISCH, H.; HAHN, J.-M. (2011) Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- GRUENEWALD, S., WAHL, B., BITTNER, F., HUNGELING, H., KANZOW, S., KOTTHAUS, J. ET AL. (2008) The fourth molybdenum containing enzyme mARC. cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 8173–8177.
- GRÜNEWALD, S. (2008) Studien zur Biotransformation N-hydroxylierter Verbindungen durch molybdäncofaktorabhängige Enzymsysteme. Dissertation. Kiel.
- GUSTAFSSON, D., NYSTRÖM, J., CARLSSON, S., BREDBERG, U., ERIKSSON, U., GYZANDER, E. ET AL. (2001) The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thrombosis Research* 101, 171–181.
- HAENISCH, S., MAY, K., WEGNER, D., CALIEBE, A., CASCORBI, I., SIEGMUND, W. (2008) Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol. *Pharmacogenetics and Genomics* 18, 357–365.

- HARR, T., FRENCH, L. E. (2012) Adverse cutaneous drug eruptions *Chemical Immunology and Allergy* 97, 149-166.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 34796–34802.
- HAVEMEYER, A., LANG, J., CLEMENT, B. (2011) The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metabolism Reviews* 43, 524–539.
- HENDRICKSON, W. A., HORTON, J. R., LEMASTER, D. M. (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO Journal* 9, 1665–1672.
- HILLE, R., NISHINO, T., BITTNER, F. (2011) Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination Chemistry Reviews* 255, 1179–1205.
- HO, J. M., JUURLINK, D. N. (2011) Considerations when prescribing trimethoprim-sulfamethoxazole. *CMAJ* 183, 1851–1858.
- HOUSTON, J. B., KENWORTHY, K. E. (2000) In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metabolism and Disposition* 28, 246–254.
- HOVIUS, R., LAMBRECHTS, H., NICOLAY, K., KRUIJFF, B. DE (1990) Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1021, 217–226.
- HULTQUIST, D. E., PASSON, P. G. (1971) Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome B5 and cytochrome B5 reductase. *Nature New Biology* 229, 252–254.
- INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM (2003). The International HapMap Project *Nature* 426, 789–796.
- INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM (2005). A haplotype map of the human genome *Nature* 437, 1299–1320.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome *Nature* 431, 931–945.

- ITO, A., HAYASHI, S., YOSHIDA, T. (1981) Participation of a cytochrome b5-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane (OM cytochrome b) in NADH-semidehydroascorbic acid reductase activity of rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 101, 591–598.
- ISLINGER, M., LÜERS, G. H., LI, K. W., LOOS, M., VÖLKL, A. (2007) Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry*. 282, 23055–23069.
- JOHNSON, J. L., HAINLINE, B. E., RAJAGOPALAN, K. V., ARISON, B. H. (1984) The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 5414–5422.
- JONAS, D. E., MCLEOD, H. L. (2009) Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing. *Trends in Pharmacological Sciences* 30, 375–386.
- KENNE, K., SKANBERG, I., GLINGHAMMAR, B., BERSON, A., PESSAYRE, D., FLINOIS, J.-P. ET AL. (2008) Prediction of drug-induced liver injury in humans by using in vitro methods: the case of ximelagatran. *Toxicology in Vitro* 22, 730–746.
- KEYES, S. R., CINTI, D. L. (1980) Biochemical properties of cytochrome b5-dependent microsomal fatty acid elongation and identification of products. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 11357–11364.
- KIMCHI-SARFATY, C., OH, J. M., KIM, I. W., SAUNA, Z. E., CALCAGNO, A. M., AMBUDKAR, S. V., GOTTESMAN, M. M. (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science New York, N.Y* 315 (5811), 525–528.
- KINDMARK, A., JAWAID, A., HARBRON, C. G., BARRATT, B. J., BENGTSSON, O. F., ANDERSSON, T. B. ET AL. (2008) Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *Pharmacogenomics Journal* 8 (3), 186–195.
- KLEIN, J. M., BUSCH, J. D., POTTING, C., BAKER, M. J., LANGER, T., SCHWARZ, G. (2012) The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 42795-42803.
- KOMAR, A. A. (2007) Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science* 315, 466–467.

- KÖSTER, H., LITTLE, D. P., LUAN, P., MULLER, R., SIDDIQI, S. M., MARAPPAN, S., YIP, P. (2007) Capture compound mass spectrometry: a technology for the investigation of small molecule protein interactions. *Assay and Drug Development Technologies* 5, 381–390.
- KOTTHAUS, J., WAHL, B., HAVEMEYER, A., KOTTHAUS, J., SCHADE, D., GARBE-SCHÖNBERG, D. ET AL. (2011) Reduction of N( $\omega$ )-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochemical Journal* 433, 383–391.
- KROMPHOLZ, N., KRISCHKOWSKI, C., REICHMANN, D., GARBE-SCHÖNBERG, D., MENDEL, R.-R., BITTNER, F. ET AL. (2012) The Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) Is Involved in Detoxification of N-Hydroxylated Base Analogues. *Chemical Research in Toxicology* 25, 2443-2450.
- KRÜGER, P. (1885) Über Abkömmlinge das Benzenylamidoxims. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1055–1060.
- KURIAN, J. R., LONGLAIS, B. J., TREPANIER, L. A. (2007) Discovery and characterization of a cytochrome b5 variant in humans with impaired hydroxylamine reduction capacity. *Pharmacogenetics and Genomics* 17 (8), 597–603.
- 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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311, 1171–1178.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J. ET AL. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- LAVERGNE, S. N., KURIAN, J. R., BAJAD, S. U., MAKI, J. E., YODER, A. R., GUZINSKI, M. V. ET AL. (2006) Roles of endogenous ascorbate and glutathione in the cellular reduction and cytotoxicity of sulfamethoxazole-nitroso. *Toxicology* 222, 25–36.
- LAVERGNE, S. N., WANG, H., CALLAN, H. E., PARK, B. K., NAISBITT, D. J. (2009) "Danger" conditions increase sulfamethoxazole-protein adduct formation in human antigen-

presenting cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331, 372–381.

LEROUX, A., JUNIEN, C., KAPLAN, J., BAMBERGER, J. (1975) Generalised deficiency of cytochrome b5 reductase in congenital methaemoglobinaemia with mental retardation. *Nature* 258, 619–620.

LI, T. (2006) Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. *Journal of Medical Genetics* 43, 740–744.

LO BELLO, M., PARKER, M. W., DESIDERI, A., POLTICELLI, F., FALCONI, M., DEL BOCCIO, G. ET AL. (1993) Peculiar spectroscopic and kinetic properties of Cys-47 in human placental glutathione transferase. Evidence for an atypical thiolate ion pair near the active site. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 19033–19038.

MACAYA, D., KATSANIS, S. H., HEFFERON, T. W., AUDLIN, S., MENDELSON, N. J., ROGGENBUCK, J., CUTTING, G. R. (2009) A synonymous mutation in TCOF1 causes Treacher Collins syndrome due to mis-splicing of a constitutive exon. *American Journal of Medical Genetics* 149A, 1624–1627..

MALLAL, S., NOLAN, D., WITT, C., MASEL, G., MARTIN, A. M., MOORE, C. ET AL. (2002) Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 359, 727–732.

MARSH, S., HOSKINS, J. M. (2010) Irinotecan pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11, 1003–1010.

MARSH, S. G. (2013) Nomenclature for factors of the HLA system, update September 2012. *Human Immunology* 74, 138–143.

MARTIN, M.; RESCH, K. (2009) Immunologie. 1. Aufl. Stuttgart: UTB.

MEGA, J. L., SIMON, T., COLLET, J.-P., ANDERSON, J. L., ANTMAN, E. M., BLIDEN, K. ET AL. (2010) Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* 304, 1821–1830.

MERK D., SCHUBERT-ZSILAVECZ. M. (2013) Einfluss genetischer Variabilität auf die Wirkung von Arzneistoffen. *Pharmakon* 1, 21–28.

- MITTMANN, N., KNOWLES, S. R., KOO, M., SHEAR, N. H., RACHLIS, A., ROURKE, S. B. (2012) Incidence of toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson Syndrome in an HIV cohort: an observational, retrospective case series study. *American Journal of Clinical Dermatology* 13, 49–54.
- MÜLHARDT, C. (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- MURPHY, D., PARKER, J., ZHOU, M., FADLELMOLA, F. M., STEIDL, C., KARSAN, A. *ET AL.* (2010) Constitutively overexpressed 21 kDa protein in Hodgkin lymphoma and aggressive non-Hodgkin lymphomas identified as cytochrome B5b (CYB5B). *Molecular Cancer* 9, 14.
- NAISBITT, D. J. (2002) Covalent Binding of the Nitroso Metabolite of Sulfamethoxazole Leads to Toxicity and Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Presentation. *Molecular Pharmacology* 62, 628–637.
- NAISBITT, D. J., GORDON, S. F., PIRMOHAMED, M., PARK, B. K. (2000) Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation and propagation of immune responses elicited by drug treatment. *Drug Safety* 23, 483–507.
- NAISBITT, D. J., HOUGH, S. J., GILL, H. J., PIRMOHAMED, M., KITTERINGHAM, N. R., PARK, B. K. (1999) Cellular disposition of sulphamethoxazole and its metabolites. implications for hypersensitivity. *British journal of pharmacology* 126, 1393–1407.
- NEVE, E. P. A., NORDLING, A., ANDERSSON, T. B., HELLMAN, U., DICZFALUSY, U., JOHANSSON, I., INGELMAN-SUNDBERG, M. (2012) Amidoxime Reductase System Containing Cytochrome b5 Type B (CYB5B) and MOSC2 Is of Importance for Lipid Synthesis in Adipocyte Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 6307–6317.
- NYRÉN, P. (1987) Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry*. 167, 235–238.
- OGISHIMA, T., KINOSHITA, J.-Y., MITANI, F., SUEMATSU, M., ITO, A. (2003) Identification of outer mitochondrial membrane cytochrome b5 as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 21204–21211.
- OSHINO, N., IMAI, Y., SATO, R. (1971) A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *Journal of Biochemistry* 69, 155–167.

- PALMER, T., SANTINI, C. L., IOBBI-NIVOL, C., EAVES, D. J., BOXER, D. H., GIORDANO, G. (1996) Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 20, 875–884.
- PARTHASARATHY, S., ALTUVE, A., TERZIAN, S., ZHANG, X., KUCZERA, K., RIVERA, M., BENSON, D. R. (2011) Accommodating a nonconservative internal mutation by water-mediated hydrogen bonding between  $\beta$ -sheet strands: a comparison of human and rat type B (mitochondrial) cytochrome b<sub>5</sub>. *Biochemistry* 50, 5544–5554.
- PETERLIN-MASIC, L., CESAR, J., ZEGA, A. (2006) Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Current Pharmaceutical Design* 12, 73–91.
- PICHLER, W. J., BEELER, A., KELLER, M., LERCH, M., POSADAS, S., SCHMID, D. ET AL. (2006) Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergology International* 55, 17–25.
- PINSKI, J., XIONG, S., WANG, Q., STANCZYK, F., HAWES, D., LIU, S. V. (2011) Effect of luteinizing hormone on the steroidogenic pathway in prostate cancer. *Prostate* 71, 892–898.
- PIRMOHAMED, M., ALFIREVIC, A., VILAR, J., STALFORD, A., WILKINS, E. G., SIM, E., PARK, B. K. (2000) Association analysis of drug metabolizing enzyme gene polymorphisms in HIV-positive patients with co-trimoxazole hypersensitivity. *Pharmacogenetics* 10, 705–713.
- PLITZKO, B. (2010) Optimierung der in-vitro Rekonstitution des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems. Diplomarbeit, Kiel.
- PLITZKO B., OTT G., REICHMANN D., HENDERSON C. J., WOLF C.R., BITTNER F., MENDEL R., CLEMENT B., HAVEMEYER A. The Involvement of Mitochondrial Amidoxime Reducing Components 1 and 2 and Mitochondrial Cytochrome b<sub>5</sub> in *N*-reductive Metabolism in Human Cells *paper in preparation*
- RAJAPAKSHE, A., ASTASHKIN, A. V., KLEIN, E. L., REICHMANN, D., MENDEL, R. R., BITTNER, F., ENEMARK, J. H. (2011) Structural studies of the molybdenum center of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) by pulsed EPR spectroscopy and <sup>17</sup>O-labeling. *Biochemistry* 50, 8813–8822.



- REDDY, V. V., KUPFER, D., CASPI, E. (1977) Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 252, 2797–2801.
- REICHMANN, D. (2009) Analyse der "mitochondrial amidoxime reducing component"-Proteine aus Homo sapiens und Arabidopsis thaliana durch Electron Paramagnetic resonance- und UV/VIS-Spektroskopie. Masterarbeit. Braunschweig.
- RHOADS, K., SACCO, J. C., DRESCHER, N., WONG, A., TREPANIER, L. A. (2011) Individual variability in the detoxification of carcinogenic arylhydroxylamines in human breast. *Toxicological Sciences* 121, 245–256.
- RONAGHI, M., UHLÉN, M., NYRÉN, P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363, 365.
- SACCO, J. C., ABOURAYA, M., MOTSINGER-REIF, A., YALE, S. H., MCCARTY, C. A., TREPANIER, L. A. (2012) Evaluation of polymorphisms in the sulfonamide detoxification genes NAT2, CYB5A, and CYB5R3 in patients with sulfonamide hypersensitivity. *Pharmacogenetics and Genomics* 22, 733–740.
- SACCO, J. C., TREPANIER, L. A. (2010) Cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase: genotype-phenotype correlations for hydroxylamine reduction. *Pharmacogenet. Genomics* 20, 26–37.
- SACHS, L.; HEDDERICH, J. (2006) Angewandte Statistik. Methodensammlung mit R ; mit ... 180 Tabellen. 12. Aufl. Berlin ;, Heidelberg [u.a.]: Springer.
- SANDERSON, J. P., NAISBITT, D. J., PARK, B. K. (2006) Role of bioactivation in drug-induced hypersensitivity reactions. *The AAPS Journal* 8, E55-64.
- SAUNA, Z. E., KIMCHI-SARFATY, C. (2011) Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature Reviews* 12, 683–691..
- SCHAAF, C. P.; ZSCHOCKE, J. (2013) Basiswissen Humangenetik. 2. Aufl. Berlin: Springer.
- SCHULZ, C., BOECK, S., HEINEMANN, V., STEMMLER, H.-J. (2009) UGT1A1 genotyping: a predictor of irinotecan-associated side effects and drug efficacy? *Anticancer Drugs* 20, 867–879.
- SCHWARZ, G., MENDEL, R. R., RIBBE, M. W. (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 460, 839–847.

- SCOTT, E. M., GRIFFITH, I. V. (1959) The enzymic defect of hereditary methemoglobinemia: diaphorase. *Biochimica et Biophysica Acta* 34, 584–586.
- SILVESTRIS, M. DE, D'ARRIGO, A., BORGESE, N. (1995) The targeting information of the mitochondrial outer membrane isoform of cytochrome b5 is contained within the carboxyl-terminal region. *FEBS Letters* 370, 69–74.
- SIM, S. C., INGELMAN-SUNDBERG, M. (2011) Pharmacogenomic biomarkers: new tools in current and future drug therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 32, 72–81.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D. ET AL. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.
- SPATZ, L., STRITTMATTER, P. (1971) A form of cytochrome b5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *PNAS* 68, 1042–1046.
- STACHULSKI, A. V., BAILLIE, T. A., PARK, B. K., OBACH, R. S., DALVIE, D. K., WILLIAMS, D. P. ET AL. (2012) The Generation, Detection, and Effects of Reactive Drug Metabolites. *Medicinal Research Reviews*. doi: 10.1002/med.21273
- SU, A. I. (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *PNAS* 101, 6062–6067.
- TEMPLE, C. A., GRAF, T. N., RAJAGOPALAN, K. V. (2000) Optimization of expression of human sulfite oxidase and its molybdenum domain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 383 (2), 281–287.
- TESLOVICH, T. M., MUSUNURU, K., SMITH, A. V., EDMONDSON, A. C., STYLIANOU, I. M., KOSEKI, M. ET AL. (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466, 707–713.
- TJERNBERG, A., MARKOVA, N., GRIFFITHS, W. J., HALLEN, D. (2006) DMSO-related effects in protein characterization. *Journal of Biomolecular Screening* 11, 131–137.
- TREPANIER, L. A. (2004) Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (3), 129–138.
- UHL, G. R., DRGON, T., LIU, Q. R., JOHNSON, C., WALTHER, D., KOMIYAMA, T. ET AL. (2008) Genome-wide association for methamphetamine dependence. convergent results from 2 samples. *Archives of General Psychiatry* 65, 345–355.

- VAN DER VEN, A. J., MANTEL, M. A., VREE, T. B., KOOPMANS, P. P., VAN DER MEER, J. W. (1994) Formation and elimination of sulphamethoxazole hydroxylamine after oral administration of sulphamethoxazole. *British Journal of Clinical Pharmacology* 38, 147–150.
- VAN DER VEN, A. J., VREE, T. B., VAN EWIK-BENEKEN KOLMER, E. W., KOOPMANS, P. P., VAN DER MEER, J. W. (1995) Urinary recovery and kinetics of sulphamethoxazole and its metabolites in HIV-seropositive patients and healthy volunteers after a single oral dose of sulphamethoxazole. *British Journal of Clinical Pharmacology* 39, 621–625.
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G. ET AL. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.
- VREE, T. B., VAN DER VEN, A. J., VERWEY-VAN WISSEN, C. P., VAN EWIK-BENEKEN KOLMER, E. W., SWOLFS, A. E., VAN GALEN, P. M., AMATDJAIS-GROENEN, H. (1994) Isolation, identification and determination of sulfamethoxazole and its known metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 658, 327–340.
- 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. ET AL. (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. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 37847–37859.
- WANG, D., CURTIS, A., PAPP, A. C., KOLETAR, S. L., PARA, M. F. (2012) Polymorphism in glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) is associated with sulfamethoxazole-induced hypersensitivity in HIV/AIDS patients. *BMC Medical Genomics* 5 (1), 32.
- WANG, D., PARA, M. F., KOLETAR, S. L., SADEE, W. (2011) Human N-acetyltransferase 1 \*10 and \*11 alleles increase protein expression through distinct mechanisms and associate with sulfamethoxazole-induced hypersensitivity. *Pharmacogenetics and Genomics* 21, 652–664.

- WEBER, P. C., OHLENDORF, D. H., WENDOLOSKI, J. J., SALEMME, F. R. (1989) Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 243, 85–88.
- WHITBY, L. G. (1953) A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *The Biochemical Journal* 54, 437–442.
- WIESE, S., GRONEMEYER, T., OFMAN, R., KUNZE, M., GROU, C. P., ALMEIDA, J. A. ET AL. (2007) Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & Cell Proteomics* 6, 2045–2057.
- WINTER, H. R., TRAPNELL, C. B., SLATTERY, J. T., JACOBSON, M., GREENSPAN, D. L., HOOTON, T. M., UNADKAT, J. D. (2004) The effect of clarithromycin, fluconazole, and rifabutin on sulfamethoxazole hydroxylamine formation in individuals with human immunodeficiency virus infection (AACTG 283). *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 76, 313–322.
- YAMAGUCHI-KABATA, Y., SHIMADA, M. K., HAYAKAWA, Y., MINOSHIMA, S., CHAKRABORTY, R., GOJOBORI, T., IMANISHI, T. (2008) Distribution and effects of nonsense polymorphisms in human genes. *PLoS ONE* 3, e3393.
- YENGI, L. G., XIANG, Q., PAN, J., SCATINA, J., KAO, J., BALL, S. E. ET AL. (2003) Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Analytical Biochemistry* 316, 103–110.

## 11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### 11.1. ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
<i>CYB5A</i>	Cytochrom b <sub>5</sub> Typ A (Genbezeichnung)
<i>CYB5B</i>	Cytochrom b <sub>5</sub> Typ B (Genbezeichnung)
<i>CYB5R3</i>	NADH-Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase 3 (Genbezeichnung)
Cyt	Cytosol
Cyt b <sub>5</sub>	Cytochrom b <sub>5</sub> Typ B (Abkürzung der Proteinbezeichnung)
Cyt b <sub>5</sub> R	NADH-Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase 3 (Abkürzung der Proteinbezeichnung)
cDNA	komplementäre DNA
cps	<i>counts per second</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dbSNP	<i>Database of Single Nucleotide Polymorphisms</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreithiol

## 11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
gDNA	genomische DNA
HLA	humanes Leukozytenantigen
Hom	Homogenat
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
kDa	Kilodalton
<i>MARC1</i>	mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 (Genbezeichnung)
<i>MARC2</i>	mitochondrial Amidoxime Reducing Component 2 (Genbezeichnung)
mARC-1	mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 (Proteinbezeichnung)
mARC-2	mitochondrial Amidoxime Reducing Component 2 (Proteinbezeichnung)
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MGD	MPT-guanindinukleotid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistotkompatibilitätskomplex
Moco	Molybdäncofaktor
MPT	Molybdopterin
Ms	Mikrosomen
Mt	Mitochondrien
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nsSNP	<i>nonsynonymous</i> SNP
orf	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PNS	post-nukleärer Überstand
PSQ	Pyrosequencing
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMX	Sulfamethoxazol
SMX-HA	Sulfamethoxazolhydroxylamin
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

TBST	TBS mit Tweenzusatz
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
T <sub>m</sub>	melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
WT	Wildtyp

### 11.2. ABKÜRZUNGEN DER NUKLEINBASEN

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

### 11.3. SYMBOLE FÜR AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin

## 11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure



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 spannenden Promotionsthemas und die mir gewährleistete Unterstützung möchte ich mich bei meinem Doktorvater ganz herzlich bedanken.

Frau Dr. Antje Havemeyer danke ich ganz herzlich für die Unterstützung in allen wissenschaftlichen Bereichen, insbesondere ihre ständige Bereitschaft zu spontanen Diskussionen, ihr unermüdliches Engagement und das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit neben ihrer Elternzeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze danke ich herzlich für seine Diskussionsbereitschaft und wertvollen Ratschläge in den mARC-Gruppensitzungen.

Herrn PD Dr. Florian Bittner und Debora Reichmann (TU Braunschweig) danke ich herzlich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, die neben hilfreichen Diskussionen und Ratschlägen auch die Bereitstellung der rekombinanten Proteine umfasste.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi (Insitut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des UKSH, Campus Kiel) danke ich herzlich für die Bereitstellung der Kohorte zur Genotypisierung und Frau Dr. Cornelia Börgert danke ich für die gute Betreuung bei der Durchführung des Pyrosequencings und ihr Engagement.

Herrn Dr. Dieter Garbe-Schönberg und Frau Dipl. Ing. Ulrike Westernströer (Institut für Geowissenschaften, CAU Kiel) danke ich herzlich für die Ermöglichung der ICP-MS-Messungen und für die perfekte Organisation und Betreuung.

Herrn Dr. Matthias Marget (Insitut für Immunlogie des UKSH, Campus Kiel) danke ich für die HLA-Typisierung der Kohorte.

Bei der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH in Berlin bedanke ich mich für die Durchführung der *Capture*-Versuche und dem Einverständnis zur Erwähnung der gemeinsam erzielten Ergebnisse in dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich für die Unterstützung durch die technischen Mitarbeiter des Instituts. Petra Köster danke ich für die zuverlässige Durchführung zahlreicher Inkubationen und Westernblots. Sven Wichmann danke ich neben der Durchführung von Inkubationen vor allem für seine spontane Hilfe und Unterstützung bei HPLC-Fragen und -problemen. Melissa Zietz danke ich für die Synthese des Benzamidoxims.

Ebenso herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen im Geschäftszimmer sowie bei allen Mitarbeitern der „IT“.

Ein großer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts. Besonders hervorheben möchte ich den Arbeitskreis und die „mARC-Gruppe“. Darüberhinaus möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen ganz herzlich bedanken, die an der Betreuung des dritten Semesters mitgewirkt haben.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, vor allem meinem Mann und meiner Tochter, die mich - jeder auf seine Weise - während der ganzen Zeit wundervoll unterstützt haben.

### **Persönliche Daten**

Vor- und Familienname Gudrun Erika Ott, geb. Sierck  
Geburtsdatum 02. April 1972  
Geburtsort Neumünster  
Staatsangehörigkeit deutsch

### **Schule und Studium**

1978-1982 Grundschule, Hohenwestedt  
1982-1991 Auguste Viktoria-Schule, Itzehoe  
Juni 1991 Allgemeine Hochschulreife  
1991-1995 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
1995-1996 Praktisches Jahr: Stadt-Apotheke, Neumünster  
Dezember 1996 Erteilung der Approbation als Apothekerin

### **Beruflicher Werdegang**

1996-1997 Rathaus-Apotheke, Hohenwestedt  
1997-2001 Brücken-Apotheke, Heiligenstedten  
Weiterbildung zur Fachapothekerin für  
Allgemeinpharmazie  
November 2000 Fachapothekerin für Allgemeinpharmazie  
2001-2007 Gorch-Fock-Apotheke, Kiel  
2007 Beginn des Mutterschutzes mit anschließender Elternzeit  
Seit April 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. B. Clement

---

## Erklärung zu § 8 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Arbeit wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht bzw. befinden sich in der Vorbereitung zur Veröffentlichung:

### Publikationen

OTT G., REICHMANN D., BOERGER C., CASORBI I., BITTNER F., MENDEL RR., KUNZE T., CLEMENT B., HAVEMEYER A. Nonsynonymous SNPs in the mitochondrial amidoxime reducing coomponent (mARC) in healthy Caucasians and functional chracterization of genetic variants *paper in preparation*

PLITZKO B., OTT G., REICHMANN D., HENDERSON C. J., WOLF C.R., BITTNER F., MENDEL R., CLEMENT B., HAVEMEYER A. The Involvement of Mitochondrial Amidoxime Reducing Components 1 and 2 and Mitochondrial Cytochrome b<sub>5</sub> in *N*-reductive Metabolism in Human Cells *paper submitted*

### Tagungsbeiträge

OTT G., HAVEMEYER A., KRISCHKOWSKI C., REICHMANN D., BITTNER F., MENDEL RR., CLEMENT B. (2012) Reduction Of Sulfamethoxazole Hydroxylamine By The mARC-Containing *N*-Reductive Enzyme System, *9<sup>th</sup> MDO and 12<sup>th</sup> European ISSX meeting*, Noordwijk aan Zee, Niederlande (Poster)

SIERCK G., HAVEMEYER A., REICHMANN D., REMMLER C., BITTNER F., CASSCORBI I., MENDEL RR., CLEMENT B. (2010) Benzamidoxime Metabolism In Five Genetic Variants Of Mitochondrial Amidoxime Reducing Component, *DPhG Jahrestagung 2010*, Braunschweig (Poster)

---

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

Kiel, im April 2013

Gudrun Ott



Das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem besteht aus mARC-, Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B und NADH Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase und ist in der Lage, *N*-hydroxylierte Verbindungen in Gegenwart von NADH zu reduzieren. Ziel dieser Arbeit war es, 12 zum Aminosäureaustausch führende SNPs in diesem Enzymsystem zu untersuchen. Vier SNPs in *MARC1* (c.493A>G, c.560T>A, c.736T>A und c.739G>C) und zwei SNPs in *MARC2* (c.730G>A und c.735T>G) wurden mittels Pyrosequencing genotypisiert. Sie wiesen insgesamt nur eine geringe Frequenzhäufigkeit in der untersuchten Kohorte von 340 gesunden Kaukasiern auf. Nur für einen SNP in *MARC1* (c.493A>G) konnte die homozygote Variante mit einer Frequenz von 7,1% detektiert werden. Dieser SNP führte zur Proteinvariante A165T.

Die Proteinvarianten von mARC (mARC-1: V96L, A165T, M187K, C246S, D247H und M268I; mARC-2: G244S und C245W) und Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B (S2F, D14G, K16E und T22A) wurden in *E. coli* exprimiert und mittels *in vitro* Biotransformationsstudien am Substrat Benzamidoxim, dem Modells substrat der Amidoximprodrugs, untersucht. Die katalytische Effizienz der Varianten G244S und C245W war im Vergleich zu ihrem Wildtypprotein signifikant erniedrigt, ebenso die des mARC-2-Wildtypproteins im Vergleich zum mARC-1-Wildtypprotein. Die mARC-1-Variante A165T und alle Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Varianten beeinflussten die *N*-reduktive Aktivität des Enzymsystems nicht.

Die mARC-1-Mehrfachvariante, in der alle sechs Aminosäuren (V96L, A165T, M187K, C246S, D247H und M268I) ausgetauscht waren, zeigte trotz Bindung des Molybdäncofaktors nahezu keine *N*-reduktive Aktivität mehr. Dies könnte ein erster Hinweis auf mögliche Substratbindestellen sein.

Polymorphismen können zu Arzneimittelnebenwirkungen führen. Die Beteiligung des *N*-reduktiven Enzymsystems an der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin wurde *in vitro* gezeigt. Die mARC- und Cytochrom b<sub>5</sub> Typ B-Proteinvarianten beeinflussten die Reduktion nicht, so dass eine Beteiligung an der Pathogenese der Hypersensitivitätsnebenwirkung unter Sulfamethoxazol sehr unwahrscheinlich ist.

mARC-1 besaß die höhere katalytische Effizienz in der Reduktion von Benzamidoxim und mARC-2 in der Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin.

Erste Versuche zur Etablierung eines Biomarkertests zu einer Nebenwirkung des Amidoxim-Prodrugs Ximelagatran, die von der Firma caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH durchgeführt wurden, zeigten eine Wechselwirkung zwischen der Melagatran *Capture Compound* und dem mit dem löslichen HLA-Molekül DRB1\*0701.





Mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b<sub>5</sub> type B and NADH cytochrome b<sub>5</sub> reductase form an *N*-reductive enzyme system that is capable of reducing *N*-hydroxylated compounds in the presence of NADH. Aim of this work was to investigate 12 nonsynonymous SNPs located in this enzyme system.

Genotype frequencies of four SNPs in *MARC1* (c.493A>G, c.560T>A, c.736T>A and c.739G>C) and two in *MARC2* (c.730G>A and c.735T>G) were investigated by pyrosequencing. The six variants were of low frequency in a cohort of 340 healthy Caucasian. Only one homozygous variant (493AA, *MARC1*) was detected with a frequency of 7.1% leading to the protein variant A165T.

Protein variants of mARC (mARC-1: V96L, A165T, M187K, C246S, D247H and M268I; mARC-2: G244S and C245W) and cytochrome b<sub>5</sub> type B (S2F, D14G, K16E and T22A) were expressed in *E. coli*. *In vitro* biotransformation studies were performed with benzamidoxime, the model compound for amidoxime prodrugs. Catalytic efficiencies of mARC-2 variants G244S and C245W were significantly decreased compared with their wild type protein. Catalytic efficiency of mARC-1 wild type protein was significantly decreased compared with mARC-2 wild type protein. mARC-1 variant A165T and cytochrome b<sub>5</sub> type B variants S2F, D14G, K16E and T22A did not influence the *N*-reductive activity.

After replacement of all six amino acids (V96L, A165T, M187K, C246S, D247H and M268I) in one mARC-1 protein *N*-reductive activity was almost absent. Possibly these residues are important for substrate binding altogether.

Genetic polymorphisms are able to cause adverse drug reactions. Participation of the *N*-reductive enzyme system in the reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine was demonstrated *in vitro*. Protein variants of mARC and cytochrome b<sub>5</sub> type B did not influence this *N*-reduction and most likely would not participate in the pathogenesis of hypersensitivity reactions after treatment with sulfamethoxazole.

When catalytic efficiencies for both substrates were compared, mARC-1 seemed to be more efficient in the *N*-reduction of benzamidoxime. mARC-2 was more efficient in the *N*-reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine.

Initial experiments focusing on the establishment of a biomarker test that might be able to detect patients at risk of adverse reactions after treatment with ximelagatran were performed by the company caprotec<sup>TM</sup> bioanalytics GmbH in Berlin. A first interaction between a melagatran capture compound and the soluble MHC class II molecule DRB1\*0701 was shown.

