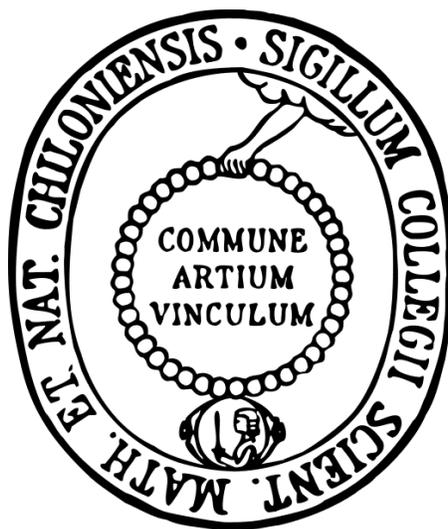


# **Studien zur Verknüpfung der mitochondrialen Amidoxim reduzierenden Komponente (mARC) mit dem Energiestoffwechsel**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Heyka Hellena Jakobs**

Kiel 2014

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

26. August 2014

Zum Druck genehmigt:

26. August 2014

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl  
(Dekan)

„Ich glaube nicht an ausweglose Situationen“

-James Tiberius Kirk-



## Abkürzungsverzeichnis

<i>Aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
3T3-L1	murine Fibroblasten-Zelllinie, Präadipozyten
Acyl-CoA	Fettsäure-Coenzym A-Verbindungen
BCA	Bicinchoninsäure
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
CYB5B	Cytochrom b <sub>5</sub> b
CYB5R	NADH-Cytochrom b <sub>5</sub> -Reduktase
cys	Cystein
db/db	Leptinrezeptor-defiziente Mäuse
ddCt	delta delta Ct
DMEM	<i>Dubbleco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dubbleco's Phosphate Buffered Salt Solution</i>
dt/dt	mit hochfetthaltigem Futter gefütterte Mäuse
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FOX	<i>ferrous oxidation of xylenol orange</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Dimer
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HEK-293	<i>human embryonic kidney cell line</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

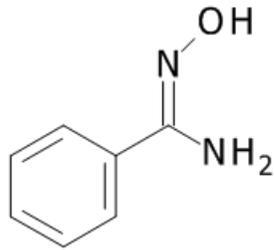
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFD	hochfetthaltige Diät
Hmbs	Hydroxymethylbilane-Synthase
HMCL	<i>human mesangial cell line</i>
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
HPE	Wasserstoffperoxid-Äquivalente
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IBMX	Isobutyl-methyl-xanthin
$K_m$	Michaelis-Menten Konstante
kn/kn	Kontrollmäuse
mARC	mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente
Mcoln 1	Mucolipin 1
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Moco	Molybdäncofaktor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAC	<i>N</i> -Acetylcystein
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NP-40	Nonident <sup>®</sup> -40
ob/ob	Leptin-Gen-defiziente Mäuse
PCK1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCD	Stearyl-CoA-Desaturase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD2	Superoxiddismutase 2

## Abkürzungsverzeichnis

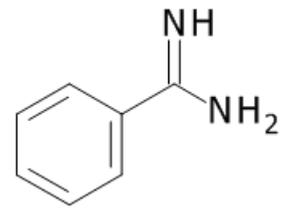
---

STZ	Streptozocin
TBST	<i>Tris-buffered saline plus Tween<sup>®</sup></i> Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPWL	Transport- und Waschpuffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
$V_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

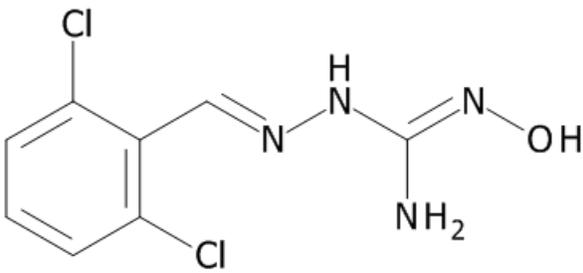
## Strukturformelverzeichnis



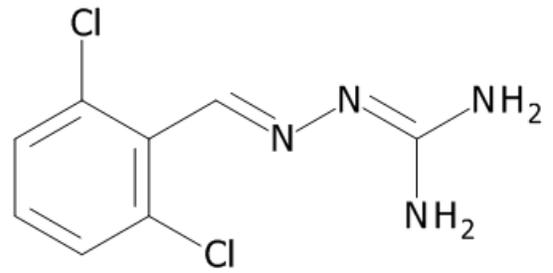
**Benzamidoxim**



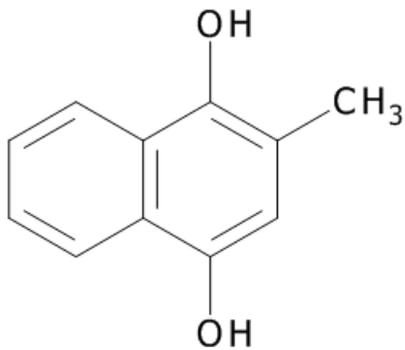
**Benzamidin**



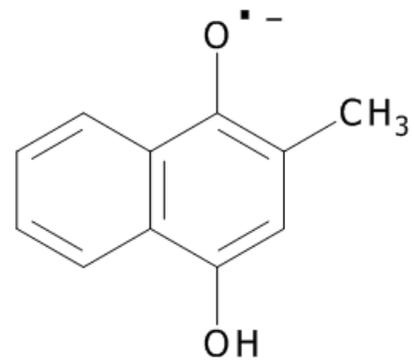
**Guanoxabenz**



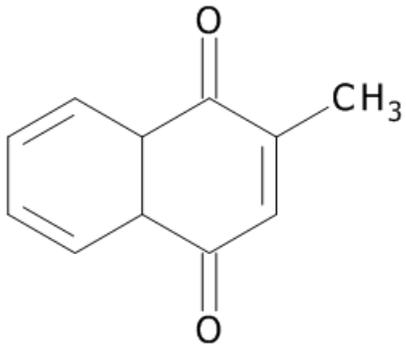
**Guanabenz**



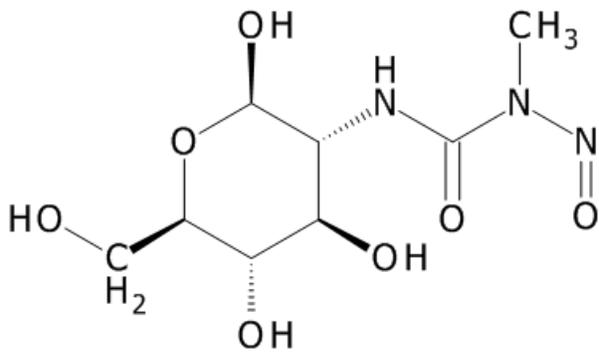
**Menadion**



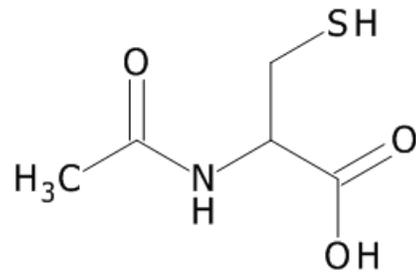
**Menadion-Semichinonradikal**



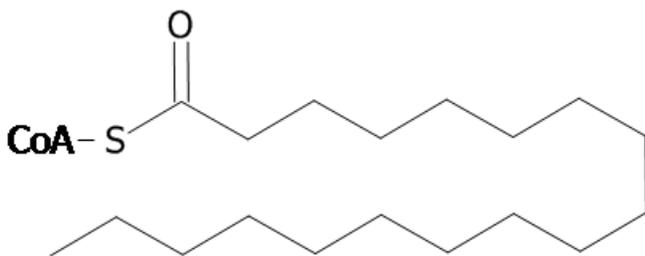
**Menadion-Hydrochinon**



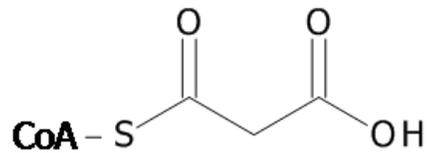
**Steptozocin**



**N-Acetylcystein**



**Stearyl-CoA**



**Malonyl-CoA**

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1	
Strukturformelverzeichnis.....	4	
Inhaltsverzeichnis.....	6	
1	Einleitung.....	13
1.1	Mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente.....	13
1.1.1	Gewebeverteilung von mARC .....	15
1.1.2	Subzelluläre Lokalisation von mARC .....	16
1.1.3	Beteiligung am <i>N</i> -reduktiven Arzneistoffmetabolismus.....	16
1.1.4	Hinweise zur endogenen Funktion .....	17
1.1.5	Weitere Molybdoenzyme .....	19
1.2	Energiestoffwechsel.....	21
	Störungen des Energiestoffwechsels .....	26
1.3	Zielsetzung.....	28
2	Reduktion des <i>N</i> -Hydroxy-amidinohydrazons Guanoxabenz .....	29
2.1	Thema und Zielsetzung.....	29
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Materialien und Geräte.....	31
2.2.2	Proteinquellen.....	31
2.2.3	HPLC-Methode zur Trennung von Guanoxabenz und Guanabenz.....	33
2.2.4	Kalibrierung und Wiederfindung .....	33

2.2.5	<i>In vitro</i> Biotransformationsansatz.....	34
2.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.2.7	Western Blot-Analyse.....	36
2.3	Ergebnisse.....	38
2.3.1	Charakterisierung der Enzymquellen.....	38
2.3.2	HPLC-Chromatogramm.....	39
2.3.3	Kalibrierung und Wiederfindung .....	39
2.3.4	Reduktion von Guanoxabenz durch das humane, rekombinant hergestellte mARC-haltige Enzymsystem .....	41
2.3.5	Reduktion von Guanoxabenz durch porcine hepatische und extrahepatische Enzymquellen.....	46
2.4	Diskussion .....	51
2.5	Zusammenfassung.....	53
3	Untersuchungen zum Zusammenhang von mARC und <i>Diabetes mellitus</i> . 55	
3.1	Thema und Zielsetzung.....	55
3.2	Methoden.....	57
3.2.1	Materialien und Geräte.....	57
3.2.2	Kultivierung und Charakterisierung von Zelllinien zur Untersuchung des mARC-haltigen Enzymsystems.....	57
3.2.3	Induktionsstudien mit Zelllinien.....	63
3.2.4	Das Mausmodell für Diabetes Typ 1 induziert durch Streptozocin-Injektion .....	66
3.3	Ergebnisse.....	72

3.3.1	Charakterisierung von Zelllinien für die Eignung von Studien zum mARC-haltigen Enzymsystem.....	72
3.3.2	Studien zur Induktion der mARC-Proteine in Zellkulturen.....	77
3.3.3	Veränderungen von mARC2 im STZ-Mausmodell .....	91
3.4	Diskussion .....	100
3.4.1	Studien zur Induktion der mARC-Proteine in Zellkulturen.....	100
3.4.2	Veränderungen des mARC-Proteins im STZ-Mausmodell .....	105
3.5	Zusammenfassung.....	107
4	Untersuchungen zur Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems am Energiestoffwechsel in verschiedenen Mausmodellen .....	109
4.1	Thema und Zielsetzung.....	109
4.2	Methoden.....	111
4.2.1	Materialien und Geräte.....	111
4.2.2	RNA-Extraktion und Expressionsanalyse mittels qRT-PCR.....	114
4.2.3	Herstellung von Leberhomogenaten zur weiteren Untersuchung .....	116
4.2.4	Western Blot-Analyse.....	116
4.2.5	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität .....	116
4.2.6	Bestimmung von Lipidperoxiden als oxidativer Stressmarker mit der FOX-Methode .....	117
4.3	Ergebnisse.....	119
4.3.1	Körpergewicht der Mäuse .....	119
4.3.2	Analyse der Expression von mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R .....	120
4.3.3	Western Blot-Analyse.....	125

4.3.4	<i>N</i> -reduktive Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem .....	127
4.3.5	Lipidperoxide als Marker für oxidativen Stress.....	130
4.4	Diskussion .....	133
4.5	Zusammenfassung.....	134
5	Untersuchungen zur Regulation von mARC durch Nahrungsaufnahme in Mäusen....	137
5.1	Thema und Zielsetzung.....	137
5.2	Methoden.....	139
5.2.1	Materialien und Geräte.....	139
5.2.2	Zellkulturstudien im HepG2-Modellsystem .....	139
5.2.3	Tierversuche.....	140
5.2.4	RNA-Extraktion und Expressionsanalyse mittels qRT-PCR.....	142
5.2.5	Herstellung von Leberhomogenaten zur weiteren Untersuchung .....	142
5.2.6	Gewinnung von Plasma zur Quantifizierung von Benzamidin .....	142
5.2.7	Western Blot-Analyse.....	143
5.2.8	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität .....	143
5.2.9	Bestimmung des Metaboliten Benzamidin in murinen Plasma- und Gewebeproben.....	143
5.3	Ergebnisse.....	145
5.3.1	Veränderungen in HepG2-Zellen als Modell der Nahrungskarenz.....	145
5.3.2	Veränderung der Expressionen von mARC1, mARC2, CYB5B, CYB5R und PCK1 durch Nahrungsentzug bei Mäusen .....	148

5.3.3	Veränderung der Proteinmenge von mARC2, CYB5B, CYB5R und PCK1 durch Nahrungsentzug bei Mäusen.....	150
5.3.4	Veränderung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch Nahrungsentzug bei Mäusen .....	151
5.3.5	Einfluss von Nahrungsentzug auf die <i>N</i> -reduktive Aktivität <i>in vivo</i> .....	152
5.3.6	Veränderung der Expressionen von mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R durch hochfetthaltige Diät bei Mäusen .....	153
5.3.7	Veränderung der Proteinmenge von mARC2, CYB5B und CYB5R durch hochfetthaltige Diät bei Mäusen .....	155
5.3.8	Veränderung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch hochfetthaltige Diät bei Mäusen.....	157
5.3.9	Entwicklung des Körpergewichts von Mäusen unter Standarddiät und HFD .....	159
5.4	Diskussion .....	160
5.5	Zusammenfassung.....	165
6	<i>In vitro</i> Studien zur Verknüpfung von mARC und Fettstoffwechsel .....	167
6.1	Thema und Zielsetzung.....	167
6.2	Methoden.....	170
6.2.1	Materialien und Geräte.....	170
6.2.2	Kultivierung von 3T3-L1-Zellen .....	170
6.2.3	Adipogene Induktion von 3T3-L1-Prädipozyten .....	171
6.2.4	Adipogene Induktion von 3T3-L1-Prädipozyten unter Zusatz von NAC...	172
6.2.5	Kultivierung von hMSCs.....	172

6.2.6	Adipogene Induktion von hMSCs.....	173
6.2.7	Bestimmung der Lipidakkumulation mittels Oil-Red-O-Färbung.....	174
6.2.8	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität.....	175
6.2.9	Western Blot-Analyse.....	175
6.2.10	Hemmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch Acyl-CoAs im <i>in vitro</i> Biotransformationsansatz rekombinant hergestellter Proteine.....	176
6.3	Ergebnisse.....	177
6.3.1	Adipogene Induktion von 3T3-Prädipozyten.....	177
6.3.2	Adipogene Induktion von hMSCs.....	183
6.3.3	Hemmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität durch Acyl-CoAs im <i>in vitro</i> Biotransformationsansatz rekombinant hergestellter Proteine.....	188
6.4	Diskussion.....	190
6.5	Zusammenfassung.....	195
7	Schlussfolgerung und Zusammenfassung.....	197
8	Materialien und Geräte.....	201
8.1	Verwendete Chemikalien.....	201
8.2	Verwendete Geräte.....	202
8.3	Für die Kultivierung von Zellen und sonstige Versuche verwendete Verbrauchsmaterialien.....	204
8.4	Für die Kultivierung von Zellen verwendete Medien und Reagenzien.....	206
8.5	Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper.....	208
	Literaturverzeichnis.....	210



# 1 Einleitung

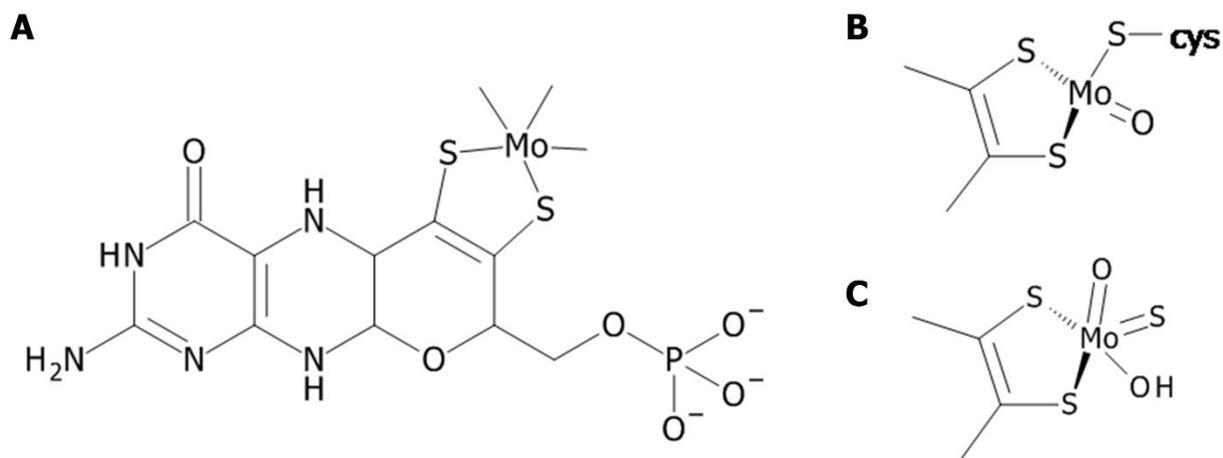
## 1.1 Mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte bisher in Säugern identifizierte Molybdoenzym (Havemeyer *et al.*, 2011; Hille *et al.*, 2011). Das Protein ist an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen beteiligt und wurde im Rahmen der Aufklärung des *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus entdeckt. Bereits 1974 postulierten Kadlubar und Ziegler (Kadlubar *et al.*, 1974) die Existenz eines microsomalen Hydroxylamin-reduzierenden Systems, bestehend aus Cytochrom  $b_5$  und dessen NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase sowie einem dritten unbekanntem Protein. 2006 gelang es Havemeyer *et al.* (Havemeyer *et al.*, 2006) dieses dritte Protein aus Mitochondrien der Schweineleber zu reinigen und zu identifizieren. Aufgrund seiner Lokalisation und der Eigenschaft Amidoxime reduzieren zu können, bekam es den Namen mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) (Havemeyer *et al.*, 2006). In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass mARC ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa besitzt, als Monomer vorliegt und den Molybdäncofaktor (Moco) enthält (Havemeyer *et al.*, 2006). Der Moco kommt ubiquitär in allen Molybdoenzymen (mit Ausnahme der bakteriellen Nitrogenase) vor (Havemeyer *et al.*, 2011) und ist für die Aktivität des Enzyms unerlässlich (Wahl *et al.*, 2010). Das Spurenelement Molybdän selbst ist biologisch inaktiv, erst der Einbau in Molybdopterin, eine tricyclische Pterinverbindung und Vorstufe des Moco, ermöglichen seine biologische Aktivität (Abbildung 1 A).

Des Weiteren ist mARC als einzelnes Enzym nicht *N*-reduktiv aktiv, sondern benötigt mitochondriales Cytochrom  $b_5b$  (CYB5B) und mitochondriale NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase (CYB5R) sowohl in zellulären Systemen (Neve *et al.*, 2012; Plitzko *et al.*, 2013;

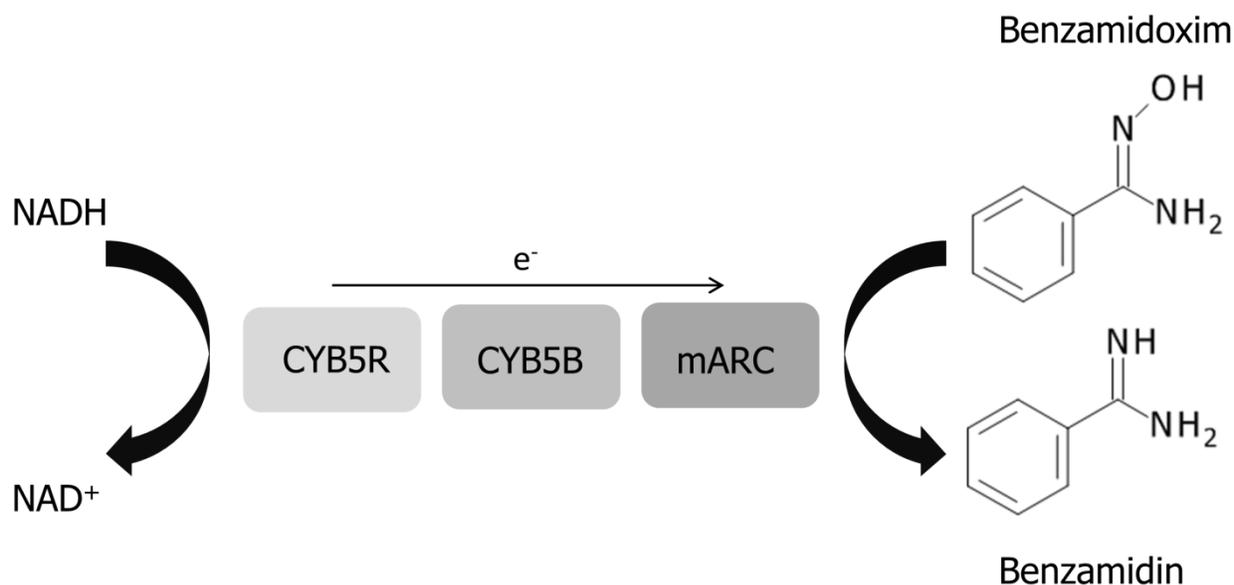
Plitzko, Dissertation in Vorbereitung) als auch für die Rekonstitution des Systems *in vitro* (Abbildung 2) (Kotthaus *et al.*, 2011; Plitzko *et al.*, 2013).

Alle bisher untersuchten Genome von Säugern kodieren für zwei mARC-Proteine, mARC1 und mARC2 (Wahl *et al.*, 2010). Die Proteine zeigen große Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz (Hille *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2010). Für das humane mARC1 kodieren 337 Aminosäuren, für mARC2 335 Aminosäuren (Havemeyer *et al.*, 2011). Die 3D Struktur der Proteine ist bisher nicht bekannt. Beide Isoformen sind nach Rekonstitution mit CYB5B und CYB5R *in vitro* *N*-reduktiv aktiv. Bisher ist wenig über funktionelle Unterschiede zwischen den beiden mARC-Proteinen bekannt, lediglich die Umsetzung von *N*-Oxiden im rekonstituierten System mit humanen Proteinen diskriminiert zwischen mARC1 und mARC2 (Froiep, 2013; Jakobs *et al.*, 2014). Dennoch weist das Vorkommen zweier Isoformen im Organismus auf die Notwendigkeit zweier Proteine mit möglicherweise unterschiedlichen Funktionen oder Substraten hin (Hille *et al.*, 2011).



**Abbildung 1. Struktur des Molybdäncofactors (Moco).**

**A** Molybdän eingebunden in das Molybdopterin des Molybdäncofactors. **B** Xanthinoxidasefamilie  
**C** Sulfitoxidasefamilie



**Abbildung 2. Das *N*-reduktive System.**

Elektronen werden von NADH auf CYB5R übertragen, von dort gelangen sie via CYB5B zu mARC, welches Benzamidoxim zu Benzamidin reduziert.

**1.1.1 Gewebeverteilung von mARC**

Für das humane mARC1 sind hohe Expressionen in der Schilddrüse und in Adipozyten, für das humane mARC2 in der Schilddrüse, den Adipozyten, der Niere, der Lunge und der Leber beschrieben (Malik *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2004). Für das murine mARC1 sind hohe Expressionen in der Leber, für das murine mARC2 im Dünndarm, der Leber, der Niere und der Prostata gefunden worden (Lattin *et al.*, 2008). Eigene Studien des Arbeitskreises konnten hohe Proteinmengen für mARC2 in porcinen Geweben aus Leber, Niere und Schilddrüse nachweisen, welche mit der *N*-reduktiven Aktivität dieser Fraktionen korrelierten. Im Vergleich zu den übrigen Geweben wurden außerdem größere Mengen mARC1 in Leber und Niere detektiert (Krompholz *et al.*, 2012; Krischkowski, Dissertation in Vorbereitung). Andersson *et al.* konnten außerdem neben hohen *N*-reduktiven Aktivitäten in den Mitochondrien der humanen Leber auch *N*-reduktive Aktivität in Mitochondrien des humanen Fettgewebes (ca. Faktor 10 geringer als in der Leber) nachweisen (Andersson *et al.*, 2005).

### **1.1.2 Subzelluläre Lokalisation von mARC**

mARC2 wurde 2006 aus der äußeren mitochondrialen Membran der porcinen Leber gereinigt (Havemeyer *et al.*, 2006). Auch spätere Studien zeigten die höchste *N*-reduktive Aktivität in diesem Kompartiment porcinen Ursprungs (Kotthaus *et al.*, 2011), sowie in der äußeren mitochondrialen Membran der Rattenleber (Neve *et al.*, 2012). Klein *et al.* wiesen 2012 eine Lokalisation von mARC1 in der äußeren Membran von Mitochondrien humaner Zellen nach (Klein *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte Klein *et al.* die Lage des Proteins in der Membran bestimmen. Sie wiesen eine Orientierung des C-Terminus mit der katalytischen Domäne zum Cytosol sowie des N-terminales Teils des Proteins in Richtung des mitochondrialen Intermembranraums nach. Somit stimmen Lage und Lokalisation von mARC1 mit denen von CYB5B und CYB5R überein. Außerdem konnten Klein *et al.* am N-Terminus ein 20 Aminosäuren umfassendes, mitochondriales Targeting-Signal sowie den Membrananker nachweisen. Des Weiteren wurde mARC in den Arbeiten von Klein *et al.* als Teil eines 350 kDa umfassenden Komplexes identifiziert, in welchem neben CYB5B und CYB5R (gemeinsam mit mARC ca. 90 kDa) weitere bisher nicht identifizierte Proteine beteiligt sind und möglicherweise einen Multienzymkomplex bilden (Klein *et al.*, 2012), dessen Funktion noch nicht aufgeklärt ist. Außerdem beschrieben Da Cruz *et al.* (Da Cruz *et al.*, 2003) eine Lokalisation des Proteins in der inneren mitochondrialen Membran der murinen Leber. Auch eine Lokalisation in Peroxisomen aus der Rattenleber bzw. der murinen Niere wurde beschrieben (Islinger *et al.*, 2007; Wiese *et al.*, 2007).

### **1.1.3 Beteiligung am *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus**

Die Beteiligungen von mARC gemeinsam mit CYB5B und CYB5R am *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus gilt als gesichert (Froriep *et al.*, 2013; Havemeyer *et al.*, 2006; Kotthaus *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2010). Neben Amidoximen wird die Reduktion von

*N*-Hydroxy-amidinohydrazonen und *N*-Hydroxy-sulfonamiden durch mARC und seine Partnerproteine katalysiert (Gruenewald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010). Außerdem stellen auch Hydroxamsäuren, Oxime und *N*-Oxide Substrate des mARC-haltigen Enzymsystems dar (Froriep, 2013; Jakobs *et al.*, 2014). Im Falle der *N*-Oxide wird die Reduktion allerdings lediglich durch die Isoform mARC1 katalysiert (Froriep, 2013; Jakobs *et al.*, 2014).

Das mARC-haltige Enzymsystem ist an der Reduktion und somit Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs beteiligt. Bei dem Prodrugprinzip „Amidoxime an Stelle von Amidinen“ werden Amidoxime eingesetzt, die aufgrund ihrer Struktur bei physiologischen pH-Werten ungeladen und somit oral bioverfügbar sind. Durch die mARC-katalysierte Reduktion *in vivo* entsteht die Wirkform, das Amidin. Amidine sind stark basische Verbindungen und bei physiologischen pH-Werten protoniert und geladen. Diese Ladung ist häufig für die Interaktion mit der Zielstruktur notwendig. So kann z.B. im Falle von Thrombin der Amidinrest mit einer Aspartat-Gruppe des Thrombins wechselwirken. Der Nachteil dieser Ladung ist die fehlende Bioverfügbarkeit der Substanzen, da biologische Membranen nicht durch Diffusion durchdrungen werden können. Dieses Problem kann aber mit dem Prodrugprinzip „Amidoxime an Stelle von Amidinen“ umgangen werden. Dieses Prinzip wird beispielweise bei dem Prodrug Upamostat (Mesupron<sup>®</sup>) angewendet. Die Wirkform, das Amidin (WX-UK1), ist ein Urokinase-Inhibitor, der zur Behandlung von Brust- und Pankreaskarzinomen eingesetzt werden kann und derzeit die Phase II der klinischen Studien erfolgreich beendet hat (Froriep *et al.*, 2013).

### **1.1.4 Hinweise zur endogenen Funktion**

Über die endogene Funktion der beiden mARC-Proteine ist derzeit wenig bekannt. Eine Beteiligung an Detoxifizierungsreaktionen, wie sie für Xenobiotika-metabolisierende

Enzyme häufig ist, konnte von Krompholz *et al.* nachgewiesen werden. Das Enzymsystem ist *in vitro* an der Reduktion und Detoxifizierung *N*-hydroxylierter und mutagener DNA-Basenanaloga beteiligt (Krompholz *et al.*, 2012). Im Einklang hiermit stehen die Ergebnisse von Mikula *et al.*, die eine verminderte Expression von mARC2 in Gewebeproben von Kolonkarzinom-Patienten nachwies (Mikula *et al.*, 2010).

Als weitere mögliche Funktion wird eine Beteiligung am NO-Metabolismus diskutiert. Das mARC-haltige Enzymsystem reduziert das Intermediat *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin, welches bei der enzymatischen Freisetzung von NO aus L-Arginin durch die Enzyme der NO-Synthase entsteht (Kotthaus *et al.*, 2011). Somit ist mARC in der Lage, die Bildung von NO zu hemmen oder ggf. zu regulieren. Sparacino-Watkins *et al.* konnte außerdem die Reduktion von Nitrit zu NO durch mARC unter anaeroben Bedingungen nachweisen (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Da es sich allerdings bei beiden Studien um *in vitro* Befunde handelt, sind für den Nachweis einer möglichen Beteiligung am NO-Stoffwechsel weitere Untersuchungen in zellulären Systemen oder *in vivo* nötig.

Ein möglicher Zusammenhang von mARC und *Diabetes mellitus* ist ebenfalls beschrieben. Malik *et al.* zeigten Veränderungen der Expression von mARC2 in diabetischen Tiermodellen sowie durch Glukose in Zellkulturen (Malik *et al.*, 2007). Außerdem beschrieben Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2010) eine genetische Variation für mARC2, welche mit einem erhöhten Risiko für Diabetes der Typen 1 und 2 einhergeht (Chen *et al.*, 2010).

Eine mögliche Verknüpfung mit dem Lipidstoffwechsel wurde im Verlauf dieser Arbeit ebenfalls beschrieben. Neve *et al.* und Newton *et al.* konnten unabhängig voneinander die Zunahme von mARC2 bei der Differenzierung und Reifung muriner 3T3-Adipozyten zeigen (Neve *et al.*, 2012; Newton *et al.*, 2011). Außerdem wurde ein *single nucleotide polymorphism* (SNP) im Bereich des mARC1 Locus mit veränderten Plasmalipidprofilen

(Teslovich *et al.*, 2010) sowie mit einem veränderten Ansprechen auf Fenofibrat (Aslibekyan *et al.*, 2012) beschrieben.

### **1.1.5 Weitere Molybdoenzyme**

Neben mARC existieren noch vier weitere eukaryotische Molybdoenzyme, von denen allerdings nur drei in Säugern vertreten sind: Die Xanthindehydrogenase, die Aldehydoxidase und die Sulfitoxidase. Die Nitratreduktase existiert in Organismen, die Nitrat assimilieren (Mendel *et al.*, 2006). Die Familie der Molybdoenzyme katalysiert im Allgemeinen Redoxreaktionen im Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoffmetabolismus (Mendel *et al.*, 2006).

Die Xanthindehydrogenase ist ein Molybdoflavoprotein von 150 kDa, welches außerdem zwei Eisenschwefelcluster enthält und als Dimer aktiv ist. Neben einer cytosolischen Lokalisation wird die Lokalisation in Peroxisomen diskutiert. Das Enzym katalysiert die oxidative Hydroxylierung von Aldehyden und aromatischen Heterozyklen und spielt eine zentrale Rolle im Abbau von Purinen. Es katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zur Harnsäure wobei Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  oder molekularen Sauerstoff übertragen werden. Durch letzteres entstehen Superoxidanionen und in tierischen Organismen Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Die Xanthindehydrogenase kann in einigen Organismen reversibel oder irreversibel in die Xanthinoxidase umgewandelt werden. Dieses Enzym oxidiert ebenfalls Purine, akzeptiert jedoch nur molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Die Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase sind also neben dem Purinabbau am Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt (Mendel *et al.*, 2006).

Die Aldehydoxidase ist ein cytosolisches Enzym, welches wie die Xanthinoxidase Aldehyde und aromatische Heterozyklen zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert. Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase weisen große Ähnlichkeiten auf: Beide

Enzyme haben dieselbe prosthetische Gruppe gebunden, ein ähnliches Molekulargewicht und sind als Dimere aktiv. Anders als die Xanthindehydrogenase akzeptiert die Aldehydoxidase lediglich molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor. In tierischen Organismen entstehen dabei Superoxidanionen und  $H_2O_2$ . Die endogenen Substrate dieses Enzyms sind nach wie vor unbekannt (Mendel *et al.*, 2006).

Die Sulfitoxidase katalysiert die Oxidation von Sulfit zu Sulfat und überträgt dabei in tierischen Organismen die Elektronen auf Cytochrom c. Dies ist der letzte Schritt im Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren. Das Enzym ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und enthält in tierischen Organismen neben dem Moco eine CYB5-Domäne. In Pflanzen fehlt die CYB5-Domäne und als Elektronenakzeptor fungiert molekularer Sauerstoff (Mendel *et al.*, 2006).

Die Nitratreduktase ist ausschließlich in Organismen, die Nitrat assimilieren wie Pflanzen und Bakterien, lokalisiert. Das Enzym katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und befindet sich im Cytosol. Es bindet drei prosthetische Gruppen: Den Moco gefolgt von einer Häm-haltigen CYB5-Domäne und einer FAD-haltigen Domäne. Das Enzym überträgt Elektronen von NADH oder NADPH auf FAD, die dann via dem Häm in der CYB5B-Domäne auf den Moco übergehen, wo schließlich Nitrat reduziert wird. Zusätzlich ist das Enzym in der Lage, Nitrit zu NO zu reduzieren und trägt somit zur Entstehung dieses Signalmoleküls bei. Die prosthetischen Gruppen und der Elektronenfluss stimmen somit mit denen des *N*-reduktiven Systems, bestehen aus mARC, CYB5B und CYB5R überein. Das Enzym ist wie die Aldehydoxidase und Xanthinoxidase als Dimer aktiv (Mendel *et al.*, 2006).

Die Molybdoenzyme sind in zwei Familien unterteilt, abhängig von ihrer Bindung des Mocos (Abbildung 1 B und C). Zur Sulfitoxidasefamilie gehört neben der Sulfitoxidase auch die Nitratreduktase. Diese Enzyme werden direkt durch den Einbau des Mocos in das Apoprotein aktiviert. Der Moco ist hierbei durch einen Cysteinrest des Proteins

koordinativ gebunden. Zur zweiten Familie, der Xanthinoxidasefamilie, gehören die Xanthinoxidase und die Aldehydoxidase. Diese Enzyme benötigen nach dem Einbau des Moco in das jeweilige Apoprotein noch eine Aktivierung mit Hilfe des Enzyms Moco-Sulfurase. Hierbei wird ein anorganisches Schwefelatom in den Moco eingeführt und das Enzym dadurch aktiviert. Die Enzyme dieser Familie haben, anders als die Enzyme der Sulfitoxidasefamilie, keine Bindung eines proteineigenen Schwefelatoms an den Moco. Die Aktivität der Enzyme dieser Familie lässt sich durch Zugabe von Cyanid und somit der Entfernung des für die katalytische Aktivität wichtigen Schwefelatoms hemmen. Bei den Enzymen der Sulfitoxidasefamilie hingegen führt die Zugabe von Cyanid zu keiner Inaktivierung (Mendel *et al.*, 2006), ebenso wie im Falle der mARC-Proteine. Außerdem resultiert die Mutation stark konservierter Cysteinreste (mARC1 cys273, mARC2 cys272) zu Serin in Veränderungen im Elektronenspinresonanz-Spektrum des Proteins und weist damit auf eine mögliche Beteiligung der Cysteinreste an einer koordinativen Bindung des Moco hin (Havemeyer *et al.*, 2011). Auf Grundlage dieser Befunde wird mARC der Sulfitoxidasefamilie zugeordnet (Havemeyer *et al.*, 2011). Malik *et al.* beschrieben 2007 für mARC ein Thioredoxin-Motiv (CxxC) mit den konservierten Cysteinresten (mARC1 cys273 und cys 270, mARC2 cys 272 und cys269) (Havemeyer *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2007) und stellten die Hypothese über eine mögliche Beteiligung an der Regulation des Redoxstatus der Zelle durch mARC auf. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da wie Eingangs diskutiert, Teile des Thioredoxin-Motivs an der koordinativen Bindung des Moco beteiligt zu sein scheinen (Havemeyer *et al.*, 2011).

## 1.2 Energiestoffwechsel

Da sich bereits im Vorfeld, aber auch im Rahmen dieser Arbeit, Hinweise auf eine Verknüpfung des mARC-haltigen Enzymsystems mit dem Energiestoffwechsel ergeben haben, soll hier eine kurze Übersicht über den Energiestoffwechsel im Menschen

gegeben werden. Außerdem wird kurz auf die zwei häufigsten Störungen des Energiestoffwechsels und den damit einhergehenden Krankheitsbildern, Diabetes mellitus und metabolisches Syndrom, eingegangen, da Tiermodelle für beide Erkrankungen im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tierische Organismen, zu denen auch der Mensch zählt, gewinnen ihre benötigte Energie durch den Abbau von Nahrungsbestandteilen wie Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen. Als universeller Energieträger dient hierbei letztlich Adenosintriphosphat (ATP). Die wichtigsten Moleküle zur Energiegewinnung sind die aus der Spaltung von Kohlenhydraten gewonnene Zucker. Der erste Schritt im Abbau und der Oxidation der Zucker ist die Glykolyse. Dieser universelle Stoffwechselvorgang findet in vielen Organismen, auch in Anaerobiern, statt. In tierischen Zellen ist sie im Cytosol lokalisiert. Hierbei wird Glukose unter ATP-Gewinn in zwei Moleküle Pyruvat umgewandelt. Das entstandene Pyruvat tritt nach Umwandlung in Acetyl-CoA durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex unter aeroben Bedingungen in die Mitochondrien und in den Zitratzyklus ein. In der mitochondrialen Matrix wird Acetyl-CoA unter Gewinn von NADH, FADH und GTP vollständig zu  $\text{CO}_2$  oxidiert. Die entstandenen Energieträger NADH, FADH stehen schließlich der oxidativen Phosphorylierung durch die mitochondriale Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran zur Verfügung. Die zuvor mit Hilfe der Elektronentransportmoleküle NADH und FADH transportierten Elektronen, die den im Zitratzyklus oxidierten Molekülen entstammen, werden durch eine Elektronentransportkette auf  $\text{O}_2$  übertragen, wobei Wasser entsteht. Die freiwerdende Energie wird zur Etablierung eines Protonengradienten genutzt, welcher die Synthese von ATP aus ADP durch die ATP-Synthase antreibt (Alberts, 2011).

In diese Stoffwechselwege können Moleküle aus anderen Stoffwechselwegen ein- und ausgeschleust werden. Der Zitratzyklus dient in diesem Zusammenhang als eine Art zentrale „Stoffwecheldrehscheibe“. Das im Zitratzyklus abgebaute Acetyl-CoA kann zum

Beispiel auch dem Abbau von Fetten entstammen. Hierzu werden Fette in Fettsäuren und Glycerin gespalten. Die Fettsäuren können in ihrer aktivierten Form (Acyl-CoAs), in der mitochondrialen Matrix durch die  $\beta$ -Oxidation durch schrittweise Verkürzung um zwei Kohlenstoffatome zu Acetyl-CoA abgebaut werden. Der Abbau von Aminosäuren zu  $\text{CO}_2$  und Wasser aus Proteinen liefert ebenfalls unter anderem Acetyl-CoA, welches in den Zitratzyklus eintreten kann. Der Stickstoff dieser Aminosäuren wird über den Harnstoffzyklus entgiftet, ansonsten hat jede Aminosäure ihren individuellen Abbauweg (Alberts, 2011). Die aus der Nahrung aufgenommenen essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren dienen allerdings hauptsächlich der Biosynthese von Proteinen und anderen stickstoffhaltigen Verbindungen. Nicht essentielle Aminosäuren können bei Bedarf vom Körper synthetisiert werden (Alberts, 2011).

Sowohl Glykolyse als auch Zitratzyklus sind gleichzeitig Ausgangspunkte für anabole Stoffwechselwege. Die hier entstehenden Verbindungen stellen Ausgangsmoleküle für zahlreiche Biosynthesewege zur Verfügung, wie z.B. Dihydroxyacetonphosphat für die Lipidsynthese oder Oxalacetat zur Synthese von Purinen und Pyrimidinen sowie Aminosäuren. Ein- und dasselbe Molekül, z.B. Pyruvat, kann somit Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Stoffwechselwegen sein (Alberts, 2011).

Da einige Zellen wie z.B. die Nervenzellen und die Erythrozyten exklusiv Glukose zur Gewinnung von Energie verarbeiten können, ist der Körper auf die Möglichkeit der eigenen Synthese von Glukose angewiesen, sollte keine Aufnahme von Glukose möglich sein. Dieser Vorgang wird als Glukoneogenese bezeichnet und ist grundsätzlich eine Umkehr der Glykolyse. Da allerdings einige Schritte der Glykolyse irreversibel sind, werden zum Teil andere Enzyme eingesetzt. Die Glukoneogenese erfolgt unter verhältnismäßig hohem Energieeinsatz (Löffler *et al.*, 2008). Nervenzellen können ferner unter Ausnahmebedingungen Ketonkörper zur Energiegewinnung metabolisieren, die z.B. aus Acetyl-CoA durch die Leber synthetisiert werden (Alberts, 2011).

Überschüssige, dem Körper zugeführte Kohlenhydrate werden in Form von Glykogen gespeichert. Aus diesem Makromolekül kann phosphorylierte Glukose freigesetzt werden, die dann im Zitratzyklus weiter abgebaut werden kann. Dieser Speicher kann den Menschen bis zu 24 h mit Glukose versorgen.

Eine weitere Speichermöglichkeit ist die Synthese von Fetten. Diese Synthese ist keine Umkehr der  $\beta$ -Oxidation, sie wird durch einen cytosolischen Multienzymkomplex katalysiert. Durch Übertragung von Malonyl-CoA auf Acetyl-CoA bzw. eine bereits entstandene Acylkette werden gesättigte Fettsäuren synthetisiert. Aus diesen können durch im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Desaturasen ungesättigte Fettsäuren gewonnen werden. Die entstandenen Fettsäuren können enzymatisch mit  $\alpha$ -Glycerolphosphat und Tricycleriden verestert werden, die wiederum zur Speicherung in Adipozyten und in der Leber genutzt werden (Löffler *et al.*, 2008).

Die Regulation des Energiestoffwechsels wird hauptsächlich durch Insulin und seinen Gegenspieler Glucagon übernommen. Der Anstieg des Blutzuckerspiegels nach Nahrungsaufnahme führt zur Ausschüttung von Insulin, welches den Körper auf die Speicherung von Energie sowie die Synthese von Proteinen einstellt. Glukose wird über den GLUT2-Transporter in die Leber aufgenommen, wo Glukose-6-Phosphat entsteht und Glykogen als Speichersubstanz gebildet wird. Insulin bewirkt gleichzeitig die Aufnahme von Glukose in den Muskel und die Adipozyten. Auch im Muskel kommt es zur Bildung von Glykogen. In den Adipozyten wird durch das vermehrte Vorkommen von Glycerol-3-phosphat durch Metabolisierung der Glukose die Bildung von Triglyceriden forciert. Außerdem bewirkt Insulin die Aufnahme von verzweigten Aminosäuren in den Muskel und stimuliert die Proteinsynthese. Folgt nun auf die Nahrungsaufnahme eine Nahrungskarenz, z.B. durch nächtliche Ruhephasen, kommt es nach einigen Stunden zu einem Abfall des Blutzuckerspiegels. Dies vermindert die Insulinsekretion und stimuliert die Ausschüttung von Glukagon. Glukagon entfaltet seine Hauptwirkung in der Leber.

Hier werden der Abbau von Glykogen und die Glukoneogenese gefördert, um Glukose für die glukoseabhängigen Gewebe zur Verfügung zu stellen. Außerdem inhibiert Glukagon die Synthese von Fettsäuren. Leber- und Muskelgewebe gewinnen vermehrt Energie aus dem Abbau von Fetten, die aus den Adipozyten freigesetzt und gespalten werden. Durch diese Umstellungen, die Spaltung von Glykogen in der Leber, die Freisetzung von Fetten aus den Speichern und die Nutzung von Fetten statt Glukose zur Energiegewinnung von Muskel und Leber, gelingt es, den Blutzuckerspiegel konstant zu halten. Wenn die Glykogenspeicher erschöpft sind, wird vermehrt Glukoneogenese aus Laktat und der Aminosäure Alanin in der Leber betrieben, um Glukose für die glukoseabhängigen Gewebe zur Verfügung zu stellen. Nach erneuter Nahrungsaufnahme wird Glukose zunächst nicht aus dem Blut in die Leber absorbiert, sondern den peripheren Geweben zur Verfügung gestellt. Die Leber betreibt weiterhin Glukoneogenese, die entstehende Glukose wird nun für die Synthese von Glykogen verwendet (Berg *et al.*, 2002).

Weitere Regulationen können auch durch die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin und das Signalmolekül NO erfolgen (Jobgen *et al.*, 2006; Löffler *et al.*, 2008).

In seiner Gesamtheit ist der Energiestoffwechsel mit dem Abbau von verschiedenen Energieträgern zur ATP-Gewinnung auf der einen Seite und der Speicherung von Energieträgern auf der anderen Seite, sowie der Verknüpfung mit zahlreichen Biosynthesen verschiedener Moleküle äußerst komplex. Bis heute sind nicht alle Wege und Verknüpfungen vollständig aufgeklärt (Alberts, 2011).

## **Störungen des Energiestoffwechsels**

### *Diabetes mellitus*

Als *Diabetes mellitus* beschreibt man eine Erkrankung des Energiestoffwechsels, bei der es zu einem vollständigen oder relativen Insulinmangel bei chronischer Hyperglykämie kommt. In Deutschland liegt die Prävalenz bei 5-6 %, mit zunehmenden Fallzahlen (Mutschler, 2001).

Diabetes Typ 1 liegt eine Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen des Pankreas zugrunde. Dies geschieht bei genetischer Prädisposition in Form einer Autoimmunreaktion, bei der es zu einer Entzündung der  $\beta$ -Zellen gefolgt von deren Untergang kommt. Diabetes Typ 1 kann nur durch die Substitution von Insulin behandelt werden (Mutschler, 2001).

Bei Diabetes Typ 2 liegt ein relativer Insulinmangel vor. Die vom Körper produzierten Insulinmengen können keine der Stoffwechsellage adäquate Reaktion mehr auslösen. Dies liegt zum einen an einer verminderten Insulinproduktion und zum anderen an einer relativen Insulinresistenz der Zielgewebe. Diabetes Typ 2 geht häufig mit Fettleibigkeit einher, 80 % der Typ 2 Diabetiker sind übergewichtig. Neben diätetischen Maßnahmen und ggf. Gewichtsreduktion kann Diabetes Typ 2 mit zahlreichen oralen Antidiabetika verschiedener Klassen behandelt werden. Außerdem kann die Substitution von Insulin notwendig sein (Mutschler, 2001).

Die Stoffwechselstörungen, die durch den Insulinmangel ausgelöst werden, führen unter anderem zu einer gestörten Glukoseverwertung mit einer mangelhaften Aufnahme von Glukose in die Zellen bei gleichzeitiger Glukoneogenese. Die Folge sind Hyperglykämie und bei Überschreitung der Nierenschwelle Glukosurie. Außerdem kommt es zu einer gesteigerten Lipolyse in der Leber und der Muskultur und in der Folge zu einem Anstieg

freien Fettsäuren im Plasma und triglyceridreicher Lipoproteine in der Leber. Gesteigerter Eiweißabbau in den Muskeln führt außerdem verstärkt zur Ketonkörperbildung (Mutschler, 2001).

Als Spätfolgen können durch *Diabetes mellitus* Mikroangiopathien z.B. an Niere und Netzhaut, Makroangiopathien wie Schlaganfall, Herzinfarkt und periphere arterielle Verschlusskrankheit, Neuropathien und der diabetische Fuß auftreten (Mutschler, 2001).

### Adipositas und metabolisches Syndrom

Eine weitere in westlichen Industrienationen häufige Störung des Energiestoffwechsels ist das Vorkommen von Übergewicht und Fettleibigkeit (Adipositas). Der häufigste Grund ist eine überhöhte Kalorienaufnahme, Fehlernährung und verminderte körperliche Aktivität. Übergewicht und Adipositas gehen mit der erhöhten Gefahr von kardiovaskulären Erkrankungen einher. Besonders begünstigt wird dies durch Adipositas vom androiden Typ (vermehrtes Bauchfett) im Gegensatz zu Adipositas vom gynoiden Typ (vermehrtes Hüftfett).

Unter normalen Bedingungen wird das Körpergewicht neben Insulin durch das Proteohormon Leptin konstant gehalten (Berg *et al.*, 2002). Leptin wird von den Adipozyten auf Grund von verschiedenen Stimuli wie Nahrungsaufnahme oder erhöhter Blutglukosekonzentration, sowie durch Glucokortikoide oder Insulin sezerniert. Leptin entfaltet seine Wirkung über die im Hypothalamus befindlichen Leptinrezeptoren und induziert Sättigungsgefühl, verminderte Nahrungsaufnahme, Steigerung des Energieumsatzes und Thermogenese. Als Folge werden die Größe der Adipozyten und die Speicherfettmenge reduziert. Übergewichtige Personen haben erhöhte Leptinspiegel, sprechen aber nur noch vermindert auf das Hormon an. Es wird eine verminderte Empfindlichkeit der Leptinrezeptoren aufgrund der dauerhaft erhöhten Leptinkonzentration oder ein primärer Rezeptordefekt angenommen. Transgene Mäuse

mit Defekten des Leptingens oder des Leptinrezeptorgens zeigen ungebremste Nahrungsaufnahme (Hyperphagie) und bilden einen adipösen Phänotyp aus (Thews *et al.*, 1999).

Das metabolische Syndrom ist ein klinischer Phänotyp, bei dem Adipositas in der Kombination mit zwei oder mehreren der folgenden Symptome auftritt: Erhöhte Plasmaticlyceride (> 150 mg/dl), reduzierte HDL-Werte (< 40 mg/dl bei Männern und < 50 mg/dl bei Frauen), erhöhter Blutdruck (> 130/85 mm Hg) sowie erhöhte Nüchternplasmaglukose (> 100 mg/dl). Das metabolische Syndrom geht mit einem fünffach erhöhten Risiko für Diabetes Typ 2 sowie einem doppelt erhöhten Risiko für Herzinfarkte und Schlaganfälle einher. Derzeit sind ca. 20–25 % der Weltbevölkerung vom metabolischen Syndrom betroffen (Kennedy *et al.*, 2010). Es gibt verschiedene Tiermodelle zur Erforschung des metabolischen Syndroms (Kennedy *et al.*, 2010; Panchal *et al.*, 2011), von welchen einige im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

### **1.3 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die endogene Funktion der mARC-Proteine und des *N*-reduktiven Systems zu erlangen.

## 2 Reduktion des *N*-Hydroxy-amidinohydrazons Guanoxabenz

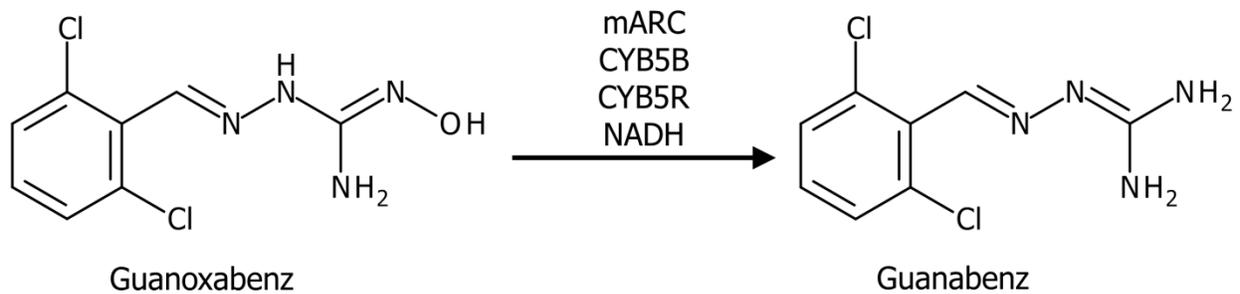
### 2.1 Thema und Zielsetzung

Die Beteiligung des mARC-haltigen *N*-reduktiven Systems an der Reduktion von *N*-Hydroxy-amidinen gilt als gesichert (Havemeyer *et al.*, 2006; Kotthaus *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2010). Auch die Reduktionen weiterer *N*-oxygenierter Verbindungen wie Sulfhydroxamsäuren, *N*-Oxiden und Oximen (Froriep, 2013; Havemeyer *et al.*, 2010; Jakobs *et al.*, 2014) durch das Enzymsystem wurden in der Zwischenzeit beschrieben. Grünewald (Gruenewald *et al.*, 2008) konnte bereits 2008 eine Umsetzung des Substrates Guanoxabenz, eines *N*-Hydroxy-amidinohydrazons durch das rekombinant hergestellte humane mARC1 nach *in vitro* Rekonstitution mit porcinen, gereinigten microsomalen CYB5B- und CYB5R-Proteinen nachweisen (Abbildung 3).

Bei Guanoxabenz handelt es sich um einen  $\alpha$ -Agonisten, der als Antihypertensivum eingesetzt wurde. Der aus der Reduktion durch das mARC-System resultierende Metabolit Guanabenz ist ebenfalls wirksam und als Antihypertensivum unter der Bezeichnung Wytesin<sup>®</sup> in den USA im Handel.

Grünewald konnte in der Eingangs erwähnten Studie zeigen, dass Guanoxabenz im Vergleich zu dem etablierten Modellsubstrat Benzamidoxim in dem von ihr getesteten System eine ca. 20-fach höhere *N*-reduktive Aktivitäten aufwies (Gruenewald *et al.*, 2008). Wenn dies auch für andere Systeme gälte, wäre das Substrat ein gutes Modellsubstrat zur Erforschung von Geweben mit geringer Aktivität. Ziel der nachfolgenden Studien war es, zu untersuchen ob Guanoxabenz als Modellsubstrat für Studien zum mARC-haltigen Enzymsystem geeignet ist. Es wurde die Reduktion von Guanoxabenz durch das rekombinant hergestellte, humane *N*-reduktive System,

bestehend aus mitochondrialen CYB5B- und CYB5R-Proteinen sowie mARC1 bzw. mARC2, untersucht. Außerdem wurde die Reduktion des Substrates Guanoxabenz durch hepatische und extrahepatische Mitochondrien und weitere subzelluläre Fraktionen charakterisiert.



**Abbildung 3. Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz.**

Das *N*-reduktive System aus mARC, CYB5B und CYB5R reduziert unter Verbrauch von NADH Guanoxabenz zu Guanabenz.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Materialien und Geräte

Soweit nicht anders angegeben sind die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 beschrieben.

### 2.2.2 Proteinquellen

#### 2.2.2.1 Herstellung der rekombinanten Proteine mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R

Die rekombinant hergestellten Proteine mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R wurden freundlicherweise von dem Arbeitskreis Mendel (Technische Universität Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Die Klonierung, Expression und Reinigung durch Affinitätschromatographie wurde nach der von Wahl *et al.* (Wahl *et al.*, 2010) beschriebenen Methode durchgeführt. Bei allen Systemen wurde der Expressionsvektor pQE80 der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt. Für die Herstellung von mARC1 (NP\_073583) und mARC2 (NP\_060386) wurde der *E. coli*-Stamm TP1000 verwendet, beide Proteine waren N-terminal um 51 Aminosäuren verkürzt. CYB5B (NP\_085056) wurde im *E. coli*-Stamm DL41 mit einer C-terminalen Verkürzung von 27 Aminosäuren, welches dem hydrophoben Membrananker entspricht, und CYB5R (NP\_085056) im selben Stamm mit einer N-terminalen Verkürzung von 27 Aminosäuren hergestellt. Neben der Proteinherstellung im Moco-akkumulierenden *E. coli*-Stamm TP1000 wurden mARC1 und mARC2 auch jeweils im Moco-defizienten *E. coli*-Stamm RK5204 hergestellt, der die Herstellung Molybdopterin und Moco-freier Varianten ermöglicht (Stewart *et al.*, 1982). Die Herstellung beider mARC-Proteine im *E. coli*-Stamm RK5206 führte außerdem zu Proteinen, die lediglich die Vorstufe des Molybdäncofaktors, Molybdopterin, enthalten.

### 2.2.2.2 Isolierung von porcinen Mitochondrien, Microsomen und Cytosol

Porcine hepatische Subfraktionen wurden durch eine im Arbeitskreis etablierte Methode mittels verschiedener Differential- und Dichtezentrifugationen gewonnen (Clement *et al.*, 2005; Havemeyer *et al.*, 2006) Die hierzu verwendeten porcinen Organe wurden von einem lokalen Schlachthof bezogen und frisch verarbeitet.

Die verwendeten Subfraktionen aus Hirn, Lunge, Schilddrüse, Herz und Milz wurden freundlicherweise von Carmen Krischkowski aus dem Arbeitskreis Clement zur Verfügung gestellt.

### 2.2.2.3 Charakterisierung der Proteinquellen

Der Proteingehalt von Homogenaten, subzellulären Fraktionen und rekombinant hergestellten Proteinen wurde nach der BCA Methode (Smith *et al.*, 1985) bestimmt. Es wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet, die Vermessung erfolgte bei 562 nm. Störungen durch Pufferbestandteile wurden durch eine Mitbestimmung des Puffers und spätere Korrektur der Messwerte um diesen Wert berücksichtigt. Zur Kalibrierung wurde Rinderserumalbumin (Bestandteil des Assay Kits) verwendet.

Der Gehalt an Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) in rekombinant hergestellter CYB5R wurde durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm ermittelt (Whitby, 1953). Zur Berechnung der Saturierung wurde ein Molekulargewicht für CYB5R von 33 kDa zugrunde gelegt.

Zur Bestimmung des Häm-Gehalts in CYB5B wurde das Differenzspektrum aus oxidiertes und NADH-reduzierter Form des Proteins aufgenommen (Eastbrook *et al.*, 1978). Die Saturierung wurde auf ein Molekulargewicht von 16 kDa für CYB5B bezogen.

### 2.2.3 HPLC-Methode zur Trennung von Guanoxabenz und Guanabenz

Zur Trennung von Guanoxabenz und Guanabenz sowie zur Quantifizierung des reduzierten Metaboliten Guanabenz wurde folgende HPLC-Methode verwendet:

Pumpe	Waters™ 600E Controller and Pump
Detektor	Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector
Autosampler	Waters™ 717 plus Autosampler
Software zur Integration	EZChrome Elite Software, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Roman, USA)
Stationäre Phase	LiChrospher 60 RP-select B (5 µM), 125,0 x 4,0 mm (VDS optilab Technik GmbH, Berlin) Vorsäule: Phenomenex LiChrospher 60 RP-select B (5 µm), 4,0 x 4,0 (Phenomenex Inc., Aschaffenburg)
Mobile Phase	70 % 100 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 4,0 (v/v) 30 % Methanol (v/v)
Flussrate	1 ml/min
Laufzeit	30 min
Detektion	UV, 272 nm
Injektionsvolumen	30 µl
Retentionszeiten	Guanoxabenz: 17,7 min, Guanabenz: 26,2 min

### 2.2.4 Kalibrierung und Wiederfindung

Eine Kalibrierung erfolgte mit sieben verschiedenen Konzentrationen Guanabenz in 20 mM MES-Puffer pH 6,0, die nach erfolgter Lösung mit einem Aliquot Methanol verdünnt wurden (Konzentrationsbereich 1-250 µM). Die Wiederfindung wurde mit Hilfe

von hitzeinaktivierten Schweinelebermitochondrien analog zum Standardinkubationsansatz aus 2.2.5 bestimmt.

### **2.2.5 *In vitro* Biotransformationsansatz**

Die Umsetzung von Guanoxabenz zu Guanabenz wurde unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37 °C bestimmt. Die Inkubation erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Ansatzvolumen von 150 µl in 20 mM MES-Puffer, pH 6,0 im Falle von rekombinant hergestellten Proteinen bzw. 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,0 im Falle von Homogenaten und subzellulären Fraktionen. Der Standardinkubationsansatz enthielt 3 mM Guanoxabenz. Zur Bestimmung der Substratabhängigkeit und der enzymkinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{max}$  wurden Substratkonzentrationen von 0,1-10 mM Guanoxabenz eingesetzt. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte nach 12 min durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Methanol. Nach fünfminütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Ansätze fünf Minuten bei 22.000 *g* zentrifugiert und die Überstände mit der beschriebenen Analytik vermessen.

Inkubationsansätze mit rekombinant hergestellten Proteinen enthielten 10 µg mARC1 oder mARC2, CYB5B in einer Menge, die 76 pmol Häm entspricht, sowie CYB5R in einer 7,6 pmol FAD entsprechenden Menge.

Im Falle von porcinen Enzymquellen wurden 0,05 mg Protein je Inkubationsansatz eingesetzt.

### **2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur weiteren Charakterisierung wurden Homogenate und subzelluläre Enzymquellen per SDS-PAGE getrennt und nachfolgend mittels Western Blot untersucht. Die SDS-PAGE

wurde nach dem diskontinuierlichen Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Folgende Puffer, Lösungen und Zusammensetzungen für Gele kamen zur Anwendung:

**Trenngelpuffer 4 x**

90,9 g Tris-Base

2,0 g SDS

*ad* 500 ml *Aqua bidest.*, pH 8,8

**Sammelgelpuffer 4 x**

30,3 g Tris-Base

2,0 g SDS

*ad* 500 ml *Aqua bidest.*, pH 6,8

**Trenngel 12,5 %**

4 ml *Aqua bidest.*

3 ml Trenngelpuffer 4 x

5 ml Acrylamid (Rotiphorese<sup>®</sup>)

10 µl TEMED

80 µl APS-Lösung (10 % (w/v))

**Sammelgel 4,5 %**

2,4 ml *Aqua bidest.*

1,0 ml Sammelgelpuffer 4 x

0,6 ml Acrylamid (Rotiphorese<sup>®</sup>)

6 µl TEMED

25 µl APS-Lösung (10 % (w/v))

**4 x SDS-Ladepuffer**

242,0 mg Tris-Base

800,0 mg SDS

4,7 ml Glycerin 86 %

2,0 ml β-Mecaptoethanol

2,0 mg Bromphenolblau

*ad* 10,0 ml *Aqua bidest.*

**Kathodenpuffer**

30,3 g Tris-Base

144,1 g Glycin

10,0 g SDS

*ad* 1000 ml *Aqua bidest.*

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit *Aqua bidest.* auf einen einheitlichen Proteingehalt verdünnt. Drei Teile Proteinlösung wurden mit einem vierten Teil 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und für zehn Minuten bei 100 °C im Wasserbad

denaturiert. Im Falle der untersuchten und verglichenen mitochondrialen Fraktionen wurden 8 µg Protein je Spur, im Falle der Homogenate und subzellulären Fraktionen 12 µg Protein je Spur geladen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde der Molekulargewichtsmarker *PageRuler® Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

### **2.2.7 Western Blot-Analyse**

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde ein Western Blot im *wet*-Verfahren durchgeführt, um die Proteinen aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Hybond P<sup>®</sup>, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) zu übertragen. Das Blotting erfolgte bei 90 V für zwei Stunden. Es folgte ein einstündiges Blockieren der freien Bindestellen der Membran in 5 % Milchpulverlösung in TBST-Puffer. Zur Immunodetektion wurden folgende primäre Antikörper verwendet: Anti-mARC2-, anti-GAPDH-, anti-CYB5R-, anti-CYB5B-, anti-VDAC- und anti-Calnexin-Antikörper. Die Inkubation der Membran mit den genannten Primäantikörpern erfolgte unter Schütteln bei 4 °C über Nacht. Als sekundärer Antikörper kamen anti-Rabbit- bzw. anti-Goat-IgG-Antikörper zum Einsatz, welche jeweils Peroxidase-gekoppelt waren und mit welchen die Membran unter Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Alle Antikörper wurden in 5 % Milchpulver in TBST verdünnt, die verwendeten Verdünnungen sind jeweils den Bildunterschriften zu entnehmen.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL plus Western Blotting Detection Systems (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), die resultierende Chemilumineszenz wurde mittels Fotofilm (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) dokumentiert.

Folgende Puffer kamen zum Einsatz:

**Transferpuffer**

20 % (v/v) Methanol

25 mM Tris-HCl

192 mM Glycin

**TBST-Puffer**

2 mM Tris-Base, pH 7,6

14 mM NaCl

0,1 % TWEEN<sup>®</sup> 20

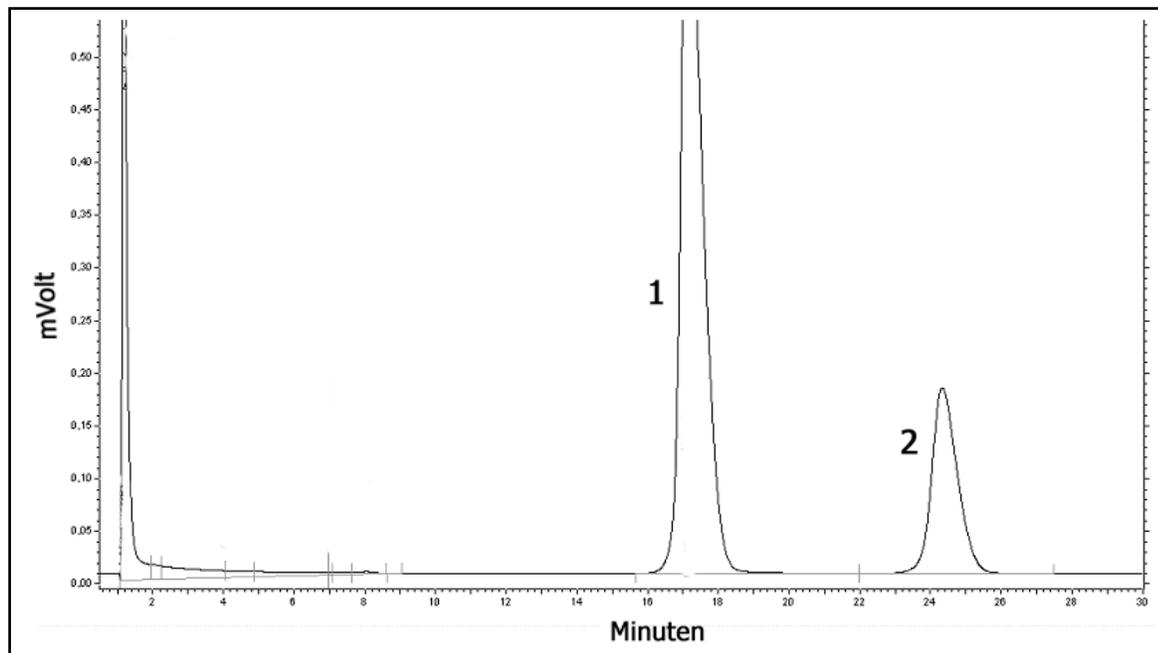
## **2.3 Ergebnisse**

### **2.3.1 Charakterisierung der Enzymquellen**

Der Hämgehalt der verwendeten CYB5B-Proteine lag in einem Bereich von 73,6-87,0 nmol/ml, der Proteingehalt in einem Bereich von 17,9-22,1 mg/ml. Der FAD-Gehalt der verwendeten CYB5R betrug 0,52  $\mu$ mol/ml, der Proteingehalt 18,0 mg/ml. Die Proteingehalte der verwendeten mARC-Fraktionen lagen zwischen 2,4–8,4 mg/ml.

### 2.3.2 HPLC-Chromatogramm

Die Trennung von Guanoxabenz und Guanabenz erfolgte mit der in 2.2.3 beschriebenen HPLC-Analytik. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abbildung 4 dargestellt. Zur Trennung von Substrat und Metabolit war eine Laufzeit von 30 min nötig.



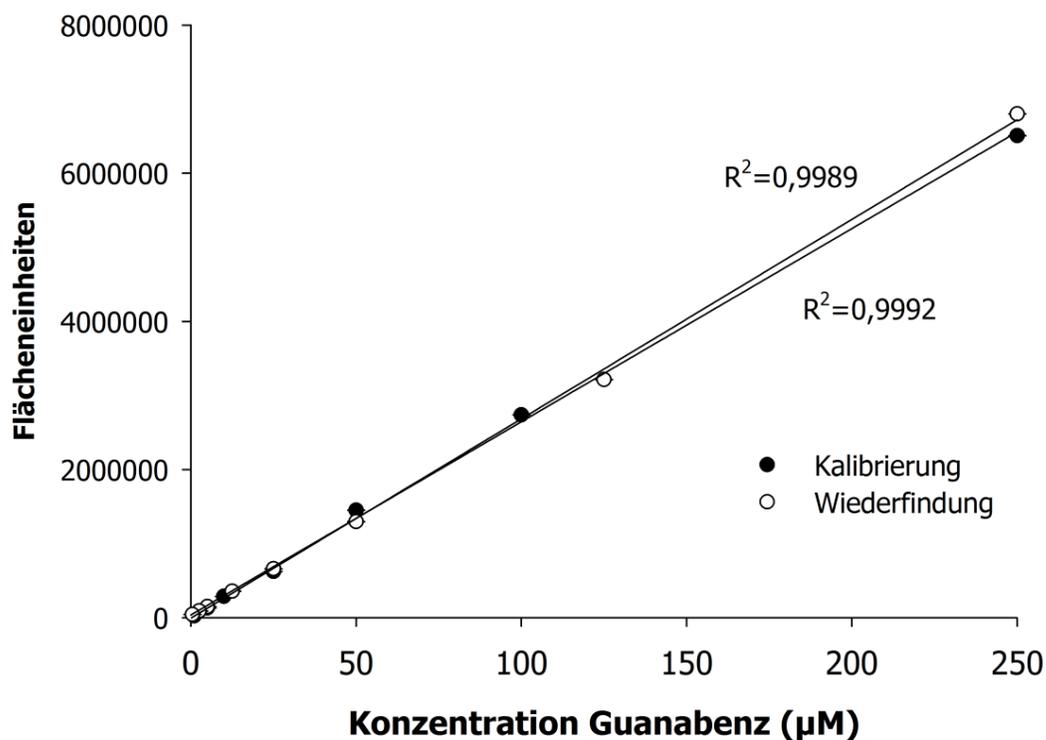
**Abbildung 4. Beispielchromatogramm der Trennung von Guanoxabenz und Guanabenz.**

Zur Trennung wurde eine LiChrospher 60 RP-select-Säule als stationäre Phase sowie 70 % (v/v) 100 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4,0 und 30 % (v/v) Methanol als mobile Phase verwendet. Die Laufzeit der Methode betrug 30 min. **1** = Guanoxabenz, **2** = Guanabenz.

### 2.3.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibriergerade war in einem Konzentrationsbereich von 1-250  $\mu\text{M}$  Guanabenz linear ( $R^2 = 0,9989$ ). Die Richtigkeit im ermittelten Konzentrationsbereich betrug  $102 \pm 6,5 \%$ .

Die mit Hilfe der Kalibrierung bestimmte Wiederfindung betrug im Konzentrationsbereich von 1-250  $\mu\text{M}$  Guanabenz  $109 \pm 14,4 \%$  ( $R^2 = 0,9992$ ). Zur Quantifizierung des Metaboliten wurde daher in den nachfolgenden Untersuchungen die Kalibrierung verwendet (Abbildung 5).



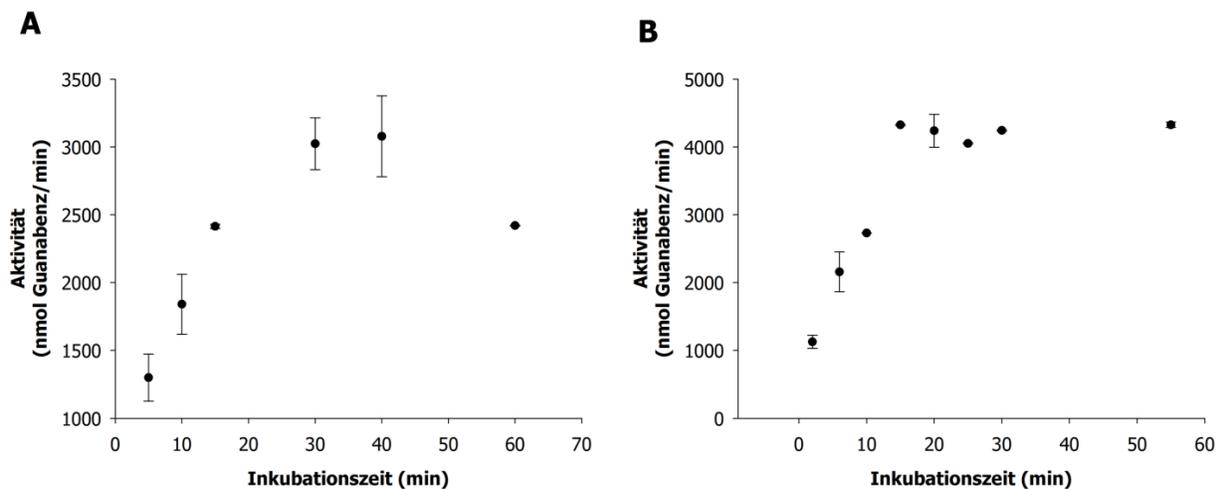
**Abbildung 5. Kalibrierung und Wiederfindung von Guanabenz.**

Die Kalibrierung erfolgte mit der Standardsubstanz in einem Bereich von 1-250  $\mu\text{M}$ . Zur Wiederfindung wurde der Standardinkubationsansatz verwendet und in einem Konzentrationsbereich von 1-250  $\mu\text{M}$  mit Guanabenz versetzt. Als Proteinquelle dienten 0,05 mg durch Hitze inaktivierte Schweinelebermitochondrien. Die ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden.

### 2.3.4 Reduktion von Guanoxabenz durch das humane, rekombinant hergestellte mARC-haltige Enzymsystem

#### 2.3.4.1 Einfluss der Inkubationszeit

Die Zeitabhängigkeit der Reduktion des Substrates Guanoxabenz durch das humane, rekombinant hergestellte Enzymsystem bestehend aus CYB5B, CYB5R und mARC1 bzw. mARC2 wurde untersucht. Für beide mARC-Proteine konnte ein linearer Bereich der Umsetzung über einen Zeitraum von 2-15 Minuten mit  $R^2=0,9997$  für mARC1 und  $R^2=0,9871$  für mARC2 beobachtet werden (Abbildung 6). Daher erfolgten weitere Inkubationen über einen Zeitraum von 12 min.

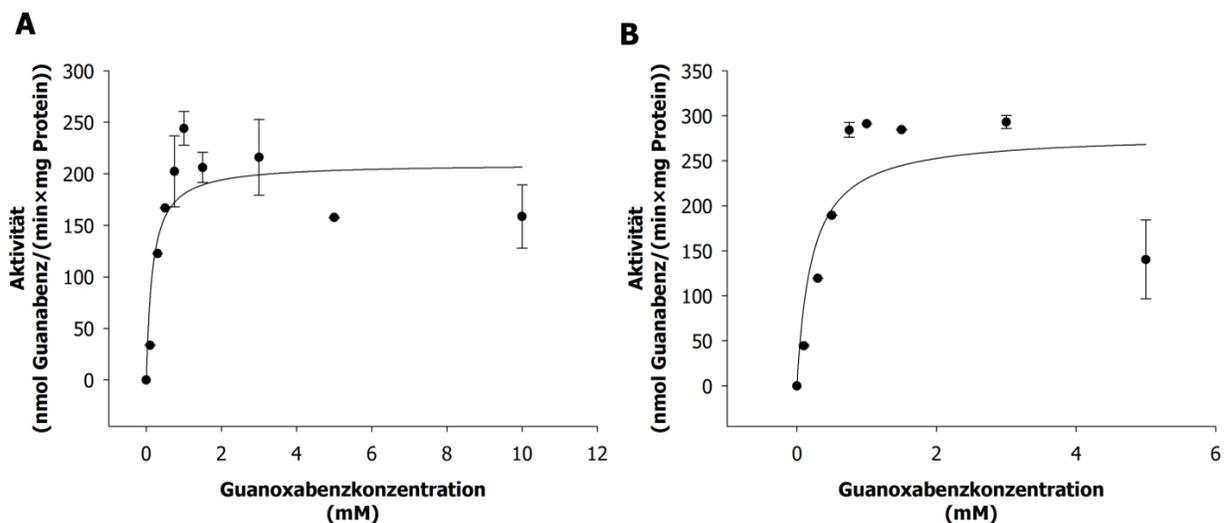


**Abbildung 6. Zeitabhängigkeit der Reduktion von Guanoxabenz durch mARC1 und mARC2.**

10 µg mARC1 (A) bzw. mARC2 (B), CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYB5R in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in MES-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Guanoxabenz und 1 mM NADH für eine variable Zeitdauer inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden.

### 2.3.4.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter

Zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_m$  wurde mit beiden humanen mARC-Proteinen die Substratabhängigkeit der Umsetzung untersucht. Die Katalyse der Reduktion durch beide Enzyme folgte der Michaelis-Menten-Kinetik. Für das *N*-reduktive System mit mARC1 konnte ein  $K_m$ -Wert von  $0,23 \pm 0,09$  mM und ein  $v_{\max}$ -Wert von  $198,3 \pm 16,4$  nmol Guanabenz/(min×mg Protein), für das System mit mARC2 ein  $K_m$  von  $0,25 \pm 0,03$  mM und ein  $v_{\max}$  von  $291,4 \pm 16,6$  nmol Guanabenz/(min×mg Protein) ermittelt werden (Abbildung 7).

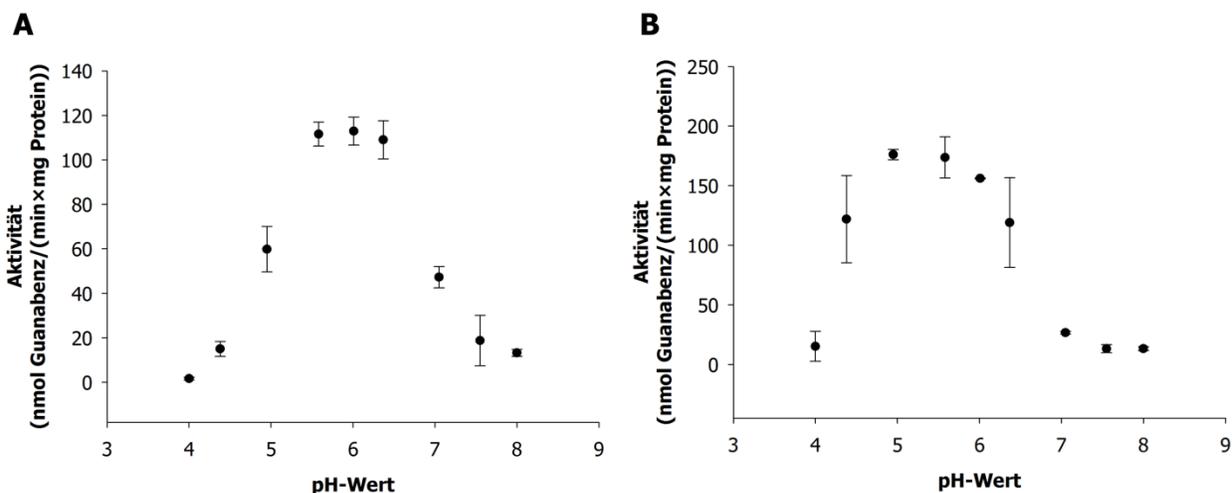


**Abbildung 7. Bestimmung der enzymkinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{\max}$  mit mARC1 und mARC2.**

10  $\mu$ g mARC1 (A) bzw. mARC2 (B), CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYBR in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in MES-Puffer pH 6,0 mit Guanoxabenz im Konzentrationsbereich von 0,1-10 mM und 1 mM NADH für 12 min inkubiert. Nach Abstoppen mit 150  $\mu$ l Methanol wurde die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden.

### 2.3.4.3 Einfluss des pH-Werts

Die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz wurde in einem Mehrkomponentenpuffersystem, bestehend aus 0,05 M MES, 0,1 M Tris-Base und 0,05 M Eisessig, bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Die Ionenstärke des Puffers wurde für die entsprechenden pH-Werte durch Zugabe von NaCl vereinheitlicht. Für beide mARC-Proteine konnte ein Optimum der Reaktionsbedingungen bei pH 6,0 gezeigt werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8. Abhängigkeit der Reduktion von Guanoxabenz durch das mARC-haltige Enzymsystem vom pH-Wert.**

10 µg mARC1 (**A**) oder mARC2 (**B**), CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYB5R in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in einem Mehrkomponentenpuffer bestehend aus 50 mM Eisessig, 50 mM MES und 100 mM Tris-Base und variablem pH-Wert mit 3 mM Guanoxabenz und 1 mM NADH für 12 min inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurde die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden.

#### 2.3.4.4 Charakterisierung der Reduktion

Zur Bestimmung der Umsetzungsraten und zur Charakterisierung der Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch das mARC-haltige Enzymsystem wurden Biotransformationsstudien durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten unter den zuvor ermittelten optimalen Inkubationsbedingungen. Die Umsetzung wurde im gesamten rekonstituierten System bestehend aus mARC, CYB5B und CYB5R sowie durch Austausch der einzelnen Komponenten durch äquivalente Mengen Puffer untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Eine Reduktion konnte ausschließlich in Ansätzen detektiert werden, die alle drei Komponenten des *N*-reduktiven Systems sowie NADH enthielten. Die Aktivitäten von mARC1 und mARC2 waren vergleichbar und liegen in einem Bereich, der der *N*-reduktiven Aktivität der getesteten Enzyme mit Benzamidoxim entspricht (mARC1= 338,4 nmol Benzamidin/(min×mg Protein), mARC2= 253,3 nmol Benzamidin/(min×mg Protein), interne Daten des Arbeitskreises, Standardinkubationsansatz: 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH, 15 min Inkubationsdauer).

**Tabelle 1. Charakterisierung der Reduktion von Guanoxabenz durch das mARC-haltige Enzysystem.<sup>1</sup>**

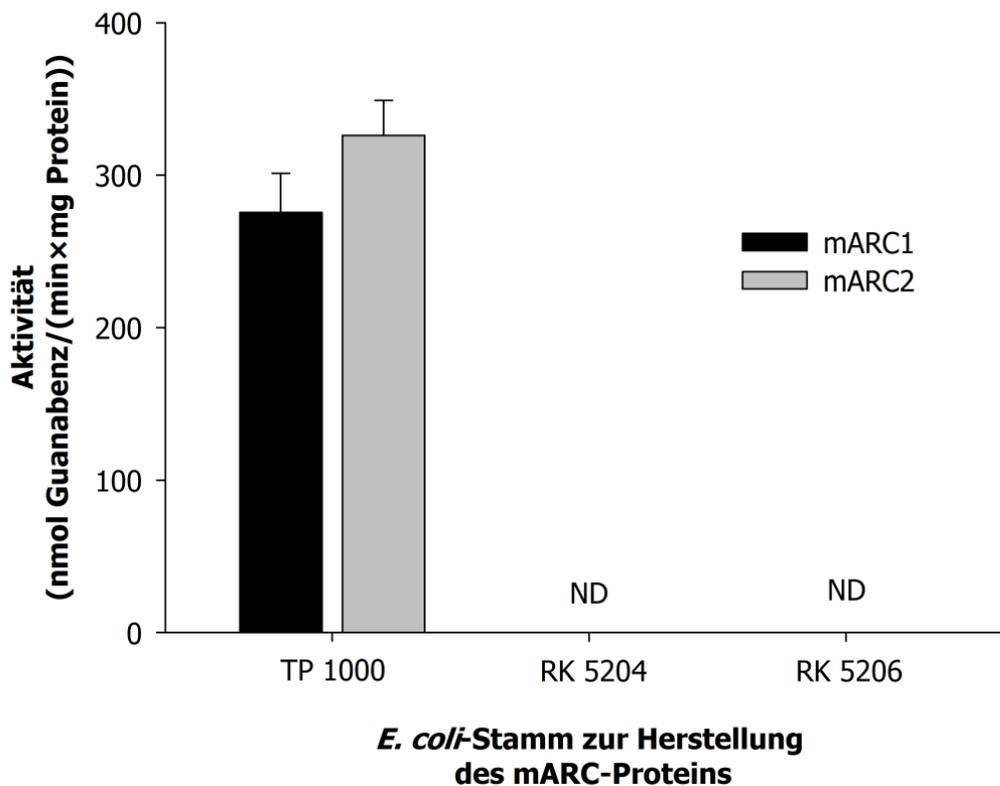
Inkubationsansatz	Umsetzungsrate (nmol Guanabenz/(min×mg Protein))	
	mARC1	mARC2
komplett	260,5 ± 6,2	259,9 ± 34,8
ohne NADH	ND	ND
ohne CYB5B	ND	ND
ohne CYB5R	ND	ND
ohne Protein	ND	ND
ohne Substrat	ND	ND

#### 2.3.4.5 Einfluss des Mocos

Die Reduktion wurde außerdem im *N*-reduktiven System mit beiden mARC-Proteinen, die in den *E. coli*-Stämmen RK5204 und RK5206 hergestellt wurden, im Vergleich mit den üblicherweise verwendeten Proteinen aus dem *E. coli*-Stamm TP1000, untersucht. mARC-Proteine aus dem *E. coli*-Stamm RK5204 enthalten keinen Moco, mARC-Proteine aus dem Stamm RK5206 enthalten die Vorstufe des Mocos, Molybdopterin. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, zeigen nur mARC-Proteine, die aus dem *E. coli*-Stamm TP1000 stammen, eine Aktivität im *N*-reduktiven System. Die Reduktion ist demnach vom Moco abhängig.

---

<sup>1</sup> 10 µg mARC1 oder mARC2, CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYB5R in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in MES-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Guanoxabenz und 1 mM NADH für 12 min inkubiert. In Auslassversuchen wurden einzelne Komponenten durch äquivalente Mengen Puffer ersetzt. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. ND = nicht detektierbar, Detektionslimit = 0,1 nmol Guanabenz/(min×mg Protein).



**Abbildung 9. Abhängigkeit der Reduktion von Guanoxabenz vom Moco im mARC-Protein.**

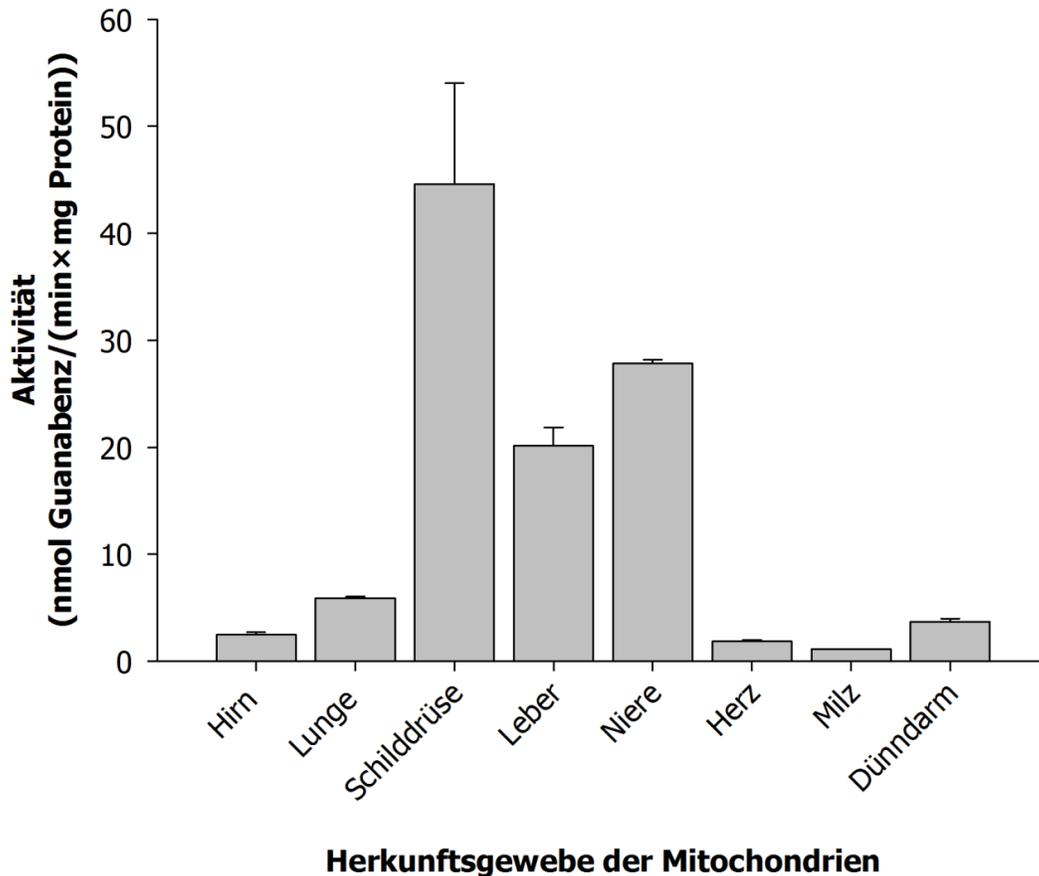
10 µg mARC-Protein der entsprechenden Variante, CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYB5R in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in MES-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Guanoxabenz und 1 mM NADH für 12 min inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. ND = nicht detektierbar, Detektionslimit = 0,1 nmol Guanabenz/(min x mg Protein).

### 2.3.5 Reduktion von Guanoxabenz durch porcine hepatische und extrahepatische Enzymquellen

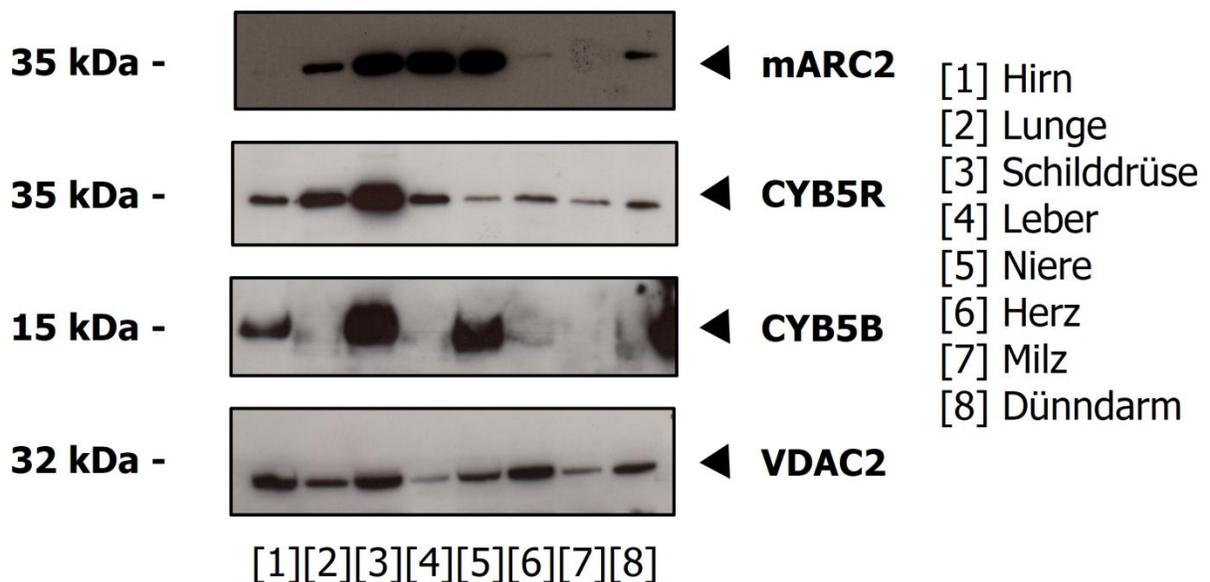
#### 2.3.5.1 Reduktion durch Mitochondrien hepatischer und extrahepatischer Herkunft

Die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz wurde in Mitochondrien verschiedener extrahepatischer Gewebe und der Leber verglichen. Außerdem wurde die Abundanz von

mARC2, CYB5B und CYB5R und dem mitochondrialen Marker VDAC2 in den Mitochondrien per Western Blot-Analyse untersucht. Es konnten hohe Umsetzungsraten in Leber, Schilddrüse und Niere gefunden werden (Abbildung 10). Die Umsetzungsraten korrelieren mit den gefundenen Proteinmengen für mARC2, jedoch nicht mit den Proteinmengen von CYB5B und CYB5R (Abbildung 11).



**Abbildung 10. Reduktion von Guanoxabenz durch Mitochondrien verschiedener porciner Gewebe.** 0,05 mg Protein (0,1 mg im Falle von Dünndarm und Herz) wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 3 mM Guanoxabenz und 1 mM NADH für 15 min inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl eiskaltem Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden.



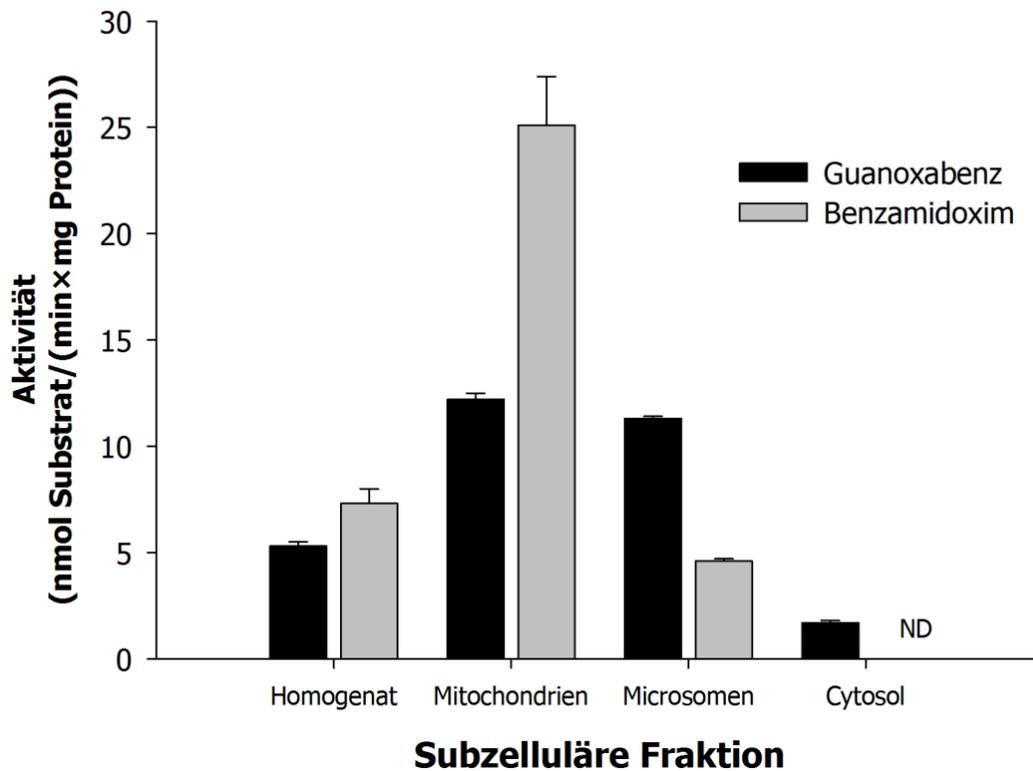
**Abbildung 11. Proteinvorkommen von mARC, CYB5B, CYB5R und VDAC in Mitochondrien verschiedener Organe.**

Zur Trennung per SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot wurden 8 µg Protein je Spur aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-mARC2-Antikörper (Verdünnung 1:1.000), anti-CYB5R-Antikörper (Verdünnung 1:10.000), anti-CYB5B-Antikörper (Verdünnung 1:1.000) und dem sekundären Peroxidase gekoppelten anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) bzw. anti-VDAC-Antikörper (Verdünnung 1:500) und sekundärem Peroxidase-gekoppelten anti-Goat-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000). Mit Hilfe des ECL Detektionsreagenz wurde die Chemilumineszenz detektiert und per Fotofilm dokumentiert. Die Spur des Molekulargewichtsmarkers wurde aus der Abbildung entfernt.

### 2.3.5.2 Reduktion in subzellulären Fraktionen der Leber

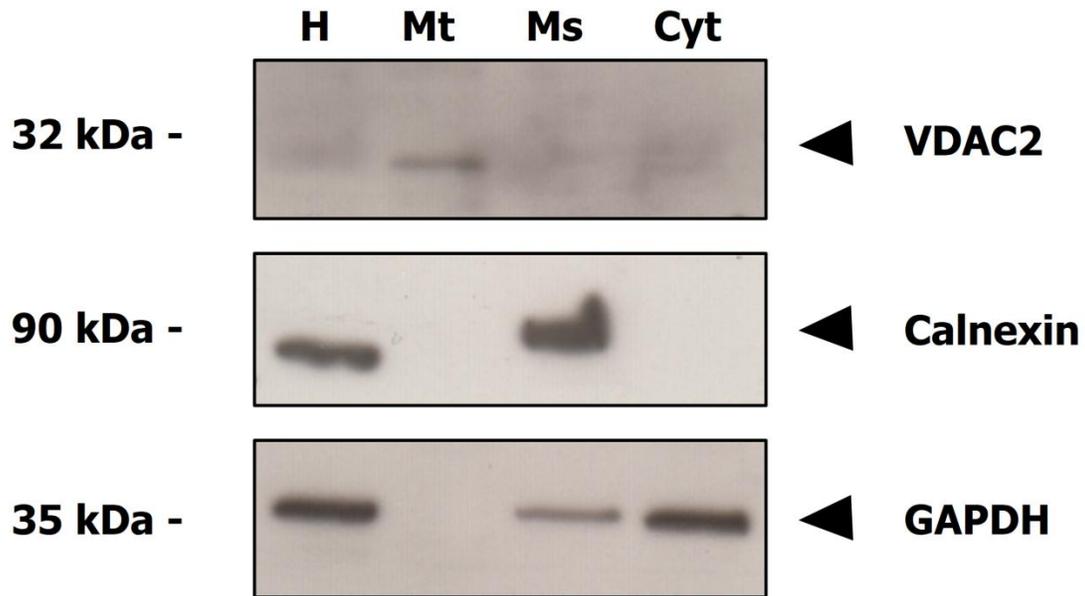
Die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz wurde im Homogenat und in subzellulären Fraktionen der porcinen Leber untersucht. Die Umsetzung erfolgte in allen untersuchten Fraktionen. Anders als für das Modellsubstrat Benzamidoxim bereits beschrieben (Krompholz *et al.*, 2012), konnte eine Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität sowohl in Microsomen als auch in Mitochondrien gefunden werden (Abbildung 12). Eine Charakterisierung der verwendeten subzellulären Fraktionen per Western Blot- Analyse und mit Antikörpern gegen Markerproteine der jeweiligen

Fraktionen zeigt eine Anreicherung des mitochondrialen Markerproteins VDAC2 ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion. Das microsomale Markerprotein Calnexin ist ausschließlich in der microsomalen Fraktion angereichert, in Mitochondrien und Cytosol jedoch nicht nachweisbar. Der cytosolische Marker GAPDH ist sowohl in der microsomalen als auch in der cytosolischen Fraktion nachweisbar (Abbildung 13).



**Abbildung 12. Reduktion von Guanoxabenz durch Homogenat und subzelluläre Fraktionen der porcinen Leber.**

0,05 mg Protein (0,1 mg im Fall von Homogenat) wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 3 mM Guanoxabenz und 1 mM NADH für 15 min inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl eiskaltem Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. ND = nicht detektierbar, Detektionslimit = 0,1 nmol Benzamidin/(min  $\times$  mg Protein).



**Abbildung 13. Western Blot-Analyse von porcinen, hepatischen Subfraktionen.**

Zur Trennung per SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot wurden 12 µg Protein je Spur aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-Calnexin-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) und dem sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) bzw. anti-VDAC-Antikörper (Verdünnung 1:10.000), anti-GAPDH-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) und sekundärem Peroxidase-gekoppelten anti-Goat-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000). Mit Hilfe des ECL Detektionsreagenz wurde die Chemilumineszenz detektiert und per Fotofilm dokumentiert. Die Spur des Molekulargewichtsmarkers wurde aus der Abbildung entfernt. H = Homogenat, Mt = Mitochondrien, Ms = Microsomen, Cyt = Cytosol

## 2.4 Diskussion

Die Reduktion des *N*-Hydroxy-amidinohydrazons Guanoxabenz zu Guanabenz wurde im rekonstituierten, rekombinant hergestellten, humanen *N*-reduktiven System untersucht. Die Biotransformation von Guanoxabenz zu Guanabenz durch beide humanen mARC-Proteine konnte nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Reaktion in porcinen Mitochondrien aus der Leber und aus extrahepatischen Geweben charakterisiert. In diesen sowie in subzellulären Fraktionen der Leber konnte ebenfalls eine Metabolisierung nachgewiesen werden.

Das Substrat Guanoxabenz wird sowohl vom rekonstituierten System mit mARC1 als auch mit mARC2 reduziert. Allerdings sind alle drei Komponenten des *N*-reduktiven Systems zur Reaktion nötig. Außerdem hängt die Reaktion von der Anwesenheit des Moco ab, da mARC-Proteine ohne Moco oder mit der molybdänfreien Vorstufe Molybdopterin keine Aktivität aufweisen. Grünewald beschrieb 2008 eine ca. 20-fach höhere Aktivität von mARC1 für Guanoxabenz im Vergleich zu dem Modellsubstrat Benzamidoxim (Grünewald *et al.*, 2008). Grünewald verwendete allerdings gereinigte porcine, microsomale Proteine für CYB5B und CYB5R. Die gesteigerte Aktivität für Guanoxabenz im Vergleich zu Benzamidoxim konnte mit dem rekonstituierten humanen, rekombinant hergestellten System nicht gezeigt werden. Ein Grund könnte die bessere Funktionsfähigkeit der Proteine nach Rekonstitution mit mitochondrialen Redoxpartnern und somit verbesserte Reduktionsbedingungen für Benzamidoxim sein.

Studien mit extrahepatischen Mitochondrien zeigen eine Reduktion in allen getesteten Geweben mit vergleichsweise hohen Aktivitäten für Leber, Niere und Schilddrüse. Die Verteilung der Aktivitäten entspricht ebenfalls den für das Modellsubstrat Benzamidoxim gefundenen Daten (Krischkowski, Dissertation in Vorbereitung). Die Aktivitäten korrelieren mit dem Vorkommen von mARC2, jedoch nicht mit den Protein-Mengen für CYB5R und CYB5B oder dem mitochondrialen Markerprotein VDAC2. Es kann davon

ausgegangen werden, dass das mARC-haltige Enzymsystem an der Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz in hepatischen und extrahepatischen Mitochondrien beteiligt ist. Geringe Aktivitäten konnten auch in Mitochondrien der Milz gemessen werden, obwohl dort kein mARC2-Protein detektiert werden konnte. Möglicherweise liegt die Proteinmenge für mARC2 unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Reduktion durch andere Komponenten der mitochondrialen Milzfraction wäre ebenfalls denkbar. Dambrova *et al.* (Dambrova *et al.*, 1998) zeigten beispielsweise eine Reduktion von Guanoxabenz durch das Cytosol der Milz der Ratte. Eine Verunreinigung der Mitochondrien mit Cytosol konnte gezeigt werden und eine daraus resultierende Reduktion von Guanoxabenz ist denkbar.

Untersuchungen mit porcinem Leberhomogenat und subzellulären Fraktionen zeigte eine Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität für Guanoxabenz in Mitochondrien und in Microsomen im Vergleich zum Homogenat. Die Aktivität des Cytosols war im Vergleich zu der des Homogenats abgereichert. Western Blot-Analysen mit den verwendeten Subfraktionen und Immunodetektion mit Antikörpern gegen Markerproteine der jeweiligen Fraktionen zeigten zwar eine Verunreinigung der microsomalen Fraktion mit Cytosol, jedoch keine mitochondriale Verunreinigung der Microsomen. Die Subfraktionierung war also grundsätzlich erfolgreich. Die *N*-reduktive Aktivität der verwendeten Fraktionen mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim zeigte lediglich eine Anreicherung der Aktivität in Mitochondrien. Es ist davon auszugehen, dass das mARC-haltige Enzymsystem in der mitochondrialen Fraktion angereichert ist. Die microsomale Reduktion von Guanoxabenz kann nicht durch eine starke Verunreinigung der microsomalen Fraktion mit Mitochondrien erklärt werden, da in diesem Falle auch Benzamidoxim in der microsomalen Fraktion bevorzugt reduziert werden müsste, was nicht der Fall war. Die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz kann auch durch die Xanthinoxidase katalysiert werden (Dambrova *et al.*, 1998). Die Xanthinoxidase ist ein cytosolisches Enzym und die verwendete microsomale Fraktion ist cytosolisch

verunreinigt. Allerdings ist die Reduktion von Guanoxabenz nicht in der cytosolischen Fraktion angereichert, die Aktivität dieser Fraktion ist geringer als die der microsomalen Fraktion. Daher muss an der Reduktion von Guanoxabenz in der microsomalen Fraktion eine weitere, bisher nicht charakterisierte Komponente neben dem mARC-Enzymsystem und der Xanthinoxidase beteiligt sein.

Guanoxabenz erwies sich als Modellsubstrat für Studien des mARC-haltigen Enzymsystems nur als partiell geeignet. Die von Grünwald (Gruenewald *et al.*, 2008) gefundene Überlegenheit der Aktivität gegenüber Benzamidoxim konnte im rekombinant hergestellten, humanen mitochondrialen Enzymsystem nicht nachgewiesen werden. Die Aktivität der Reduktion von Guanoxabenz ist der der Reduktion von Benzamidoxim vergleichbar. Studien mit porcinen Mitochondrien zeigen zwar eine Korrelation von mARC-Abundanz und Reduktion von Guanoxabenz, allerdings ist eine beobachtete Reduktion in der microsomalen Fraktionen bisher nicht charakterisiert. In Untersuchungen mit Geweben und Homogenaten kann folglich nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die Guanoxabenz-Reduktaseaktivität ausschließlich die Aktivität des mARC-haltigen Enzymsystems repräsentiert. Daher wurde in den weiter folgenden Studien von der Verwendung von Guanoxabenz als Modellsubstrat abgesehen und das etablierte Modellsubstrat Benzamidoxim genutzt.

### **2.5 Zusammenfassung**

Guanoxabenz wird durch das mARC-haltige Enzymsystem zu Guanabenz reduziert. Beide mARC-Proteine zeigen eine vergleichbare Aktivität für diese Reaktion. Die von Grünwald (Gruenewald *et al.*, 2008) gefundene Überlegenheit der Umsetzung von Guanoxabenz gegenüber Benzamidoxim konnte für das rekombinant hergestellte humane System nicht gezeigt werden. Studien mit porcinen Mitochondrien zeigen eine Korrelation von mARC2-Vorkommen und Aktivität der Guanoxabenz-Reduktion. Dennoch zeigt die Betrachtung subzellulärer hepatischer Fraktionen eine Anreicherung

der *N*-reduktiven Aktivität sowohl in Microsomen als auch in Mitochondrien und unterscheidet sich somit vom Modellsubstrat Benzamidoxim. Da die microsomale Aktivität nicht durch Verunreinigen mit mitochondrialen Komponenten oder Cytosol erklärt werden kann, ist das verantwortliche Enzymsystem unbekannt. Daher ist Guanoxabenz nicht als Modellsubstrat für Studien über das mARC-haltige Enzymsystem mit Geweben und Homogenaten geeignet, da nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass die betrachtete Reduktion von Guanoxabenz das mARC-Enzymsystem repräsentiert. In nachfolgenden Studien wird daher das schon etablierte Modellsubstrat Benzamidoxim verwendet.

### **3 Untersuchungen zum Zusammenhang von mARC und *Diabetes mellitus***

#### **3.1 Thema und Zielsetzung**

Die endogene Funktion des mARC-Proteins ist derzeit nicht vollständig aufgeklärt, allerdings sind Veränderungen des mARC-haltigen Enzymsystems mit pathophysiologischen Veränderungen im Menschen und in Tiermodellen beschrieben (Malik *et al.*, 2007; Mikula *et al.*, 2010).

Die Gruppe um Dr. Afshan Malik in London fand 2007 eine Veränderung der Expression von mARC2 im Zusammenhang mit *Diabetes mellitus* (Malik *et al.*, 2007). Zum einen konnte eine erhöhte Expression in humanen Nierenzellen beobachtet werden, welche in erhöhten Glukosekonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle kultiviert wurden. Zum anderen konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von mARC2 in den Nieren von diabetischen *Goto-Kakizaki*-Ratten (Modell für Diabetes Typ 2) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Des Weiteren identifizierten Chen *et al.* eine genetische Variation für mARC2, die mit einem gesteigerten Risiko für Diabetes Typ 1 und Typ 2 einhergeht (Chen *et al.*, 2010) Diese Veränderung unter den Bedingungen der pathophysiologischen Veränderungen bei *Diabetes mellitus* könnte ein Hinweis sein, dass die endogene Funktion des mARC-Proteins mit dem Glukose- und/oder Energiestoffwechsel verknüpft ist. Daher sollte diesem möglichen Zusammenhang in *in vitro* Zellkulturstudien und durch Charakterisierung eines diabetischen Tiermodells weiter nachgegangen werden.

Ziel dieser Studien war es zum einen, die Veränderungen des mARC-haltigen Enzymsystems durch Glukose in Zellkulturen auch auf Proteinebene und in Bezug auf die *N*-reduktive Aktivität zu bestätigen. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die

Induktion durch Glukose gegebenenfalls durch den resultierenden oxidativen Stress ausgelöst wird. Zum anderen wurde der Zusammenhang der Veränderung des mARC-haltigen Enzymsystems im diabetischen Mausmodell des Typ 1, induziert durch Streptozocin, auf Protein- und Aktivitätsebene untersucht.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Materialien und Geräte**

Soweit nicht anders beschrieben sind die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 aufgelistet.

### **3.2.2 Kultivierung und Charakterisierung von Zelllinien zur Untersuchung des mARC-haltigen Enzymsystems**

Um den möglichen Einfluss von Glukose und anderen Induktoren auf das mARC-haltige Enzymsystem in verschiedenen Zellkulturen zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zelllinien auf ihre Eignung für solche Studien getestet.

Die in den Arbeiten von Malik *et al.* (Malik *et al.*, 2007) verwendete humane mesangiale Zelllinie (HMCL) konnte von Dr. Afshan Malik in London zur Verfügung gestellt und somit weiter untersucht werden. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine finite Zellkultur, die aus dem Mesangium, einem Gewebe in der Niere, isoliert wurde (Wheeler *et al.*, 1994).

Außerdem wurde die Zelllinien HEK-293 (*human embryonic kidney*) untersucht, die dem humanen embryonalen Nierengewebe entstammt und durch Transformation mit Teilen der DNA des humanen Adenovirus 5 in eine permanente Zelllinie umgewandelt wurde (Herstellerinformation CLS Cell Lines Service GmbH, Eppenheim). Die Zelllinie war bereits im Arbeitskreis vorhanden, wurde aber ursprünglich über die CLS Cell Lines Service GmbH (Eppenheim) bezogen.

RC-124 ist eine nicht permanente Zelllinie, die aber in Kultur gehalten werden kann und ebenfalls untersucht wurde. Sie entstammt dem gesunden Nierengewebe eines an einem Nierenkarzinom erkrankten 63 Jahren alten, männlichen Kaukasiers

(Herstellerinformation CLS Cell Lines Service GmbH, Eppenheim). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Tamara Straube aus dem Arbeitskreis Jacob, Marburg zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien wurden in Hinblick auf ihre Kultivierbarkeit, das Vorkommen von mARC1 und mARC2 sowie die Handhabung im *N*-Reduktionsassay untersucht.

### 3.2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden steril kultiviert. Medienwechsel, Passagieren oder sonstige Arbeiten an den offenen Zellkulturen wurden unter der Laminar Air Flow Werkbank (Klasse 2) unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Alle Zelllinien konnten auch abweichend der Herstellerangaben in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1,0 g/l Glukose, 862,0 mg/l L-Alanyl-L-glutamin (stabiles Glutamin), 110,0 mg/ml Natriumpyruvat, 15,0 mg/ml Phenolrot und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert werden. Für die Kultivierung von HMCL wurde DMEM ohne stabiles Glutamin aber mit Zusatz von 20 mM Glutamin sowie 5 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,5 µg/ml Amphotericin B (Fungizone<sup>®</sup>), 20 mM HEPES und 0,2 % Insulin-Transferrin-Selenium-A-Supplement 100 x (entspricht 1,34 µg/ml Natriumselenit, 22 mg/l Natriumpyruvat, 2 mg/l Insulin und 1,1 mg/l Transferrin) verwendet.

Die Zellen wurden dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Kultivierung wurden Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen Zellen dem Stickstofftank entnommen und im 37 °C warmen Wasserbad zügig aufgetaut. Die Zellsuspension wurden dann in 5 ml steriles Kulturmedium gegeben und für 3 min bei 1400 *g* (800 *g* im Falle von RC-124) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Kulturmedium suspendiert, um Rückstände von DMSO aus dem Kryomedium zu entfernen, und in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 20 ml Medium überführt. Die so erhaltenen Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter Wasserzusatz im Inkubator kultiviert.

Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Kulturen passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 5 ml Dulbecco's PBS-Puffer (DPBS) ohne Magnesium und Calcium (37 °C) gewaschen. Nach Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,25 g/l Trypsin und 0,38 g/l EDTA x 4 Na in DPBS) für drei Minuten bei 37 °C wurde die entstehende Zellsuspension mit 10 ml Kulturmedium aufgenommen und für drei Minuten bei 1400 *g* (800 *g* im Falle von RC-124) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert, um Rückstände des Trypsins zu entfernen. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2-1:8 auf neue 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen aufgeteilt und erneut im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden für drei bis fünf Passagen in Kultur gehalten.

### 3.2.2.1.1 Einfrieren der Zelllinien

Um Zellen für zukünftige Experimente zur Verfügung zu haben, wurden die Zellen wie in 3.2.2.1 beschrieben kultiviert und nach zwei Passagen in fünf bis acht Zellkulturflaschen expandiert. Bei Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen wie in 3.2.2.1 für das Passagieren beschrieben abgelöst und die erhaltenen Suspensionen gepoolt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und in Kryomedium bestehend aus Zellkulturmedium mit 10 % DMSO resuspendiert, so dass eine Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml erreicht wurde. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämocytometers mikroskopisch bestimmt. Kryoröhrchen wurden mit 1 ml Suspension befüllt, und sofort mit Hilfe einer Einfrierhilfe, die eine Temperaturreduktion von 1 °C pro Minute ermöglicht, bei -20 °C eingefroren. Nach 24 h wurde die Einfrierhilfe mit den Kryoröhrchen in -80 °C überführt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff zur Dauerlagerung eingebracht.

### 3.2.2.2 Aussaat der Zellen

Um die *N*-reduktive Aktivität der Zelllinien bestimmen zu können, wurden die Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Hierzu wurden die Zellen wie unter 3.2.2.1

beschrieben mit DPBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch Verdünnen auf einen Zellgehalt von 50.000 Zellen/ml eingestellt und mit 1 ml pro Well (2 ml im Falle von HEK-293) in die Zellkulturplatten ausgesät. Die Platten wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für zwei bis vier Tage kultiviert.

### 3.2.2.3 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität der Zellen

Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte unter nicht sterilen Bedingungen. Hierzu wurden die Zellen mit substratfreiem Inkubationspuffer (Zusammensetzung s.u.) von 37 °C zweimal gewaschen und anschließend in 1 ml desselben Puffers für 10 min bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 rpm in einem Tischinkubator (Shaker DTS-4, Elmi Ltd., Riga, Lettland) vorinkubiert. Nachfolgend wurde der Puffer entfernt und durch 5 mM Benzamidoxim-haltigen Inkubationspuffer ersetzt, es folgte die Inkubation für 120 min bei 100 rpm und 37 °C. Anschließend wurde der Inkubationspuffer entnommen und bis zur weiteren Vermessung per HPLC-Analytik bei -20 °C eingefroren.

#### **Inkubationspuffer**

50 ml HBSS 10 x mit 0,11 g/l Phenolrot

1,19 g HEPES

175 mg NaHCO<sub>3</sub>

*ad* 500 ml *Aqua bidest.*, pH 7,4

#### 3.2.2.3.1 Bestimmung der Substratabhängigkeit

Um die Substratabhängigkeit der *N*-reduktiven Aktivität der Zelllinien zu prüfen und die enzymkinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_m$  bestimmen zu können, wurden abweichend von der in 3.2.2.3 beschriebenen Methode Inkubationen mit Benzamidoxim-Konzentrationen im Bereich von 0,25–10 mM Benzamidoxim durchgeführt.

### 3.2.2.3.2 Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Um die Zeitabhängigkeit der *N*-reduktiven Aktivität der Zelllinien zu prüfen, wurden abweichend von der in 3.2.2.3 beschriebenen Methode Inkubationen variabler Zeitdauer von 20-180 min durchgeführt.

### 3.2.2.4 Ernte und Lyse der Zellen

Die Zellen wurden zur weiteren Verwendung geerntet. Hierzu wurden 500 µl eiskalter DPBS-Puffer zugegeben und der Zellrasen mit Hilfe eines Zellkulturschabers aus Gummi abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt und das Well der Zellkulturplatte noch zwei weitere Male mit 500 µl DPBs gespült. Die so erhaltenen Suspensionen wurden ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 4000 *g* und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das resultierende Zellpellet wurde in 100 µl eiskaltem Lysispuffer (Zusammensetzung s.u.) resuspendiert und bei 4 °C unter Schütteln für 1 h lysiert. Die so erhaltenen Lysate wurden zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Der Proteingehalt der Lysate wurde wie in 2.2.2.3 mittels BCA-Assay bestimmt. Hierzu wurden die Lysate zuvor bei 22000 *g* für 5 min zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer abzutrennen. Um Störungen durch Pufferbestandteile zu berücksichtigen, wurde der Lysispuffer im BCA-Assay parallel vermessen und die gemessenen Werte um den Wert des Puffers korrigiert.

#### **Lysispuffer**

150 mM NaCl

1 % (v/v) NP-40

50 mM Tris

1 Tablette cOmplete ULTRA mini<sup>®</sup>

ad 50 ml *Aqua bidest.*, pH 8,0

### 3.2.2.5 HPLC-Analytik zur Trennung und Quantifizierung von Benzamidoxim und Benzamidin

Zur Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin wurden die Inkubationsüberstände für 5 min bei 22000 *g* zentrifugiert und die so von Zellresten befreiten und die Überstände wie folgt vermessen:

Pumpe	Waters™ 600E Controller and Pump
Detektor	Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector
Autosampler	Waters™ 717 plus Autosampler
Software zur Integration	EZChrome Elite Software, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Roman, USA)
Stationäre Phase	Phenomenex® Gemini-NX (5 µM), C18 150,0 x 4,6 mm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg) Vorsäule: Phenomenex LiChrospher 60 RP-select B (5 µm), 4,0 x 3,0 (Phenomenex Inc., Aschaffenburg)
Mobile Phase	90 % 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 7,0 (v/v) 10 % Methanol (v/v)
Flussrate	1 ml/min
Laufzeit	15 min
Detektion	UV, 229 nm
Injektionsvolumen	20 µl
Retentionszeiten	Benzamidin: 5,2 ± 0,1 min; Benzamidoxim: 12,0 ± 0,2 min

### 3.2.2.6 Western Blot-Analyse

Die Zelllysate wurden wie in 2.2.6 und 2.2.7 beschrieben mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Hierzu wurden die Lysate vor dem Beladen des Gels mit *Aqua bidest.* auf

einen einheitlichen Proteingehalt verdünnt, drei Teile Proteinlösung mit einem Teil 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert. Je Spur wurde das Lysat eines Zellkulturwells aufgetragen. Zur Detektion des Western Blots kamen anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1000 sowie der anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:500 zum Einsatz. Zur Detektion der Ladekontrolle wurde anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5000 verwendet. Als sekundärer Antikörper fungierte der Peroxidase-gekoppelte anti-Rabbit-IgG-Antikörper.

### **3.2.3 Induktionsstudien mit Zelllinien**

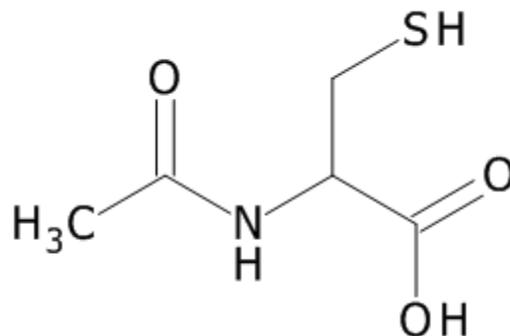
Aufgrund der vorangegangenen Charakterisierung der Zelllinien (Ergebnisse unter 3.3.1) wurden die Induktionsstudien mit HMCL und HEK-293 durchgeführt.

#### **3.2.3.1 Induktion mit Glukose**

Um den Einfluss von Glukose im Kulturmedium auf die Zelllinien zu überprüfen, wurden HMCL und HEK-293 in Kulturmedien mit verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert. Hierzu wurden die Zellen wie in 3.2.2.1 kultiviert und wie in 3.2.2.2 beschrieben in Zellkulturplatten ausgesät, allerdings erfolgte die Aussaat in 6-Well-Zellkulturplatten mit 100.000 Zellen/Well. Die Aussaat erfolgte in DMEM (1,0 g/l Glukose) mit 10 % FCS. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen durch Serumentzug synchronisiert. Hierzu wurde das Kulturmedium durch DMEM (1,0 g/l Glukose) mit 0,5 % FCS ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Synchronisationsmedium durch Induktionsmedien, die aus DMEM mit 0,0 g/l, 1,0 g/l oder 4,5 g/l Glukose und 10 % FCS bestanden, ersetzt. Nach zwei Tagen wurden die Medien erneuert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen wie in 3.2.2.3 beschrieben inkubiert, um die *N*-reduktive Aktivität für das Modellsubstrat Benzamidoxim zu bestimmen. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, lysiert (3.2.2.4) und wie in 3.2.2.6 beschrieben per Western Blot analysiert.

### 3.2.3.2 Glukose-Rescue Experimente

Um zu untersuchen, ob eine mögliche Induktion durch Glukose direkt über die Glukose als solche oder über den durch Glukose induzierten oxidativen Stress erfolgt, wurden Induktionsstudien mit Zusatz des Antioxidans *N*-Acetylcystein (NAC) (Abbildung 14) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie in 3.2.2.1 kultiviert und wie in 3.2.2.2 beschrieben in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Aussaat erfolgte in DMEM (1,0 g/l Glukose) mit 10 % FCS. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen durch Serumentzug synchronisiert. Hierzu wurde das Kulturmedium durch DMEM (1,0 g/l Glukose) mit 0,5 % FCS ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Synchronisationsmedium durch Induktionsmedien ersetzt, die entweder aus DMEM mit entweder 1,0 g/l oder 4,5 g/l Glukose und 10 % FCS oder DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS und 1,25-10 mM NAC bestanden, ersetzt. Nach zwei Tagen wurden die Medien erneuert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen wie in 3.2.2.3 beschrieben inkubiert, um die *N*-reduktive Aktivität gegenüber dem Modellsubstrat Benzamidoxim zu bestimmen. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, lysiert (3.2.2.4) und wie in 3.2.2.6 beschrieben per Western Blot analysiert.



**Abbildung 14. Strukturformel von *N*-Acetylcystein.**

*N*-Acetylcystein wirkt als Antioxidanz, da es den GSH-Pool erhöht.

#### 3.2.3.2.1 Einfluss von NAC auf das *N*-reduktive System *in vitro*

Um zu überprüfen, ob die *N*-reduktive Aktivität durch den in 3.2.3.2 verwendeten Zusatz NAC beeinflusst wird, wurden *in vitro* Biotransformationsstudien mit Schweinelebermitochondrien und rekombinant hergestellten Proteinen für mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Proteinquellen nach der in 2.2.5 beschriebenen Methode inkubiert. Abweichend von der dort beschriebenen Methode wurde das Modellsubstrat Benzamidoxim verwendet, außerdem wurden kein oder 1,25–10 mM NAC zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 min. Die resultierenden Ansätze wurden nach der bei Clement *et al.* (Clement *et al.*, 2005) beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

#### 3.2.3.3 Induktion mit Menadion

Um zu prüfen, ob das mARC-haltige Enzymsystem durch erhöhten oxidativen Stress induzierbar ist, wurden HMCL und HEK-293 in Medien mit Menadion-Zusatz kultiviert. Menadion wird in den Zellen zu einem instabilen Semichinon metabolisiert, welches *in situ* Superoxidanionen produziert. Somit wird dauerhaft ein Milieu des oxidativen Stresses geschaffen (Criddle *et al.*, 2006). Hierzu wurden die Zellen wie in 3.2.2.1 herangezogen und wie in 3.2.2.2 beschrieben in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Aussaat erfolgte in DMEM (1,0 g/l Glukose) mit 10 % FCS. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen durch Serumentzug synchronisiert. Hierzu wurde das Kulturmedium durch DMEM (1,0 g/l Glukose) mit 0,5 % FCS ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Synchronisationsmedium durch die Menadion-haltigen Induktionsmedien ersetzt, die aus DMEM mit 1,0 g/l und 10 % FCS bestanden und 0  $\mu$ M, 2  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M Menadion enthielten. Vorversuche hatten ergeben, dass höhere Konzentrationen an Menadion zum Absterben der Zellkulturen führen (Daten nicht gezeigt). Nach zwei Tagen wurden die Medien erneuert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen wie in 3.2.2.3 beschrieben

inkubiert, um die *N*-reduktive Aktivität gegenüber dem Modellsubstrat Benzamidoxim zu bestimmen. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, lysiert (3.2.2.4) und wie in 3.2.2.6. beschrieben per Western Blot analysiert.

#### 3.2.3.3.1 Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Catalase auf das *N*-reduktive System *in vitro*

Um den Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. des Enzyms Catalase auf das *N*-reduktive System zu untersuchen, wurden Biotransformationsstudien mit dem rekonstituierten, rekombinant hergestellten Enzymsystem durchgeführt. Biotransformationsansätze mit 10 µg mARC1 oder mARC2, CYB5B in einer Menge, die 76 pmol Häm entspricht, so wie CYB5R in einer 7,6 pmol FAD entsprechenden Menge wurden in 20 mM MES-Puffer (pH 6,0) mit 3 mM Benzamidoxim und 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15 min vorinkubiert. Nach Zusatz von 10 U Catalase wurde erneut für zwei Minuten vorinkubiert, im Anschluss wurde die Reaktion mit 1 mM NADH gestartet. Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurden die Ansätze durch Zusatz von 150 µl eiskaltem Methanol gestoppt, aufgearbeitet und wie bei Clement *et al.* (Clement *et al.*, 2005) vermessen. Als Kontrolle dienten Ansätze, bei welchen je eine Komponente durch äquivalente Mengen Puffer ersetzt wurde.

### **3.2.4 Das Mausmodell für Diabetes Typ 1 induziert durch Streptozocin-Injektion**

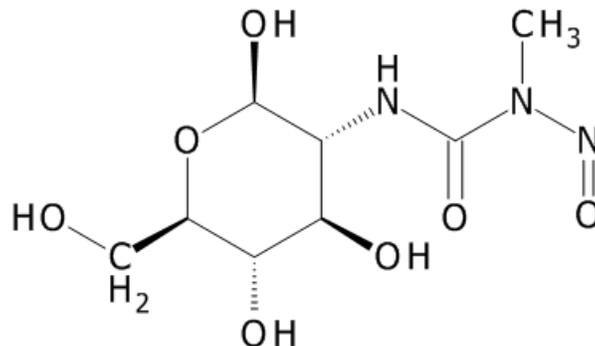
#### 3.2.4.1 Haltung und Behandlung der Tiere

Die verwendeten Gewebeproben aus Lebern und Nieren der Mäuse des diabetischen Mausmodells des Typ 1 wurden freundlicherweise von Dr. Afshan Malik und Dr. Aileen King, King's College, London zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um ein Mausmodell, bei welchem durch die Injektion von Streptozocin Diabetes des Typ 1 induziert wird. Streptozocin (Abbildung 15) ist ein strukturelles Analogon zur Glukose und tritt über den GLUT2-Transporter in die β-Zellen des Pankreas

ein, die als Folge in einer selektiven Nekrose untergehen. Die so behandelten Tiere zeigen neben dem ausgelösten Diabetes außerdem einen Hang zu Fettlebern, Entzündungen, sowie verminderte ventrikuläre Kontraktilität und Funktion (Panchal *et al.*, 2011).

Die in dieser Studie untersuchten Tiere umfassten drei Gruppen: Kontrolltiere (*c*-Mäuse für *control*), Diabetes-Tiere (*d*-Mäuse für *diabetes*) und Tiere, bei denen zwar ein Diabetes durch Streptozocin-Injektion ausgelöst, jedoch durch die Transplantation von Inselzellen anderer Mäuse geheilt wurde (*cd*-Mäuse, *cured diabetes*). Das Mausmodell mit den beschriebenen drei Gruppen wird in seiner Gesamtheit im Folgenden als STZ-Mausmodell bezeichnet.



**Abbildung 15. Strukturformel Streptozocin, strukturelles Analogon zur Glukose.**

Die Substanz wird über den GLUT2-Transporter in die  $\beta$ -Zellen des Pankreas aufgenommen und löst dort eine selektive Nekrose der  $\beta$ -Zellen aus. Die Folge ist Diabetes Typ 1.

#### 3.2.4.1.1 *c*-Mäuse

Zur Kontrolle dienten den *d*- und *cd*-Mäusen altersgleiche C57/BL6-Mäuse.

#### 3.2.4.1.2 *d*-Mäuse

Acht Wochen alte, männliche C57/BL6-Mäuse wurden durch Injektion von 180 mg/kg Streptozocin (Sigma-Aldrich, Steinheim) behandelt und so ein Diabetes des Typ 1 ausgelöst. Nach insgesamt 31 Tagen wurden die Tiere getötet, Lebern und Nieren entnommen und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

#### 3.2.4.1.3 *cd*-Mäuse

Der durch Streptozocin induzierte Diabetes Typ 1 wurde in der Gruppe der *cd*-Mäuse durch Inselzelltransplantation behandelt. Hierzu wurden die Inselzellen von männlichen 8-10 Wochen alten C57/BL6 Mäusen, wie bei King *et al.* (King *et al.*, 2007) beschrieben, mit Hilfe von Kollagenase-Verdau und nachfolgender Gradientenreinigung aufgearbeitet und den Mäusen fünf Tage nach der Streptozocin-Injektion unterhalb der linken Niere transplantiert. Nach insgesamt 31 Tagen wurden die Tiere getötet, Lebern und Nieren entnommen und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

#### 3.2.4.2 Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Vor der Tötung der Mäuse wurde die Blutglukosekonzentration mit Hilfe des Accu-Check Glucose Meters (Roche, Rotkreuz, Schweiz) bestimmt.

#### 3.2.4.3 Aufarbeitung der Leber- und Nierengewebeproben

Leber- und Nierengewebeproben wurden aufgetaut, stets auf Eis gelagert und fein gehackt. Im Anschluss wurde das Gewebe in 100-500 µl eisgekühltem TPWL-Puffer mit Hilfe eines Potter S Homogenisators (Satorius, Göttingen) homogenisiert. Die Homogenate wurden bei -80 °C eingefroren. Der Proteingehalt der Homogenate wurde wie in 2.2.2.3 beschrieben mit der BCA Methode bestimmt.

### **TPWL-Puffer**

85,6 g Saccharose

0,37 g EDTA

1,74 g Kaliumdihydrogenphosphat

0,15 g DTT

*Ad* 1000 ml *Aqua bidest.*, pH 7,4

#### 3.2.4.4 Extraktion der mRNA und Bestimmung der Expression von mARC2 mittels qRT-PCR

Die Extraktion und Quantifizierung der mRNA für mARC2 mittels quantitativer *reverse Transkriptase* PCR (qRT-PCR) wurde von Saman Mirazei im Arbeitskreis von Dr. Afshan Malik in London durchgeführt.

Die hierzu verwendeten Primer finden sich in Tabelle 2 und wurden bei Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Zur Isolierung der RNA aus Leber- und Nierengewebe wurde das QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach erfolgter cDNA-Synthese mittels High Capacity RNA-to-cDNA Kit<sup>TM</sup> (Life Technologies, Carlsbad, USA) wurden die Proben mittels Roche LightCycler<sup>®</sup> (Roche, Rotkreuz, Schweiz) und dem FastStart DNA Master plus SYBR Green 1 Kit (Roche, Rotkreuz, Schweiz) in 40 Zyklen vermessen, die aus 10 min Vorinkubation bei 95 °C, 10 s bei 95 °C, 20 s bei 60 °C und 10 s bei 72 °C bestanden, und mit Hilfe von Standardkurven für die jeweiligen Gene ( $10^2$ - $10^9$  Kopien/ $\mu$ l) quantifiziert. Zur Auswertung wurde die Roche Molecular Biochemical Lightcycler Software der Version 3.5 (Roche, Rotkreuz, Schweiz) verwendet. Die Expression von mARC2 wurde für je drei Versuchstiere je Gruppe (*c*-, *d*-, *cd*-Mäuse) bestimmt. Es wurden je Probe drei Replikate vermessen und auf die Expression des murinen GAPDH bezogen.

Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test herangezogen,  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

**Tabelle 2: Für die qRT-PCR eingesetzte Primer.**

<b>Spezies</b>	<b>Gen</b>	<b>vorwärts (5'→3')</b>	<b>rückwärts (5'→3')</b>
Maus	<i>mARC2</i>	GGATCCCATGGCTGACAC	GGAAGATGGCCATGAGGA
Maus	<i>GAPDH</i>	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	GCCATCAACGACCCCTTCA

#### 3.2.4.5 Western Blot-Analyse

Die Trennung der Gewebshomogenate erfolgte mit den in 2.2.6 und 2.2.7 beschriebenen Methoden. Abweichend wurden 12 µg Protein je Spur geladen, die Detektion erfolgte mit anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:2.500 sowie anti-Calnexin-Antikörper in der Verdünnung 1:10.000 als Ladekontrolle. Als sekundärer Antikörper diente Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper in der Verdünnung 1:10.000.

#### 3.2.4.6 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität

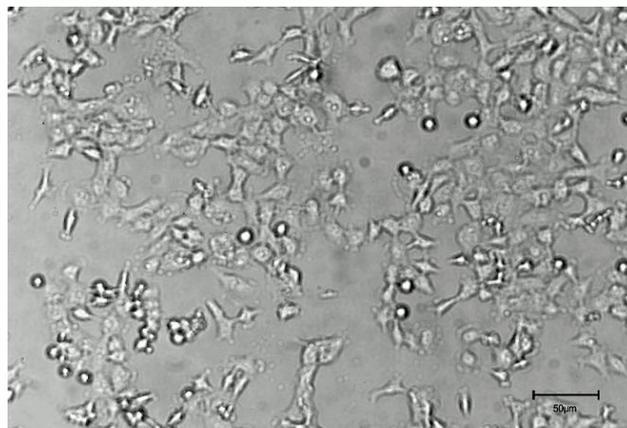
Zur Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem wurde die Umsetzung des Modellsubstrates Benzamidoxim zu Benzamidin untersucht. Hierzu wurden 0,05 mg Leber- oder Nierenhomogenat unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Ansatzvolumen von 150 µl in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0) mit 3 mM Benzamidoxim. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Das Abstoppen erfolgte nach 20 min im Falle der Leberhomogenate und nach 50 min im Falle der Nierenhomogenate durch Zugabe von 150 µl eisgekühltem Methanol. Nach fünfminütigem Schütteln bei

Raumtemperatur wurden die Ansätze fünf Minuten bei 22.000 *g* zentrifugiert und die Überstände mit der von Clement *et al.* (Clement *et al.*, 2005) beschriebenen Analytik vermessen. Um die optimalen Inkubationsbedingungen für die verwendeten Proteinquelle zu ermitteln, wurden zuvor abweichend von der oben beschriebenen Methode Inkubationen mit variabler Zeitdauer (5-60 min) oder variabler Substrat- oder NADH-Konzentration (0,1-5 mM) durchgeführt, aus denen die oben angegebenen Inkubationsbedingungen resultierten. Für beide Proteinquellen folgte die Reaktion der Michalis-Menten-Kinetik und hatte bei einer Substratkonzentration von 3 mM Benzamidoxim den gesättigten Bereich erreicht. Die Reaktion verlief über einen Zeitraum von 60 min für beide Proteinquellen linear. Da die Aktivität der Nierengewebshomogenate geringer war, wurde eine verlängerte Inkubationszeit von 50 min (vs. 20 min für Lebergewebshomogenate) gewählt, um gut quantifizierbare Metabolitenkonzentrationen zu erreichen. Eine statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, USA), der t-Test wurde zur Prüfung auf statistische Signifikanz angewendet, p-Werte < 0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

### 3.3 Ergebnisse

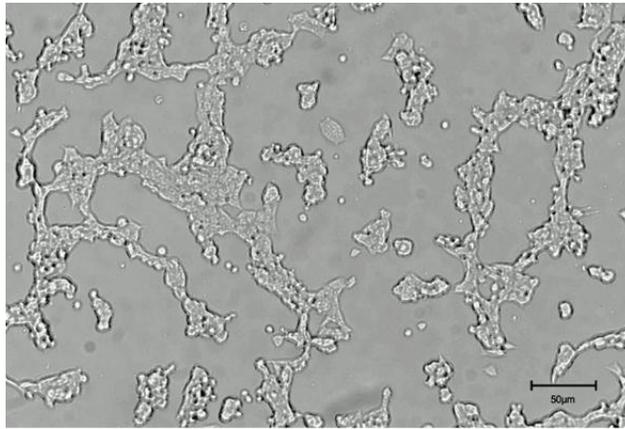
#### 3.3.1 Charakterisierung von Zelllinien für die Eignung von Studien zum mARC-haltigen Enzymsystem

Um Induktionsstudien für das mARC-Protein durchführen zu können, wurden verschiedene Nierenzelllinien auf ihre Eignung für solche Studien untersucht. Es wurde die Kultivierbarkeit, das Vorkommen von mARC1 und mARC2 sowie die *N*-reduktive Aktivität bestimmt. Alle drei Zelllinien ließen sich gut kultivieren (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18), die Zelllinie RC-124 wies allerdings eine langsame Wachstumsgeschwindigkeit auf.



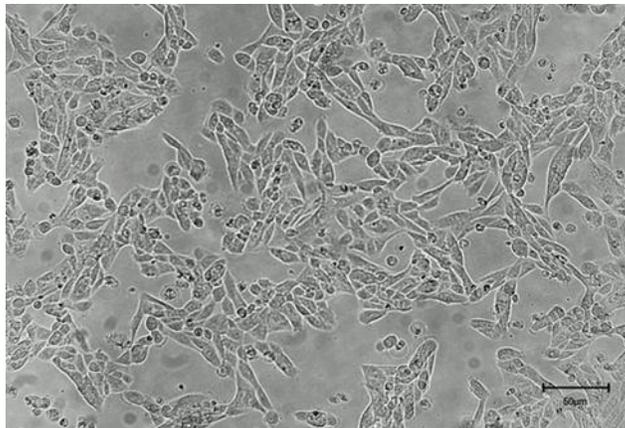
**Abbildung 16. HMCL in Kultur.**

Mikroskopiert mit einem Olympus Inversmikroskop CK2 in 125-facher Vergrößerung, aufgenommen mit der digitalen Spiegelreflexkamera Nikon D80.



**Abbildung 17. HEK-293 in Kultur.**

Mikroskopiert mit einem Olympus Inversmikroskop CK2 in 125-facher Vergrößerung, aufgenommen mit der digitalen Spiegelreflexkamera Nikon D80.



**Abbildung 18. RC-124 in Kultur.**

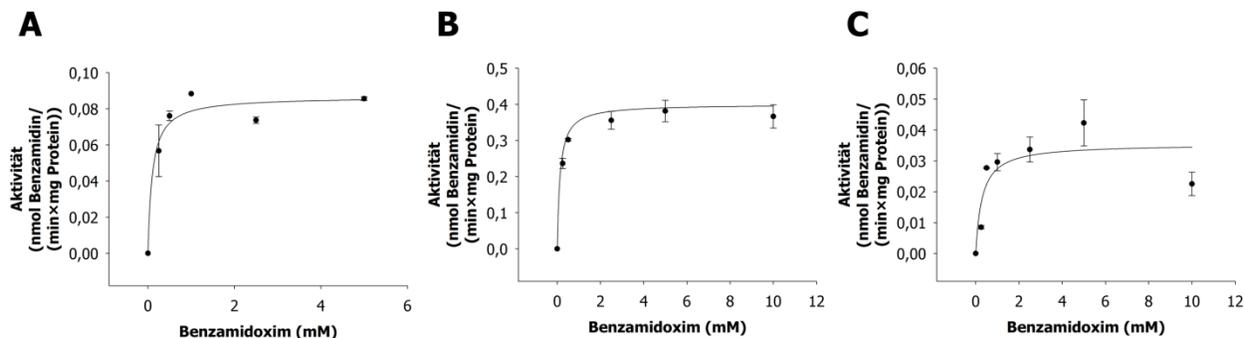
Mikroskopiert mit einem Olympus Inversmikroskop CK2 in 125-facher Vergrößerung, aufgenommen mit der digitalen Spiegelreflexkamera Nikon D80.

#### 3.3.1.1.1 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität und der enzymkinetischen Parameter

$v_{\max}$  und  $K_m$

Die *N*-reduktive Aktivität der Zelllinien gegenüber dem Modellsubstrat Benzamidoxim wurde untersucht. Für alle Zelllinien folgt die *N*-reduktive Aktivität der

Michaelis-Menten-Kinetik und hatte ab einer Substratkonzentration von 2,5 mM Benzamidoxim den gesättigten Substratbereich erlangt (Tabelle 3, Abbildung 19).



**Abbildung 19. Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim durch verschiedene Zelllinien.**

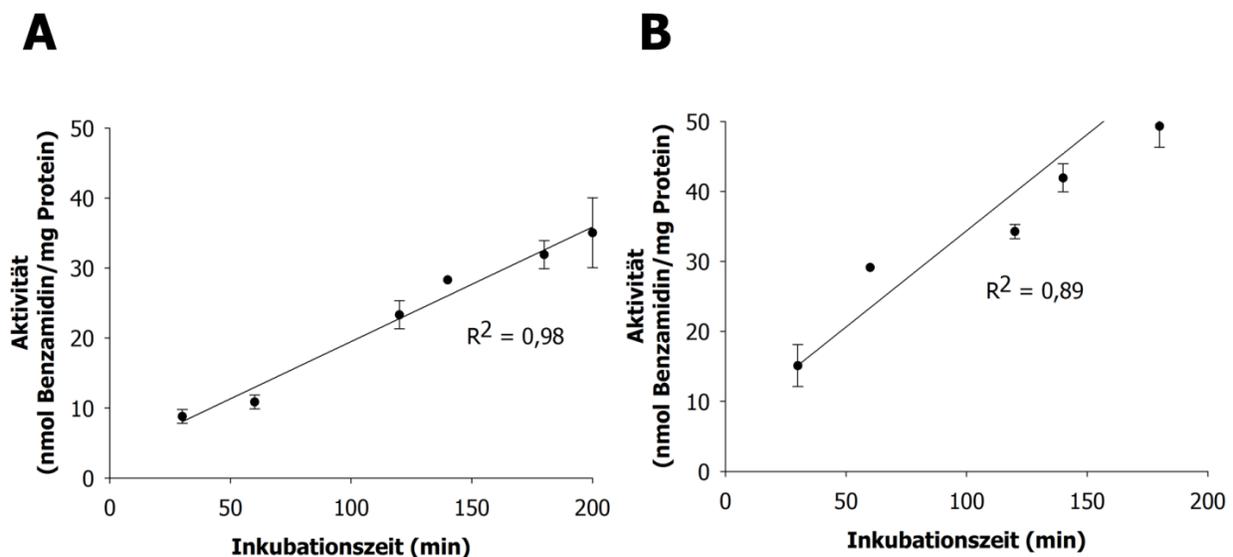
**A** HMCL **B** HEK-293 **C** RC-124. Die Zellen wurden in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert und für 120 min mit variablen Konzentrationen Benzamidoxim inkubiert. Die Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin erfolgte per HPLC-Analytik. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von zwei Ansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden. Die Berechnung der enzymkinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_m$  erfolgte mit SigmaPlot, v. 11.0.

**Tabelle 3. Enzymkinetische Parameter  $K_m$  und  $v_{\max}$  für die Reduktion von Benzamidoxim durch HMCL, HEK-293 und RC-124<sup>2</sup>.**

Zelllinie	$v_{\max}$ (nmol Benzamidin/(min x mg Protein))	$K_m$ (mM)
HMCL	0,09 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,05
HEK-293	0,40 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,07
RC-124	0,04 $\pm$ 0,00	0,27 $\pm$ 0,20

<sup>2</sup> Die Zellen wurden in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert und für 120 min mit variablen Konzentrationen Benzamidoxim inkubiert. Die Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin erfolgte per HPLC-Analytik. Je Konzentration wurden zwei Ansätze inkubiert, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Berechnung der enzymkinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_m$  erfolgte mit SigmaPlot, v. 11.0.

Die *N*-reduktive Aktivität war über einen Zeitraum von 200 min für HMCL und HEK-293 linear (Abbildung 20). Von der Testung der Zeitabhängigkeit von RC-124 wurde abgesehen, da die Zellen eine sehr langsame Wachstumszeit aufwiesen und so nicht für weitere Studien in Frage kamen. Hieraus ergaben sich Standardinkubationsbedingungen von 5 mM Benzamidoxim und 120 min Inkubationszeit für die nachfolgend durchgeführten Untersuchungen zur *N*-reduktiven Aktivität in Induktionsstudien.



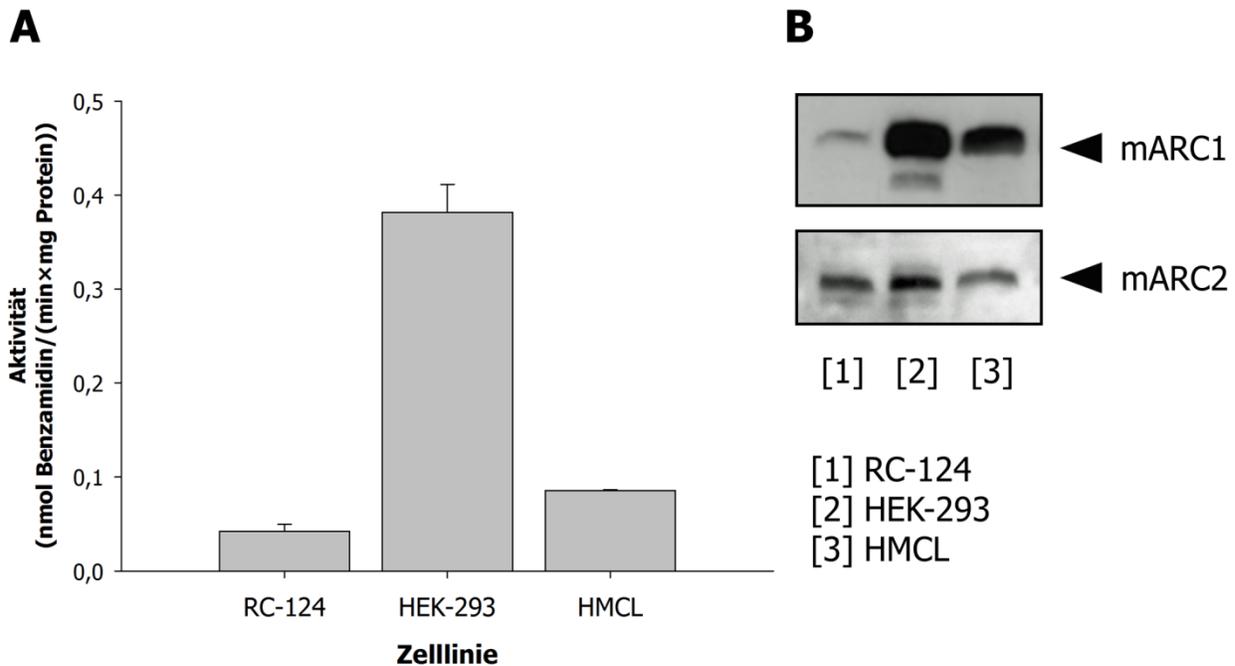
**Abbildung 20. Zeitabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim durch Zellen.**

**A** HMCL **B** HEK-293. Die Zellen wurden in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert und mit 5 mM Benzamidoxim für variable Zeitdauern inkubiert. Die Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin erfolgte per HPLC-Analytik.

### 3.3.1.1.2 Western Blot-Analyse für mARC1 und mARC2 in HEK-293, HMCL und RC-124

Hohe Proteinmengen konnten für mARC1 in HEK-293 und HMCL gefunden werden, im Vergleich dazu wies RC-124 nur moderate Mengen an mARC1 auf. Die Befunde korrelierten mit den *N*-reduktiven Aktivitäten der Zelllinien gegenüber dem Modellsubstrat Benzamidoxim. Für mARC2 konnte die größte Menge in HEK-293

detektiert werden, RC-124 und HMCL wiesen ähnliche Mengen an mARC2 auf (Abbildung 21).



**Abbildung 21. *N*-reduktive Aktivität und Western Blot-Analyse der untersuchten Zelllinien.**

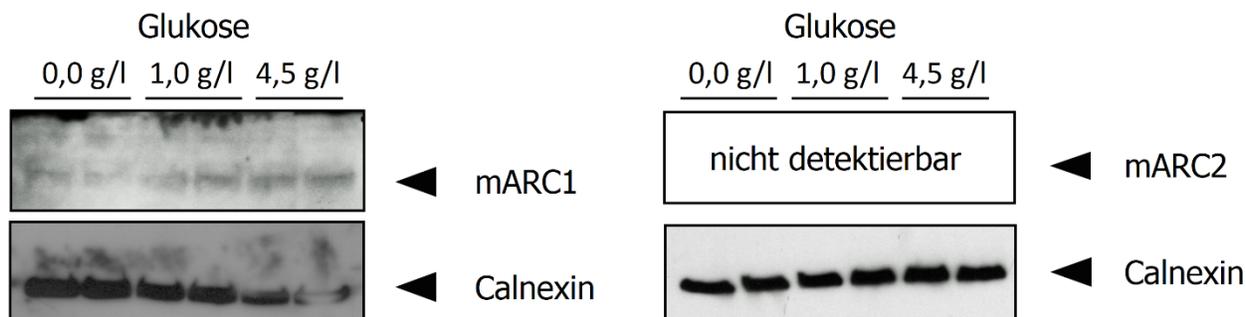
**A** *N*-reduktive Aktivität bestimmt in 12-Well-Zellkulturplatten mit 5 mM Benzamidoxim-haltigem Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min, nachfolgende Bestimmung der Konzentration des Metaboliten Benzamidin per HPLC-Analytik. **B** Western-Blot-Analyse der Zelllinien. Es wurden 35 µg Protein als Lysat je Spur geladen, zur Detektion wurde anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1000 sowie anti-mARC2-Antikörper der Verdünnung 1:500 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper kam Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG zum Einsatz, die Detektion erfolgte mittels ECL-Reagenz. Die Spur des Molekulargewichtsmarkers wurde aus der Abbildung entfernt.

Aufgrund der Charakterisierung der Zelllinien HMCL, HEK-293 und RC-124 wurden die nachfolgenden Induktionsstudien mit HMCL und HEK-293 durchgeführt, da ein hinreichendes Vorkommen von mARC1 und mARC2, befriedigende *N*-reduktive Aktivität sowie gute Kultivierbarkeit gegeben waren.

### 3.3.2 Studien zur Induktion der mARC-Proteine in Zellkulturen

#### 3.3.2.1 Induktion der mARC-Proteine durch Glukose

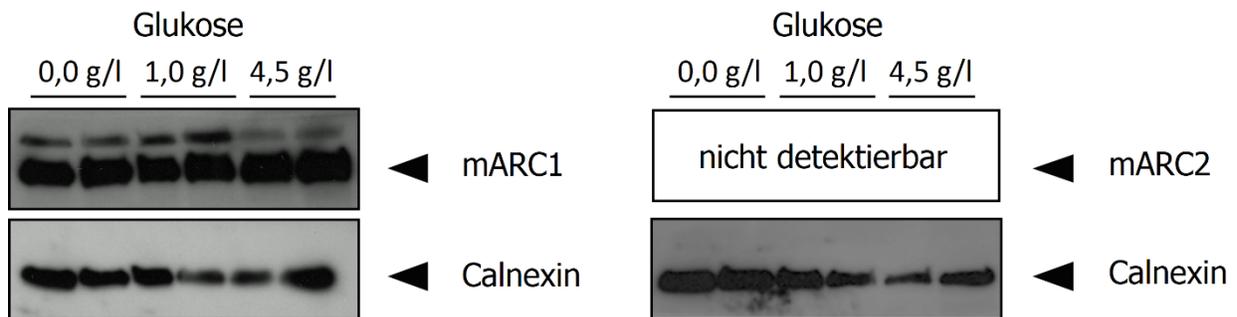
Um zu testen, ob Glukose im Zellkulturmedium das *N*-reduktive mARC-haltige System beeinflusst, wurden HMCL und HEK-293 in verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert. Im Anschluss wurden Western Blot-Analysen durchgeführt und die *N*-reduktive Aktivität der Zellen bestimmt. Für HMCL zeigte sich eine Zunahme der mARC1-Proteinmenge mit steigender Glukosekonzentration im Kulturmedium, mARC2 konnte trotz mehrfacher Versuche nicht im Western Blot nachgewiesen werden. Die Proteinmenge für mARC2 lag unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Antikörpers (Abbildung 22). Auch die *N*-reduktive Aktivität nahm mit zunehmender Glukosekonzentration im Kulturmedium statistisch signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) zu (Abbildung 24 A).



**Abbildung 22. Western Blot-Analyse mit Lysaten von HMCL, kultiviert in verschiedenen Glukosekonzentrationen.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 25 µg Protein (Lysat) je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-mARC2-Antikörper der Verdünnung 1:500 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet, die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenzes. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt.

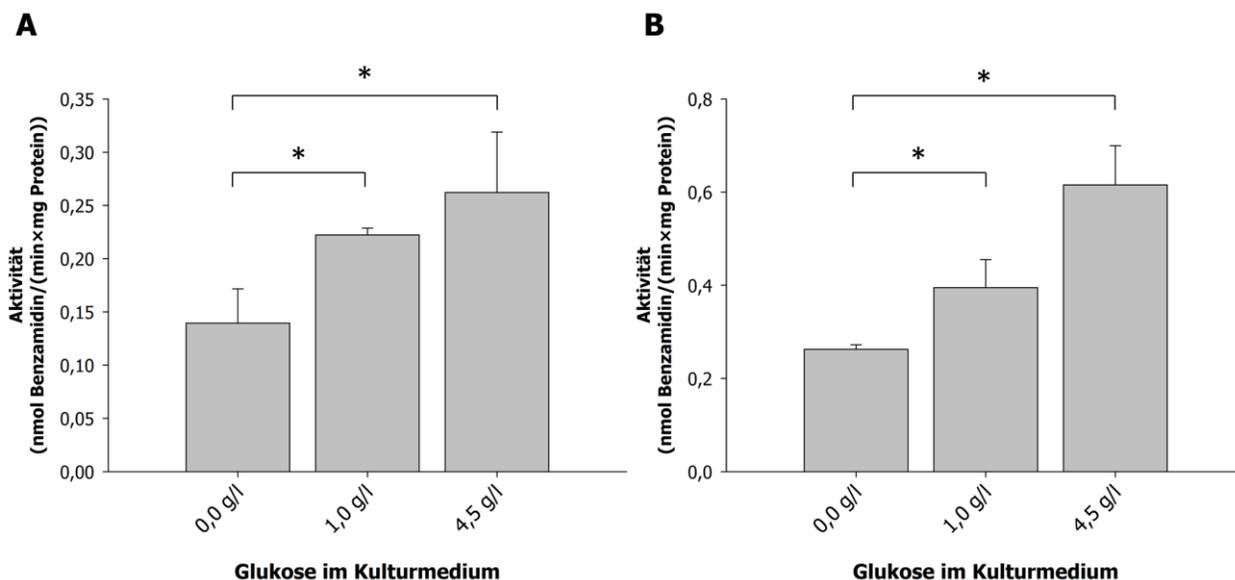
Für HEK-293 ließ sich allenfalls eine leichte Zunahme des mARC1-Proteins im Western Blot nachweisen, mARC2 war auch hier nicht detektierbar (Abbildung 23). Die *N*-reduktive Aktivität stieg wie bei HMCL mit steigender Glukosekonzentration statistisch signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) an (Abbildung 24 B).



**Abbildung 23. Western Blot-Analyse mit Lysaten von HEK-293, kultiviert in verschiedenen Glukosekonzentrationen.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 25 µg Protein (Lysat) je Spur wurde ein Western-Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-mARC2-Antikörper der Verdünnung 1:500 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet, die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenzes. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt.

Die *N*-reduktive Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem sowie das mARC1-Protein lassen sich folglich in den Zelllinien HMCL und HEK-293 durch Glukose induzieren.



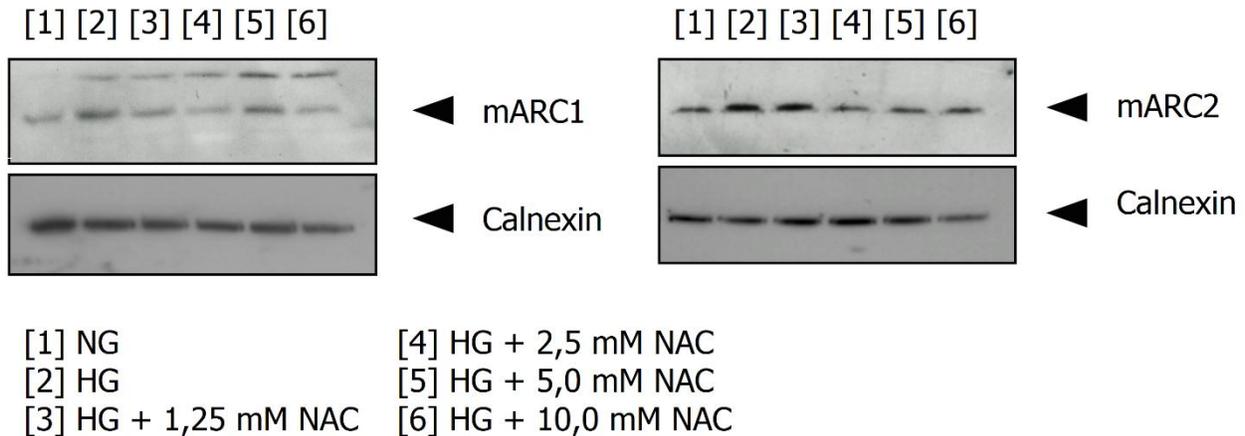
**Abbildung 24. *N*-reduktive Aktivität von HMCL und HEK-293 nach Kultivierung in verschiedenen Glukosekonzentrationen.**

**A** HMCL, **B** HEK-293.

Die Zellen wurden für vier Tage entweder in Kulturmedium ohne Glukose oder mit 1,0 g/l oder 4,5 g/l Glukose in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte mit 5 mM Benzamidoxim im Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min. Der Metabolit Benzamidin wurde im Inkubationspuffer per HPLC-Analytik quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von sechs parallel inkubierten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant erachtet.

### 3.3.2.2 Glukose-Rescue-Versuche zur Induktion der mARC-Proteine durch Glukose

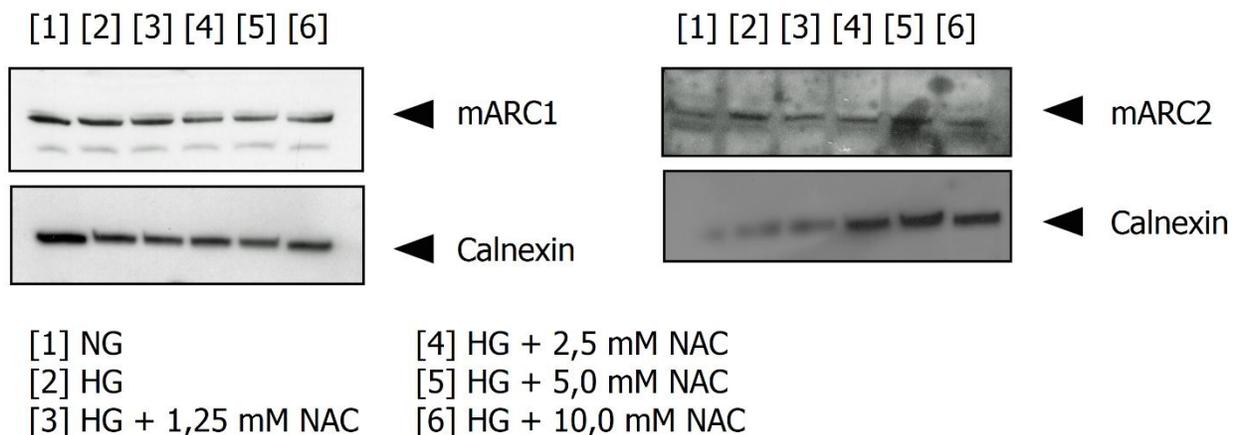
Um zu testen, ob die unter 3.3.2 gefundene Induktion durch Glukose direkt oder durch den resultierenden oxidativen Stress bedingt ist, wurde ein Rescue-Experiment durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in Medien kultiviert, die zum einen 1,0 g/l Glukose und zum anderen 4,5 g/l Glukose und keinen Zusatz oder verschiedene Konzentrationen NAC enthielten. Es wurden das Proteinvorkommen für mARC1 und mARC2 sowie die *N*-reduktive Aktivität untersucht. Für HMCL ließ sich sowohl für mARC1 als auch für mARC2 die Induktion durch Glukose sowie deren Antagonisierung durch NAC-Zusatz im Kulturmedium zeigen (Abbildung 25).



**Abbildung 25. Western Blot-Analyse mit Lysaten von HMCL, kultiviert in verschiedenen Glukosekonzentrationen mit und ohne NAC-Zusatz (Glukose-Rescue-Experiment).**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 25 µg Protein (Lysat) je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Detektion kann anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-mARC2-Antikörper der Verdünnung 1:500 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper in der Verdünnung 1:10.000 verwendet, die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenzes. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt. NG = „normal“ Glukose = 1,0 g/l, HG = „hoch“ Glukose = 4,5 g/l.

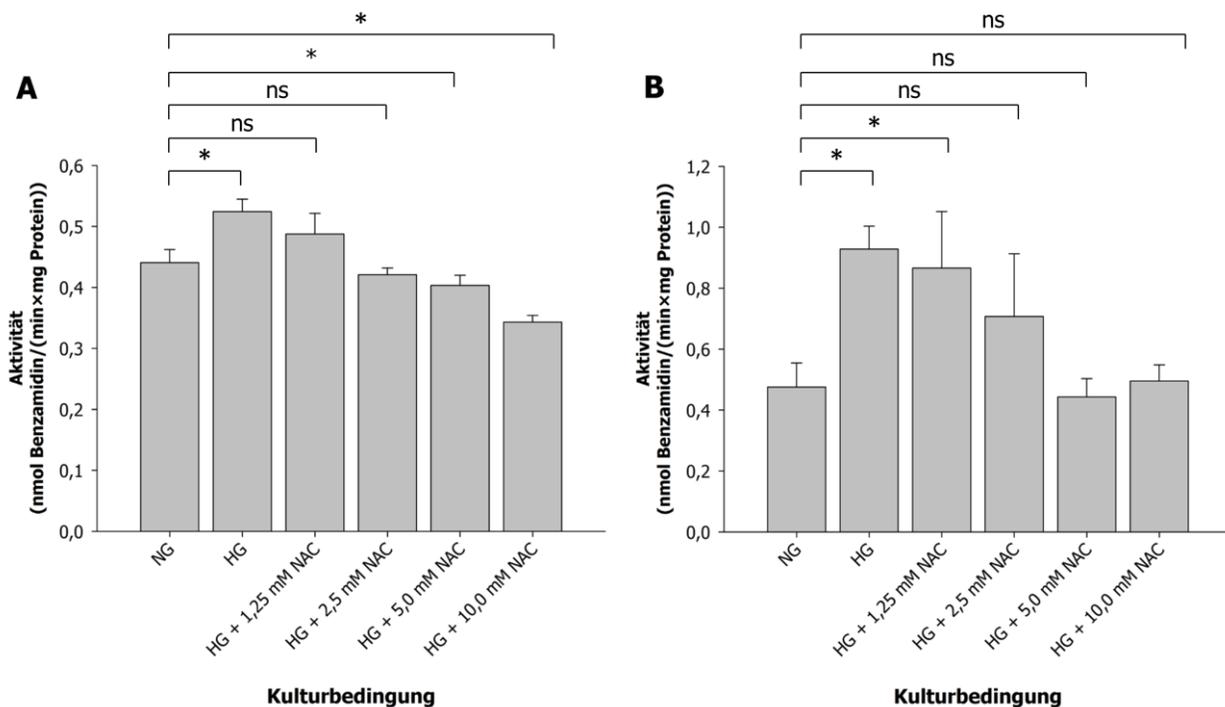
Auch HEK-293 zeigte für mARC2 die Induktion durch Glukose im Kulturmedium und deren Antagonisierbarkeit durch NAC. Für mARC1 war der Effekt nicht eindeutig nachweisbar (Abbildung 26).



**Abbildung 26. Western Blot-Analyse mit Lysaten von HEK-293, kultiviert in verschiedenen Glukosekonzentrationen mit und ohne NAC-Zusatz (Glukose-Rescue-Experiment).**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 25 µg Protein (Lysat) je Spur wurde ein Western-Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-mARC2-Antikörper der Verdünnung 1:500 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper in der Verdünnung 1:10.000 verwendet, die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenzes. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt. NG = „normal“ Glukose = 1,0 g/l, HG = „hoch“ Glukose = 4,5 g/l.

Die *N*-reduktive Aktivität beider Zelllinien stieg zunächst mit erhöhter Glukosekonzentration statistisch signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) an, ging aber dosisabhängig mit Zusatz von NAC im Medium mit 4,5 g/l Glukose zurück. Im Falle von HMCL ergaben sich dabei statistisch signifikant erniedrigte *N*-reduktive Aktivitäten bei Zusatz von 5,0 und 10,0 mM NAC zum Kulturmedium (4,5 g/l Glukose) gegenüber Zellen, die in 1,0 g/l Glukose ohne NAC-Zusatz kultiviert wurden. Für HEK-293 war dies für keine der eingesetzten NAC-Konzentrationen der Fall, allerdings war die *N*-reduktive Aktivität von Zellen bei Zusatz von 1,25 mM NAC (4,5 g/l Glukose) gegenüber Zellen die in 1,0 g/l Glukose ohne NAC-Zusatz kultiviert wurden statistisch signifikant erhöht (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 27).



**Abbildung 27. N-reduktive Aktivität von HMCL und HEK-293 im Glukose-Rescue-Experiment.**

**A** HMCL, **B** HEK-293.

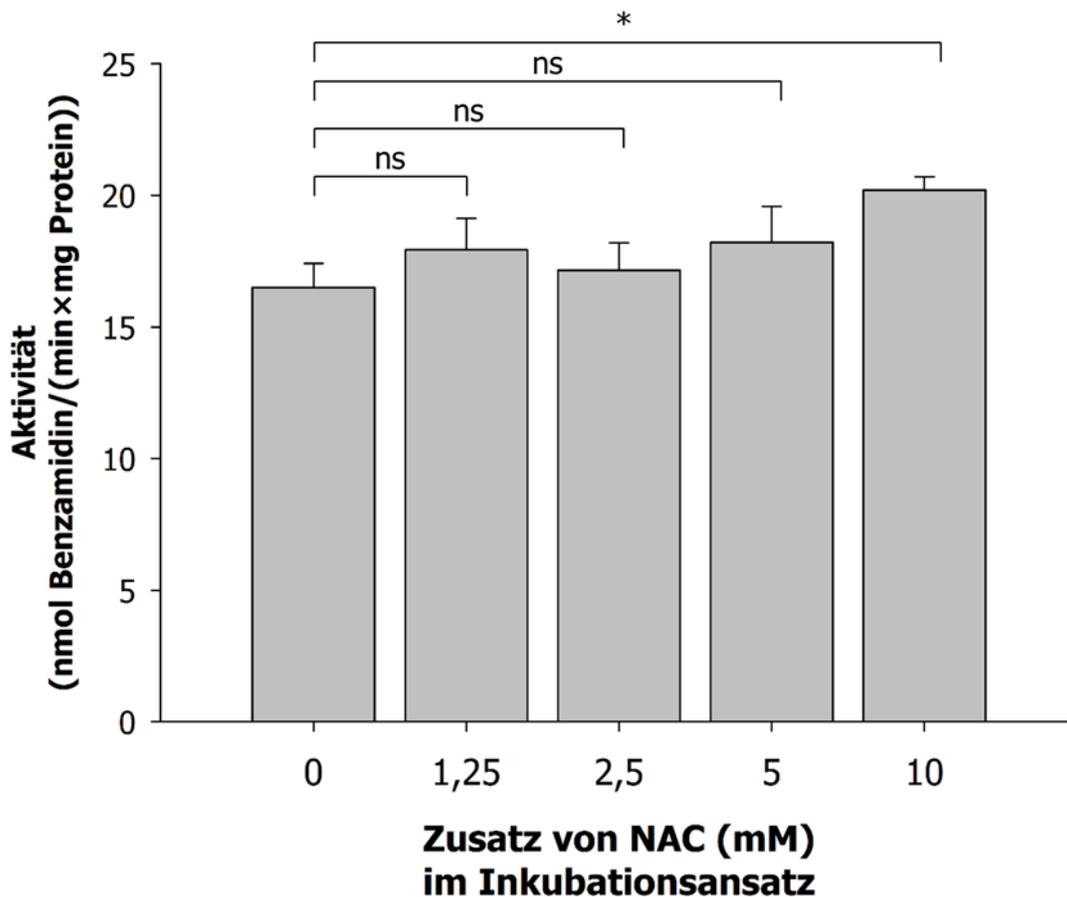
Die Zellen wurden für vier Tage entweder in Kulturmedium mit 1,0 g/l Glukose (NG = „normal“ Glukose) oder 4,5 g/l Glukose (HG = „hoch“ Glukose) oder 4,5 g/l Glukose und verschiedenen Konzentrationen NAC in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Die Bestimmung der N-reduktiven Aktivität erfolgte mit 5 mM Benzamidoxim im Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min. Der Metabolit Benzamidin wurde im Inkubationsmedium per HPLC-Analytik quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichungen von vier parallel inkubierten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant erachtet, ns = nicht signifikant.

Um auszuschließen, dass der Rückgang der N-reduktiven Aktivität durch direkte Hemmung des mARC-haltigen Enzymsystems durch NAC verursacht wird, wurden weitere *in vitro* Studien mit Schweinelebermitochondrien und dem rekombinant hergestellten, rekonstituierten mARC-Enzymsystem durchgeführt (3.3.2.2.1).

#### 3.3.2.2.1 Einfluss von NAC auf das N-reduktive System *in vitro*

Um eine mögliche Hemmung der N-reduktiven Aktivität durch NAC auszuschließen, wurden Schweinelebermitochondrien im *in vitro* Biotransformations-Assay mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen NAC untersucht. Für den Konzentrationsbereich von

1,25–5,0 mM NAC konnte kein Einfluss des NAC-Zusatzes im Inkubationsansatz auf die *N*-reduktive Aktivität festgestellt werden, lediglich der Zusatz von 10 mM NAC führte zu statistisch signifikant erhöhter *N*-reduktiver Aktivität (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 28).

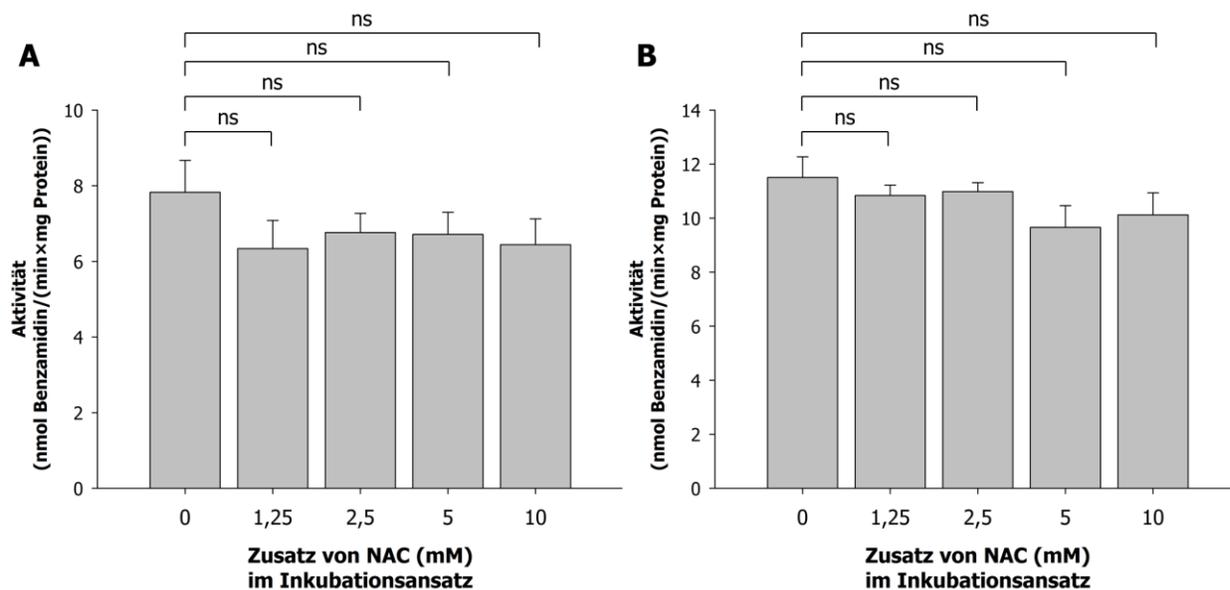


**Abbildung 28. Einfluss von NAC auf die *N*-reduktive Aktivität von Schweinelebermitochondrien.**

0,05 mg Schweinelebermitochondrien wurden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 15 min inkubiert. Es wurden 0–10 mM NAC zugesetzt. Nach Abstoppen mit 150  $\mu$ l Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant erachtet, ns = nicht signifikant.

Der Einfluss von NAC auf die *N*-reduktive Aktivität des rekonstituierten, rekombinant hergestellten *N*-reduktiven Systems mit mARC1 und mARC2 wurden ebenfalls

untersucht. Es ließ sich kein direkter Einfluss von NAC auf die *N*-reduktive Aktivität nachweisen (t-Test,  $p > 0,05$ ) (Abbildung 29).



**Abbildung 29. Einfluss von NAC auf die *N*-reduktive Aktivität des rekonstituierten, rekombinant hergestellten mARC-haltigen Enzymsystems.**

**A** mARC1 **B** mARC2.

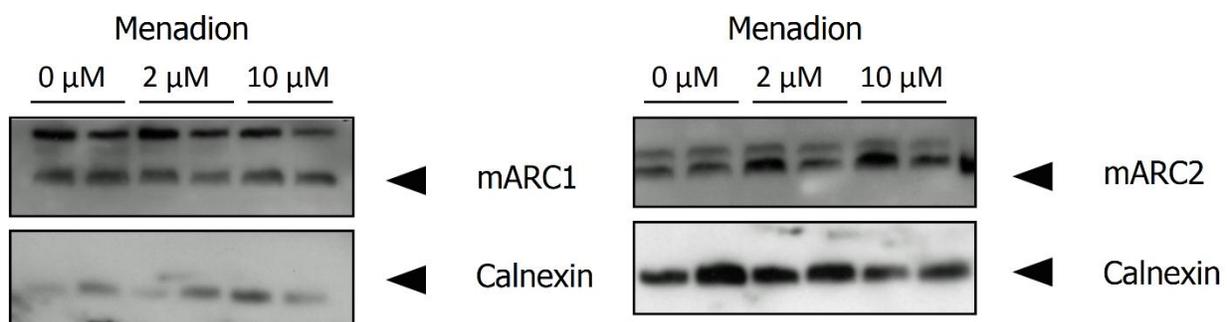
10 µg mARC, CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYBR in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 15 min inkubiert. Es wurde 0–10 mM NAC zugesetzt. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet, ns = nicht signifikant.

Es konnte kein Einfluss von NAC auf die *N*-reduktive Aktivität im Sinne einer Hemmung des Enzymsystems gefunden werden. Demnach ist der Rückgang der *N*-reduktiven Aktivität in Zellkulturen, die in 4,5 g/l Glukose mit Zusatz von verschiedenen NAC-Konzentrationen kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen die ohne NAC kultiviert wurden, auf einen Rückgang der mARC-Proteine zurückzuführen, wie sie auch im Western Blot zu sehen war (3.3.2.2).

### 3.3.2.3 Induktion der mARC-Proteine durch oxidativen Stress mittels Menadion

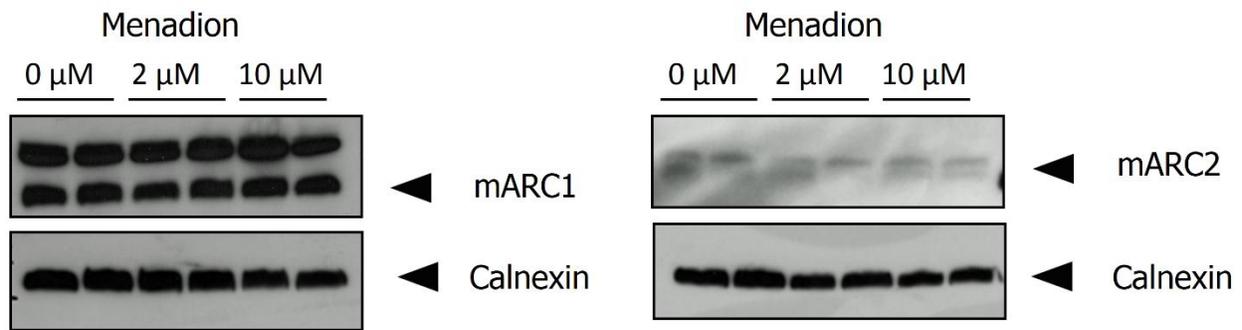
Um den Einfluss von oxidativem Stress auf das mARC-haltige Enzymsystem zu testen, wurden die Zelllinien HMCL und HEK-293 unter Menadion-Zusatz kultiviert und die *N*-reduktive Aktivität sowie das Vorkommen von mARC1 und mARC2 mittels Western Blot untersucht. Der Zusatz von Menadion im Kulturmedium generiert ein oxidatives Milieu durch die Metabolisierung von Menadion durch die Zellen zu Superoxidanionen (Criddle *et al.*, 2006).

Der Zusatz von Menadion im Kulturmedium bewirkte weder bei den HMCL- noch bei den HEK-293-Zellen eine Veränderung bezüglich des Vorkommens von mARC1 und mARC2 (Abbildung 30, Abbildung 31). Auffällig war jedoch, dass bei beiden Zelllinien im Western Blot für mARC1 eine zweite Bande oberhalb der mARC-Bande (34 kDa) bei ca. 50 kDa zu erkennen war. Im Rahmen der Dissertation von Carmen Krischkowski war eine solche Bande auch beobachtet worden und konnte mittels Blocking-Experiment als unspezifische Bande identifiziert werden (Krishkowski, Dissertation in Vorbereitung).



**Abbildung 30. Western Blot-Analyse mit Lysaten von HMCL, kultiviert mit verschiedenen Menadion-Konzentrationen im Kulturmedium.**

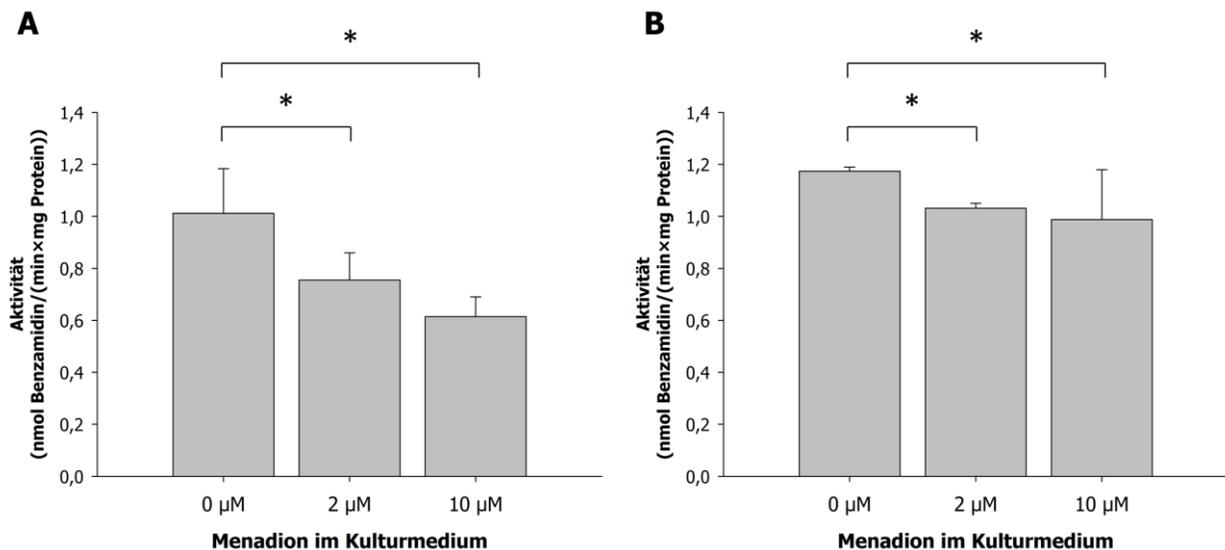
Nach erfolgter SDS-PAGE mit 25 μg Protein (Lysat) je Spur wurde ein Western-Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-mARC2-Antikörper der Verdünnung 1:500 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper in der Verdünnung 1:10.000 verwendet, die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenz. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt.



**Abbildung 31. Western Blot-Analyse mit Lysaten von HEK-293, kultiviert in verschiedenen Menadion-Konzentrationen im Kulturmedium.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 25  $\mu\text{g}$  Protein (Lysat) je Spur wurde ein Western-Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-mARC2-Antikörper der Verdünnung 1:500 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet, die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenz. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt.

Mit steigender Menadion-Konzentration war eine statistisch signifikante Abnahme der *N*-reduktiven Aktivität der HMCL- und der HEK-293-Zellen zu beobachten (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 32), bei HMCL war der Effekt jedoch stärker ausgeprägt.



**Abbildung 32. *N*-reduktive Aktivität von HMCL und HEK-293 mit und ohne Zusatz von Menadion im Kulturmedium.**

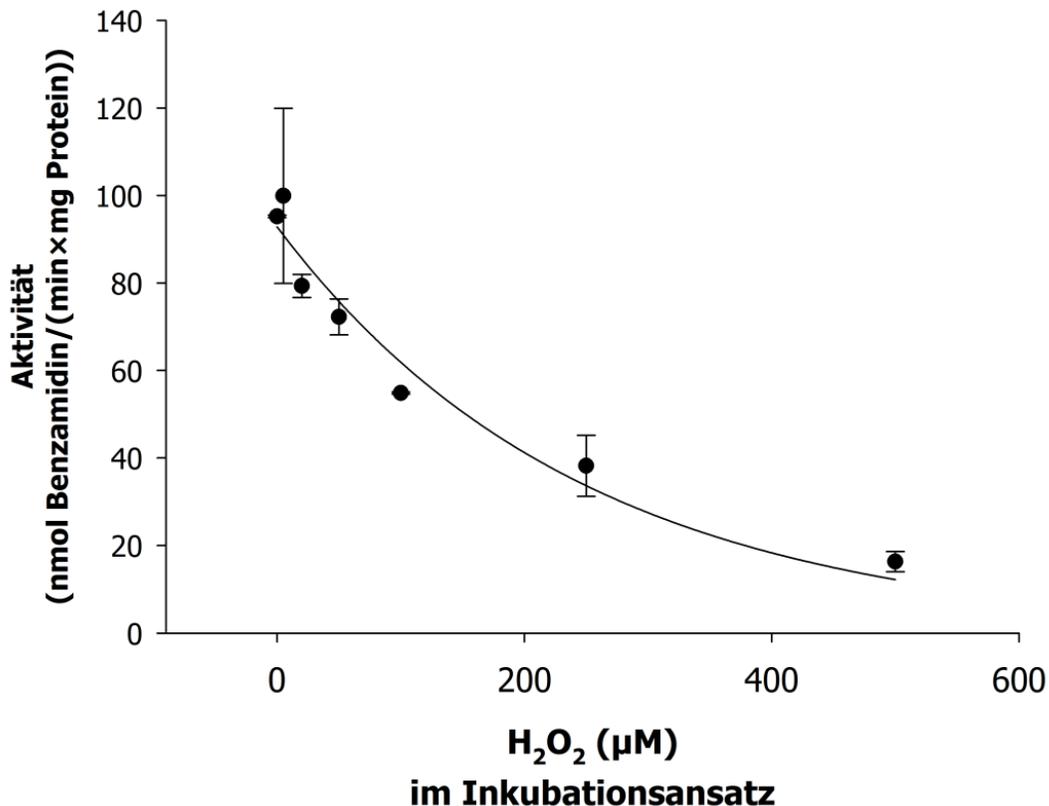
**A** HMCL, **B** HEK-293.

Die Zellen wurden für vier Tage unter Zusatz von 0, 2 oder 10 µM Menadion in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte mit 5 mM Benzamidoxim im Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min. Der Metabolit Benzamidin wurde im Inkubationsmedium per HPLC-Analytik quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichungen von vier parallel inkubierten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

Es konnte folglich keine Induktion des mARC-haltigen Enzymsystems durch erhöhten oxidativen Stress gezeigt werden. Der Rückgang der *N*-reduktiven Aktivität weist außerdem auf eine Hemmung durch Superoxidanionen bzw.  $H_2O_2$  hin. Dies könnte zum einen durch eine Störung des Zellstoffwechsels durch die reaktiven Spezies bedingt sein, zum anderen wäre aber auch eine Interaktion als Inhibitor oder sogar Substrat des mARC-haltigen Enzymsystems denkbar. Dieser Frage wurde in 3.2.3.3.1 weiter nachgegangen.

### 3.3.2.3.1 Einfluss von $\text{H}_2\text{O}_2$ und Catalase auf das *N*-reduktive System *in vitro*

Aus internen Daten des Arbeitskreises im Rahmen der Dissertation von Danilo Frieriep war bekannt, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Lage ist, das rekonstituierte, rekombinant hergestellte *N*-reduktive System in seiner Aktivität dosisabhängig zu hemmen (Abbildung 33). Zum einen ist eine Hemmung durch Oxidation des Molybdäns im Moco oder des Eisens im Häm des CYB5B denkbar, ebenso wie eine Oxidation der Aminosäuren der Proteine und Zerstörung selbiger. Genauso wäre aber auch eine Bindung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  an das mARC-Enzym im Sinne eines Inhibitors oder sogar einer konkurrierenden Substratbindung denkbar. In letzteren Fällen müsste eine Entfernung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einer Wiederherstellung der *N*-reduktiven Aktivität führen. Daher wurden Biotransformationsstudien mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim und dem rekombinant hergestellten Enzymsystem unternommen. Das Enzymsystem wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorinkubiert, welches anschließend in einigen Ansätzen durch Catalase wieder entfernt wurde. Die benötigte Menge Catalase war zuvor in Vorversuchen ermittelt worden. Außerdem war zuvor mittels spektrometrischer Untersuchungen nachgewiesen worden, dass der benötigte Cofaktor NADH im  $\text{H}_2\text{O}_2$ -haltigen Ansatz hinreichend stabil ist (Daten nicht gezeigt).

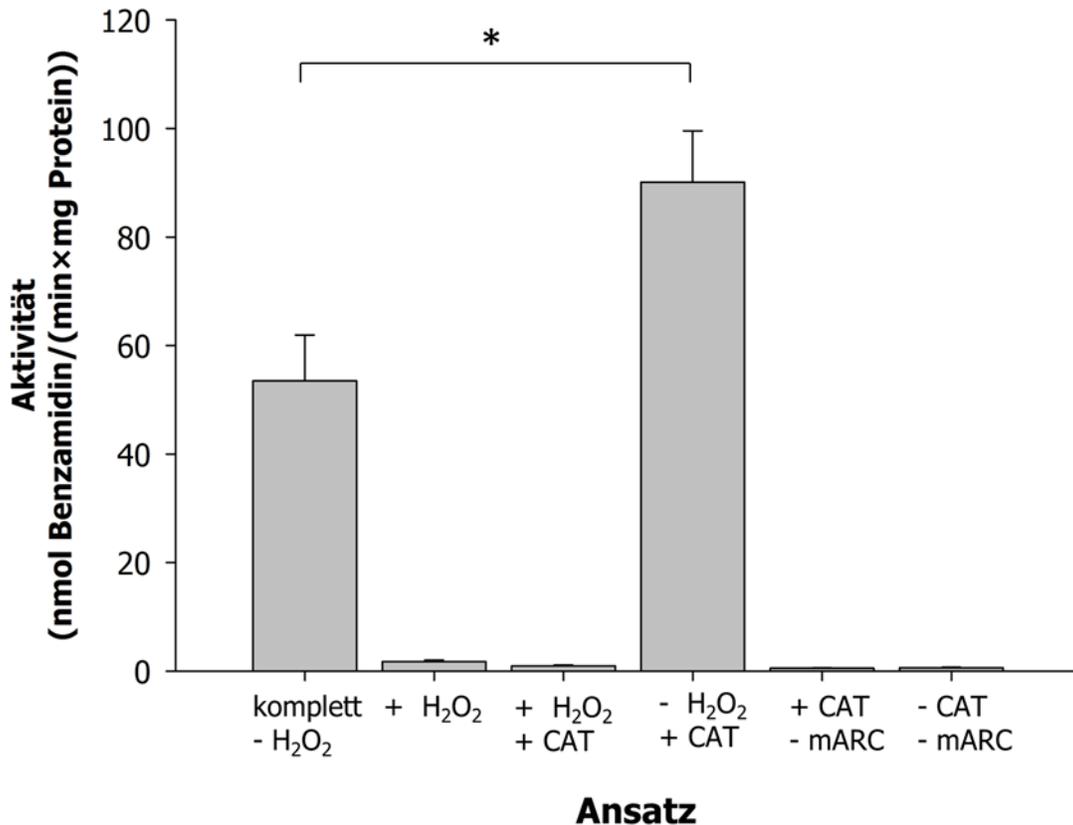


**Abbildung 33. Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität des mARC-Enzymsystems durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Es wurden mARC1 (75 pmol Mo), CYB5B (75 pmol Häm), CYB5R (7,6 pmol FAD) in 20 mM MES-Puffer pH 6,0, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH und 0-500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einem Gesamtvolumen von 150 µl für 15 min inkubiert. Nach Abstoppen mit Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und per HPLC vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von zwei Parallelansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die Daten wurden von Dr. Danilo Froriep generiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die *N*-reduktive Aktivität ging in den Ansätzen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> irreversibel verloren und ließ sich auch durch Entgiftung mit Catalase nicht rekonstituieren (Abbildung 34). Interessanterweise zeigten Kontrollansätze ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aber mit Catalase statistisch signifikant höhere Aktivitäten als die Standardansätze ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ohne Catalase (t-Test,  $p < 0,05$ ). Augenscheinlich scheinen auch im Lager- und/oder Inkubationspuffer

vorkommende Spuren von reaktiven Spezies das System zu hemmen, welches somit durch den Zusatz von Catalase und Entgiftung selbiger Spezies profitiert.



**Abbildung 34. Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Catalase auf die *N*-reduktive Aktivität des mARC-Enzymsystems.**

10 µg mARC2, CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYBR in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 15 min inkubiert. Es wurden gegebenenfalls 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und/oder 100 U Catalase zugesetzt. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant erachtet.

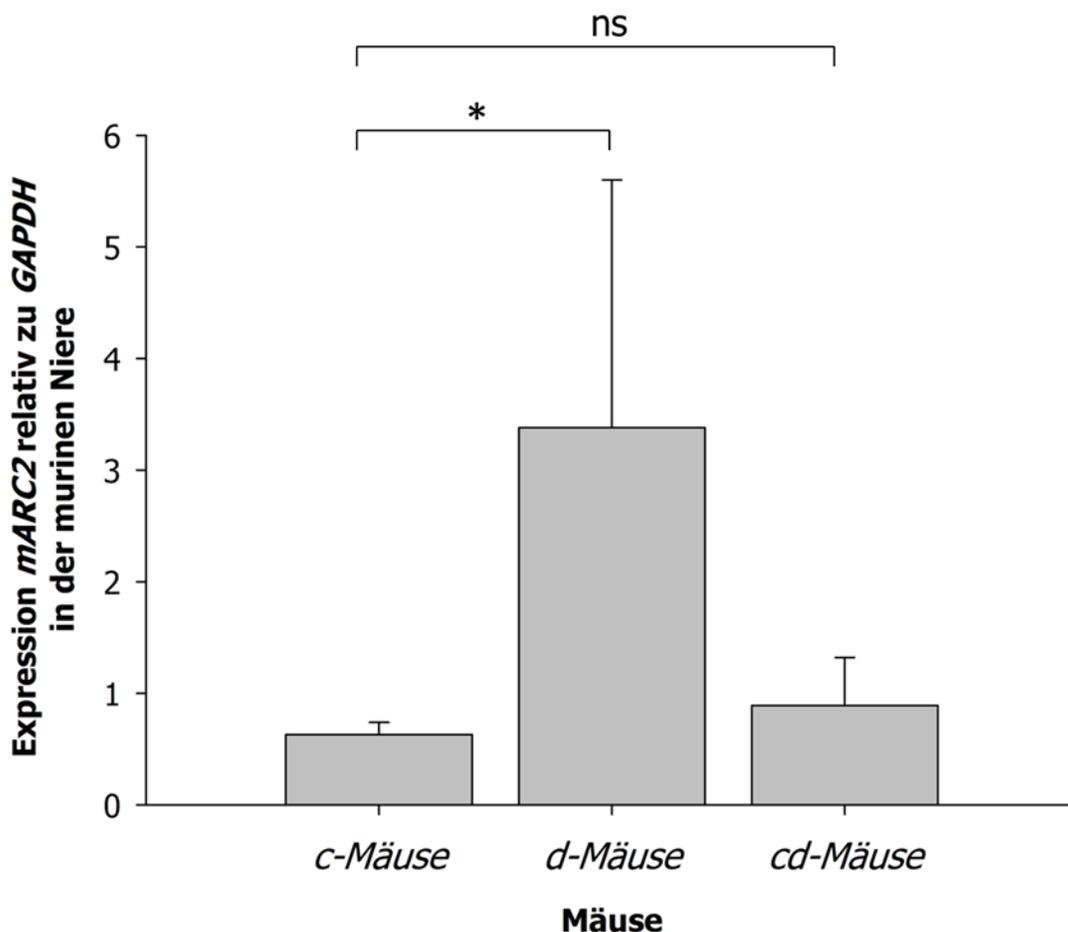
Folglich ist es denkbar, dass die Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität in Zellkulturen, die unter Menadion-Zusatz kultiviert wurden, auf eine Hemmung des mARC-Enzymsystems durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückzuführen ist.

### 3.3.3 Veränderungen von mARC2 im STZ-Mausmodell

Leber- und Nierengewebeproben des STZ-Mausmodells wurden untersucht. Es handelt sich dabei um Kontrolltiere (*c*-Mäuse), Mäuse bei denen durch STZ-Injektion Diabetes Typ 1 ausgelöst wurde (*d*-Mäuse), sowie Mäuse denen nach Induktion des Diabetes Typ 1 Inselzellen zur Heilung implantiert wurden (*cd*-Mäuse).

#### 3.3.3.1 Expression von mARC2 im murinen Nieren- und Lebergewebe des STZ-Mausmodells

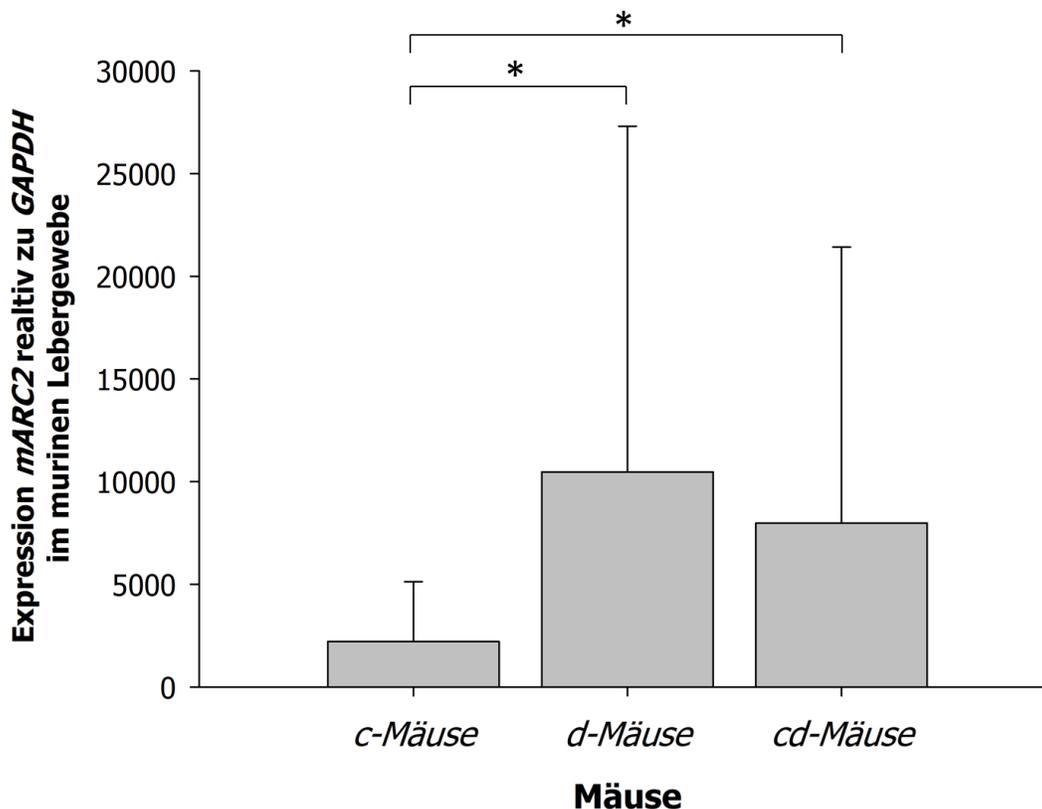
Mit Hilfe der qRT-PCR wurde nach Extraktion der mRNA aus Nieren- und Leberproben die Expression für mARC2 bestimmt und relativ zum *housekeeping*-Gen GAPDH ausgedrückt. Es konnte eine statistisch signifikant erhöhte Expression (t-Test,  $p < 0,05$ ) für mARC2 im Nierengewebe der *d*-Mäuse verglichen zur Kontrolle gefunden werden. Die Expression der *cd*-Mäuse unterschied sich jedoch nicht im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 35).



**Abbildung 35. Expression von mARC2 relativ zu GAPDH in der Niere von *c*-, *d*- und *cd*-Mäusen.**

Für jeden Zustand wurden die Nieren von  $n=3$  Versuchstieren untersucht. Es wurden je Probe drei Ansätze zur Synthese von cDNA verwendet, die aufgearbeitet und per qRT-PCR vermessen wurden, es handelt sich also um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von  $n = 9$  Messungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet und mit \* gekennzeichnet, ns = nicht signifikant.

Im Falle der Lebergewebeproben war eine statistisch signifikante Erhöhung der relativen mARC2-Expression in der *d*-Gruppe verglichen mit der Kontrolle zu verzeichnen (t-Test,  $p < 0,05$ ). Allerdings zeigte auch die *cd*-Gruppe eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle und somit eine ähnlich hohe relative Expression wie die *d*-Gruppe. Außerdem waren die hohen Standardabweichungen in den Messungen der *d*- und *cd*-Gruppe auffällig (Abbildung 36).

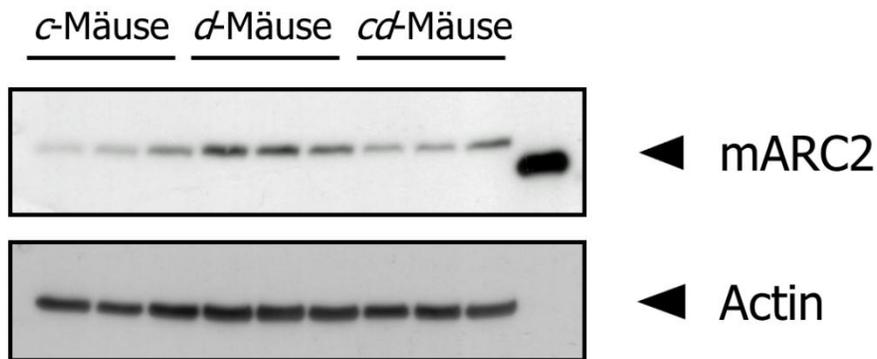


**Abbildung 36. Expression von mARC2 relativ zu GAPDH in der Leber von *c*-, *d*- und *cd*-Mäusen.**

Für jeden Zustand wurden die Lebern von  $n=3$  Versuchstieren untersucht. Es wurden je Probe drei Ansätze zur Synthese von cDNA verwendet, die aufgearbeitet und per qRT-PCR vermessen wurden, es handelt sich also um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von  $n = 9$  Messungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet und mit \* gekennzeichnet.

### 3.3.3.2 Proteinmengen von mARC2 im Nieren- und Lebergewebe des STZ-Mausmodells

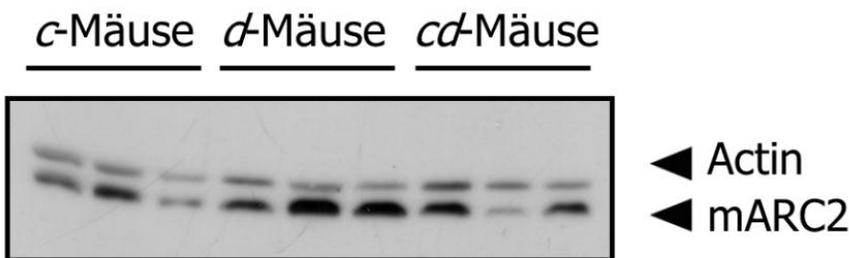
Die Homogenate der Nieren und Leber des STZ-Mausmodells wurden mittels Western Blot auf das Vorkommen des mARC2-Proteins untersucht. Actin diente als Ladekontrolle. Je Spur wurde das Homogenat eines Individuums aufgetragen, daraus ergaben sich drei Signale je Gruppe. Im Falle des Nierengewebes zeigten sich erhöhte Mengen für mARC2 in der Gruppe der *d*-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle, zwischen der Kontrolle und den *cd*-Mäusen waren keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 37).



**Abbildung 37. Western Blot-Analyse der Lysate des Nierengewebes von *c*-, *d*- und *cd*-Mäusen für mARC2.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 12 µg Protein je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:2.500 sowie anti-Actin-Antikörper der Verdünnung 1:500 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet. mARC2-Blot: Äußere rechte Spur: 0,05 µg rekombinant hergestelltes mARC2-Protein. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt.

Im Falle des Lebergewebes zeigten zwei Individuen der *d*-Gruppe deutlich erhöhte Proteinmengen für mARC2 im Vergleich zur Kontrolle. Dies war auch für eine *cd*-Maus der Fall. Die beiden anderen Individuen der *cd*-Gruppe zeigten mit der Kontrolle vergleichbare Proteinmengen für mARC2 (Abbildung 38).

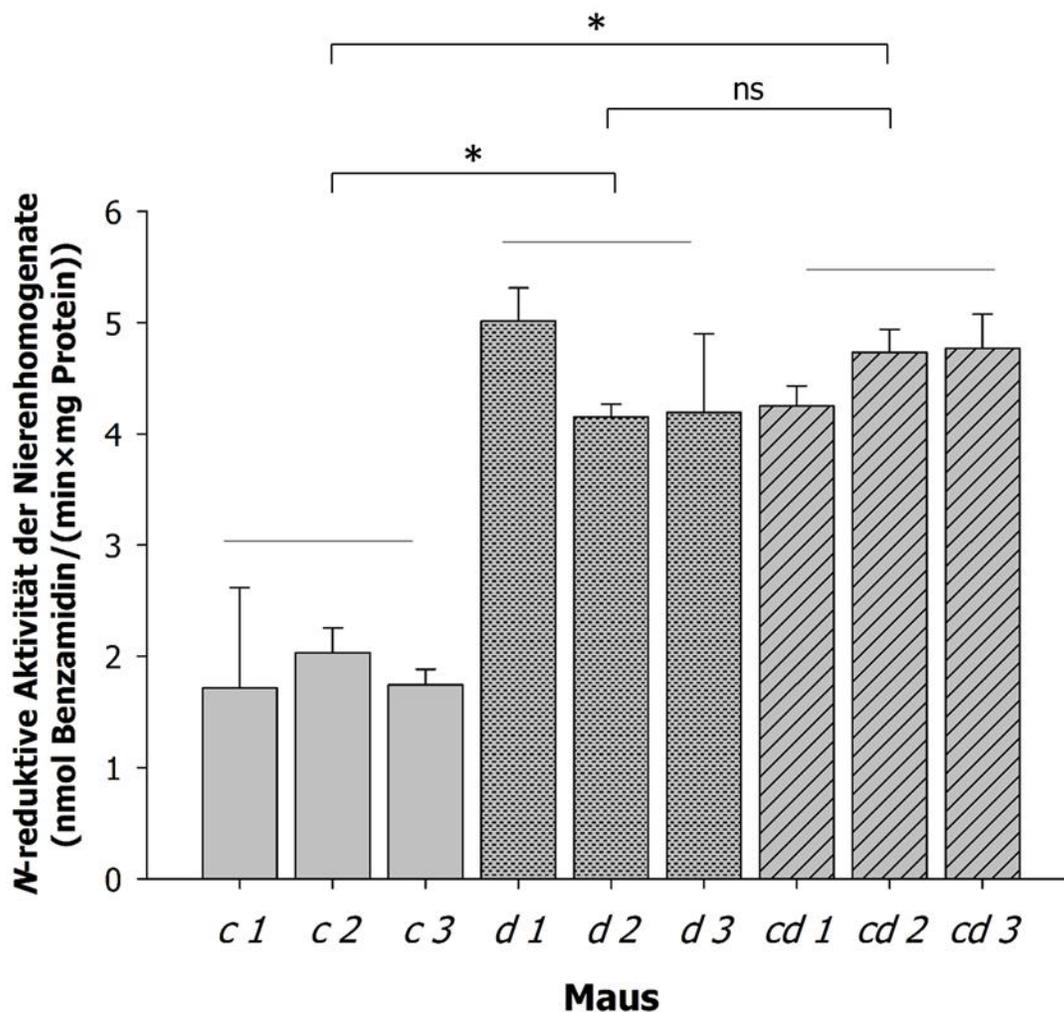


**Abbildung 38. Western Blot-Analyse des Lebergewebes von *c*-, *d*- und *cd*-Mäusen für mARC2.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 12 µg Protein je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:2.500 sowie anti-Actin-Antikörper der Verdünnung 1:500 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt.

### 3.3.3.3 *N*-reduktive Aktivität der Nieren- und Leberhomogenate des STZ-Mausmodells

Die *N*-reduktive Aktivität der Nieren- und Leberhomogenate der Versuchstiere des STZ-Mausmodells wurden mit Hilfe der Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim bestimmt. Im Falle der Nierenhomogenate war eine klare Steigerung der *N*-reduktiven Aktivität für die  $\alpha$ -Mäuse im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (Abbildung 39). Dies spiegelte die unter 3.3.3.2 gefundenen Proteinmengen für mARC2 in diesen Geweben wieder. Auch die  $\alpha\delta$ -Mäuse zeigten die erhöhte *N*-reduktive Aktivität im Vergleich zur Kontrolle und unterschieden sich somit in diesem Punkt nicht von den Aktivitäten der  $\alpha$ -Mäuse (Abbildung 39), allerdings korrelierte letzteres nicht mit den unter 3.3.3.2 gefundenen Proteinmengen für mARC2 für die einzelnen Individuen der  $\alpha\delta$ -Gruppe.



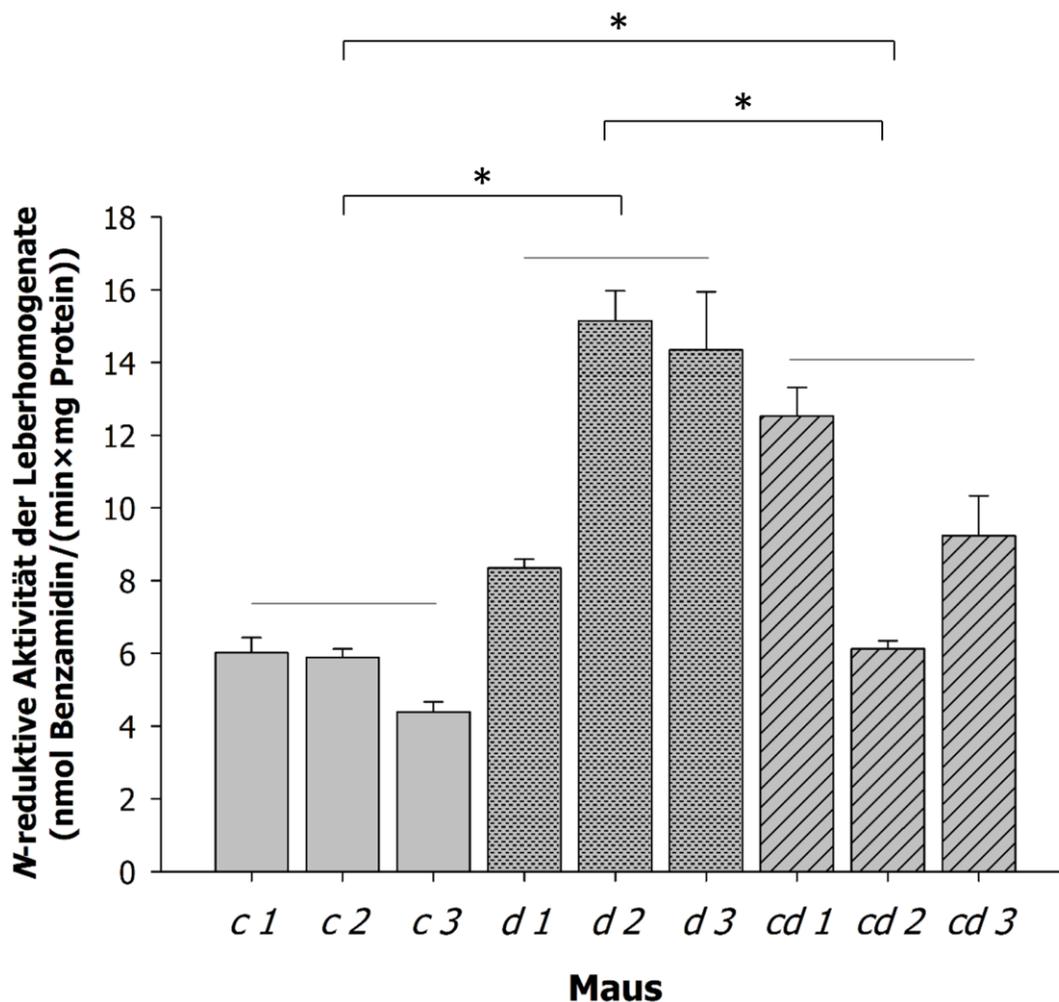
**Abbildung 39. N-reduktive Aktivität der Homogenate der Nieren von *c*-, *d*- und *cd*-Mäusen.**

Es wurde die Nieren von drei Versuchstieren je Gruppe untersucht (*c* 1-3 = *c*-Mäuse Individuum 1-3, *d* 1-3 = *d*-Mäuse Individuum 1-3, *cd* 1-3 = *cd*-Mäuse Individuum 1-3). 0,05 mg Homogenat wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 50 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Methanol erfolgte die Aufarbeitung und Vermessung der Ansätze per HPLC. Jede ermittelte Aktivität ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichungen aus zwei parallel inkubierten Ansätze, die je doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant erachtet.

Die gemittelten Aktivitäten der Nierenhomogenate unterschieden sich statistisch signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen der *c*- und *d*-Mäuse ( $1,8 \pm 0,5$  vs.  $4,3 \pm 0,6$  nmol Benzamidin/(min x mg Protein)) sowie *c*- und *cd*-Mäuse ( $1,8 \pm 0,5$  vs.  $4,6 \pm 0,3$  nmol Benzamidin/(min x mg Protein)) mit jeweils  $p < 0,05$ . Die Mittelwerte der Aktivitäten in der Gruppe der *d*-Mäuse im Vergleich zu denen der

*cd*-Mäusen unterscheiden sich nicht statistisch signifikant ( $4,3 \pm 0,6$  vs.  $4,6 \pm 0,3$  nmol Benzamidin/(min×mg Protein)) mit  $p > 0,05$ .

Die *N*-reduktive Aktivität der Leberhomogenate der *d*-Mäuse war im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Die Aktivität der Leberhomogenate von zwei Individuen war in der *cd*-Gruppe reduziert im Vergleich zur *d*-Gruppe und näherte sich somit wieder den Aktivitäten der Kontrollgruppe an. Die *N*-reduktive Aktivität der Leberhomogenate bildete für die einzelnen Individuen die in 3.3.3.2 gefundenen Proteinmengen für mARC2 für diese Versuchstiere ab.



**Abbildung 40. N-reduktive Aktivität der Homogenate der Lebern von c-, d- und cd-Mäusen.**

Es wurden die Lebern von drei Versuchstieren je Gruppe untersucht (*c 1-3* = *c*-Mäuse Individuum 1-3, *d 1-3* = *d*-Mäuse Individuum 1-3, *cd 1-3* = *cd*-Mäuse Individuum 1-3). 0,05 mg Homogenat wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 20 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Methanol erfolgte die Aufarbeitung und Vermessung der Ansätze per HPLC. Jede ermittelte Aktivität ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Ansätze, die je doppelt vermessen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test,  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant erachtet.

Die gemittelten Aktivitäten der Leberhomogenate unterschieden sich statistisch signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen der *c*- und *d*-Mäuse ( $5,4 \pm 0,8$  vs.  $12,6 \pm 3,3$  nmol Benzamidin/(min x mg Protein)) sowie *c*- und *cd*-Mäuse ( $5,4 \pm 0,8$  vs.  $9,2 \pm 2,8$  nmol Benzamidin/(min x mg Protein)) und der *d*-Mäuse verglichen mit den *cd*-Mäusen ( $12,6 \pm 3,3$  vs.  $9,2 \pm 2,8$  nmol Benzamidin/(min x mg Protein)) mit  $p < 0,05$ .

#### 3.3.3.4 Blutglukosekonzentrationen des STZ-Mausmodells

Die Mäuse der *d*-Gruppe wiesen Blutglukosewerte  $> 20$  mM, die Mäuse der *c*- und *cd*-Gruppen  $< 11$  mM auf.

## 3.4 Diskussion

### 3.4.1 Studien zur Induktion der mARC-Proteine in Zellkulturen

In Charakterisierungsstudien mit Nierenzelllinien erwiesen sich HMCL und HEK-293 als geeignete Modelle, um die Induktion von mARC durch z.B. Glukose zu untersuchen. Es wurden Nierenzellen ausgewählt, da aus vorherigen Studien (Krompholz *et al.*, 2012) bekannt war, dass die Niere große Mengen des mARC-Proteins enthält und ferner die Gruppe von Dr. Afshan Malik bereits mit Induktionsstudien zu mARC in Nierenzelllinien erfolgreich war (Malik *et al.*, 2007). Darüber hinaus haben die gewählten Zelllinien, anders als viele andere permanente Zellkulturen, ihren Ursprung nicht in Krebsgewebe und weisen somit voraussichtlich keine der pathophysiologischen Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels auf, wie es bei vielen Krebszellen der Fall ist. Als Beispiel ist hier neben vielen weiteren Störungen der Warburg-Effekt zu nennen, bei welchem Krebszellen vermehrt Energie durch Glykolyse gefolgt von cytosolischer Milchsäuregärung statt Glykolyse gefolgt von mitochondrialer Pyruvat-Oxidation gewinnen (Boland *et al.*, 2013) und somit nicht die mitochondriale Stoffwechselaktivität gesunder Gewebe aufweisen. Beide Zelllinien waren einfach zu kultivieren und wiesen eine hinreichend schnelle Wachstumszeit auf. Ebenso waren nachweisbare Mengen an mARC1 und mARC2 sowie eine hinreichende *N*-reduktive Aktivität vorhanden. Die Zelllinie RC-124 wurde nicht in die Studien inkludiert, da sie auf Grund von langsamen Wachstumszeiten nicht optimal geeignet war.

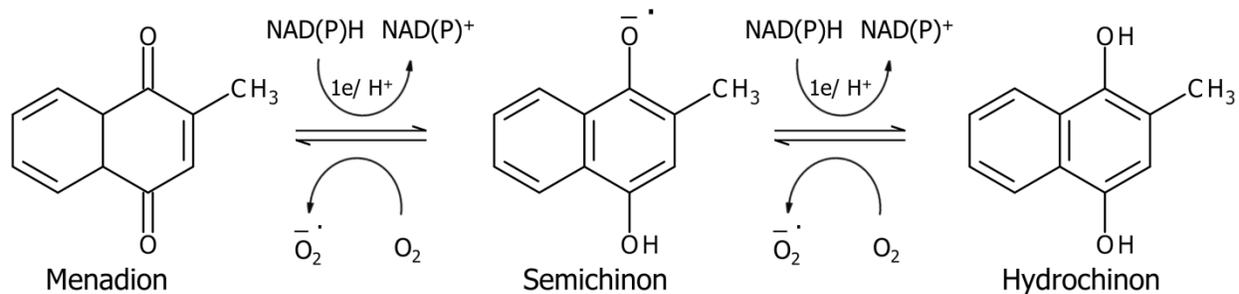
Für beide Zelllinien konnte eine Zunahme der *N*-reduktiven Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem sowie ein gesteigertes Vorkommen an mARC1 durch erhöhte Glukosekonzentrationen im Zellkulturmedium gezeigt werden. Somit konnte die von Malik *et al.* (Malik *et al.*, 2007) beschriebene Induktion der mARC-Expression auf Protein- und Aktivitätsebene bestätigt werden. Glukose ist ein zentrales Molekül im

Energiestoffwechsel und in der Lage, die Expression verschiedener Gene und als Folge die resultierenden Proteine zu regulieren. Zum einen findet eine Regulation über Glukose direkt in der Gegenwart von Glukose-phosphorylierenden Proteinen statt, da Glukose-6-Phosphat als Signalmolekül in diesem Zusammenhang mit den Genen der Lipogenese aktiv ist (Meugnier *et al.*, 2007). Zum anderen gibt es indirekte Regulationen durch hormonelle Modifikation mittels Glukose-abhängiger Insulin- oder Glucagon-Freisetzung (Vaulont *et al.*, 2000). Dabei reguliert Glukose nicht nur die Proteine und Enzyme des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels, sondern auch Proteine des globalen Zellstoffwechsels, wobei die detaillierten Mechanismen und verantwortlichen Transkriptionsfaktoren noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Meugnier *et al.*, 2007). Somit ist die Tatsache, dass das mARC-Protein durch Glukose in Zellkulturen reguliert wird, nicht notwendigerweise auch ein Hinweis, dass das Protein tatsächlich direkt oder indirekt an der Metabolisierung von Energieträgern beteiligt ist. Die gewählten Bedingungen von 4,5 g/l Glukose im Zellkulturmedium sind verglichen mit *in vivo* Bedingungen sehr hoch und ahmen so die Bedingungen einer extremen Hyperglykämie nach (Hyperglykämie beim Menschen 120-160 mg/dl Glukose, Kulturbedingung 450 mg/dl Glukose). Für solche Kulturbedingungen ist unter anderem bekannt, dass sie in Zellkulturen, ähnlich wie Hyperglykämien *in vivo*, erhöhten oxidativen Stress auslösen (Catherwood *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 1988). Hyperglykämie-assoziiierter oxidativer Stress wird außerdem mit den pathophysiologischen Veränderungen und Komplikationen von Diabetes Typ 1 und Typ 2 in Verbindung gebracht (Brownlee, 2005). Als eine Art Adaptionsmechanismus werden unter diesen Bedingungen *in vitro* viele antioxidative Proteine wie Glutathionperoxidase, Catalase und Superoxiddismutase hochreguliert (Meugnier *et al.*, 2007). Es wäre daher auch denkbar, dass das mARC-Protein mit seinen grundsätzlich reduktiven Eigenschaften als Adaption an oxidativen Stress und nicht durch Glukose direkt induziert wird.

Folglich wurde im Anschluss untersucht, ob die gefundene Induktion des mARC-Proteins durch Glukose direkt oder durch den resultierenden oxidativen Stress verursacht wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Induktion der mARC-Proteine und die daraus resultierende gesteigerte *N*-reduktive Aktivität durch erhöhte Glukosekonzentrationen dosisabhängig durch den Zusatz von NAC antagonisieren lässt. NAC ist ein Vorläufermolekül für Glutathion (GSH) und in der Lage, die Spiegel von GSH in Zellen in Kulturen zu erhöhen (Bajt *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009). GSH,  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, ist ein Tripeptid, welches antioxidative Effekte aufweist. Es ist in der Lage, katalysiert durch die Glutathionperoxidase, reaktive Spezies zu entgiften und bildet dabei aus zwei Molekülen Glutathion ein Dimer, Glutathion-Disulfid (GSSG). Das Verhältnis von GSSG und GSH ist anhängig vom oxidativen Milieu oder Stress der Zelle. Mit Hilfe der Glutathion-Reduktase kann GSSG wieder zu GSH reduziert werden. Außerdem dient Glutathion als Cysteinreserve und ist an Phase II-Reaktionen des Xenobiotikametabolismus durch die Glutathion-S-Transferasen beteiligt (Berg *et al.*, 2013). Es ist bekannt, dass einige Gene und resultierende Proteine durch das Verhältnis von GSSG/GSH reguliert werden, als Beispiele sind die Aktivität der humanen Insulin-Rezeptor-Kinase oder der Nfk-B Transkriptionsfaktor zu nennen (Dröge, 2002). Daher ist die gefundene Antagonisierbarkeit der Induktion von mARC durch Glukose mittels NAC noch kein eindeutiger Hinweis, dass es sich um eine Induktion durch oxidativen Stress handelt. Es wäre auch möglich, dass das mARC-Enzymsystem durch das veränderte Gleichgewicht von GSSG/GSH reguliert wird. Im Falle der Kulturen in Hochglukose aber ohne NAC-Zusatz würde dann durch die Autoxidation von Glukose (Hunt *et al.*, 1988)  $H_2O_2$  entstehen, welches mittels Glutathion-Peroxidase unter GSH-Verbrauch entgiftet wird und so das GSSG/GSH-Gleichgewicht in Richtung GSSG verschiebt.

Es wurden daher Studien zur Induzierbarkeit des mARC-Proteins und seiner Partner durch oxidativen Stress durchgeführt. Durch den Zusatz von Menadion im Zellkulturmedium wird ein oxidatives Milieu erzeugt. Hierbei wird Menadion durch z.B.

mitochondriale NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) oder microsomale NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase mit der Übertragung eines Elektrons zu einem instabilen Semichinonradikal metabolisiert, welches zum stabilen Hydrochinon weiter reagiert. Bei der Rückreaktion dieses Prozesses in Gegenwart von Sauerstoff werden Superoxidanionen freigesetzt (Criddle *et al.*, 2006). Dadurch entstehen kontinuierlich *in situ* oxidative Spezies, die die Zellen stressen (Abbildung 41).



**Abbildung 41. Entstehung von Superoxidanionen durch Menadion-Zusatz in Zellkulturen.**

Menadion wird enzymatisch durch z.B. die microsomale NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase oder die mitochondriale NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase durch Übertragung von einem Elektron in das instabile Semichinon bzw. Hydrochinon metabolisiert. Bei der Rückreaktion in Gegenwart von Sauerstoff entstehen Superoxidanionen, die weiter zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren können.

In den durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass das mARC-haltige Enzymsystem nicht durch erhöhten oxidativen Stress in der Zellkultur induziert wird. Dennoch ließ sich ein Rückgang der *N*-reduktiven Aktivität bei gleichbleibendem Proteinvorkommen für mARC1 und mARC2 feststellen. Untersuchungen mit dem rekombinant hergestellten, *N*-reduktiven System zeigten eine Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die sich allerdings nicht durch den Zusatz von Catalase und die daraus resultierende Entfernung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verhindern ließ. Dies zeugt davon, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entweder die Enzyme und/oder deren prosthetische Gruppen zerstört oder fest an das katalytische Zentrum des mARC-Proteins oder in dessen Nähe bindet, so dass die Reduktion des Substrates Benzamidoxim nicht stattfinden kann. Dies ist z.B. für ein anderes Molybdoenzym, die bakterielle Aldehyd-Oxidoreduktase beschrieben, die strukturell der humanen Xanthinoxidase und Aldehydoxidase ähnlich ist. Bei diesem

Enzym ist  $\text{H}_2\text{O}_2$  fähig, an das aktive Zentrum des Enzyms zu binden und den Moco und somit das Enzym zu inaktivieren (Santos-Silva, 2013). Aus internen Daten des Arbeitskreises (Sandbaumhüter, 2012) ist allerdings bekannt, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht als Substrat des mARC-Enzymsystems fungiert. In Biotransformationsversuchen mit dem rekonstituierten, rekombinant hergestellten System zeigten Ansätze ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  aber mit Zusatz von Catalase hingegen eine gesteigerte Aktivität. Dies zeugt davon, dass die Entfernung von genuin im Inkubationspuffer vorkommenden  $\text{H}_2\text{O}_2$  die *N*-reduktive Aktivität begünstigt. Das im Inkubationsansatz vorkommende  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht vermutlich durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionen durch das reduzierte FAD in CYB5R (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Folglich ist es wahrscheinlich, dass der Rückgang der *N*-reduktiven Aktivität in Zellkulturen mit Menadion-Zusatz durch eine Hemmung des Enzymsystems durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  begründet ist. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass der Rückgang der Aktivität seine Gründe in einer grundsätzlichen Störung der Zellen und ihres Stoffwechsels durch oxidativen Stress hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das mARC-Protein und seine *N*-reduktive Aktivität durch Glukose in Zellkulturen induzierbar ist. Diese Induktion kann durch eine Verschiebung des GSSG/GSH-Gleichgewicht in Richtung GSH durch NAC verhindert werden. Oxidativer Stress hingegen induziert das Enzymsystem nicht, wenngleich  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Lage ist, die Aktivität des Systems zu hemmen.

Die Induzierbarkeit durch Glukose ist ein Hinweis, dass das mARC-Enzymsystem eine direkte oder indirekte Verknüpfung zum Energiestoffwechsel aufweist. Da die Induktion nicht über oxidativen Stress erfolgt, scheint die Regulation durch das GSSG/GSH-Gleichgewicht ein weiterer, noch nicht vollständig verstandener Mechanismus zu sein.

### 3.4.2 Veränderungen des mARC-Proteins im STZ-Mausmodell

Um zu untersuchen, welche Veränderungen in Bezug auf das mARC-Protein bei Diabetes Typ 1 auftreten, wurde das diabetische STZ-Mausmodell charakterisiert.

Die Expression und das Proteinvorkommen für mARC2 sowie die *N*-reduktive Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem wurden in Leber- und Nierengewebe von gesunden Kontrolltieren, diabetischen Tieren und Tieren, bei welchen der STZ-induzierte Diabetes Typ 1 durch Transplantation von Inselzellen behandelt wurde, untersucht.

Die Expression und Proteinmengen von mARC2 stiegen in beiden Geweben in der Gruppe der an Diabetes erkrankten Tiere an. Die Blutglukose war in der Gruppe der diabetischen Mäuse ebenfalls erhöht. Im Falle der Leberproben war eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle auch in der Gruppe der behandelten Tiere erkennbar (*cd*-Mäuse), allerdings nicht im selben Maße wie bei der Diabetes-Gruppe. Möglicherweise könnte dies darin begründet sein, dass eine Behandlung der zuvor mittels STZ-Injektion behandelten Tiere mit Inselzellen nicht zur vollständigen Heilung der Tiere führte. Die Aktivität der Leberhomogenate war ebenfalls in der Diabetes-Gruppe erhöht, in der Gruppe der behandelten Tiere im Vergleich dazu reduziert. Außerdem zeigte sich eine gute Korrelation der Aktivität der einzelnen Individuen mit den jeweiligen Proteinmengen für mARC2.

Die *N*-reduktive Aktivität war im Falle der Nierenhomogenate für die diabetischen Tiere deutlich erhöht, allerdings war dies auch für die behandelten Tiere der Fall, obwohl keine erhöhte Proteinmenge für mARC2 nachzuweisen war. Da keine Informationen über das mARC1-Protein bestehen und weder ein Antikörper gegen murines mARC1 verfügbar war, noch Expressionsdaten gemessen wurden, wäre es denkbar, dass in den Nierengewebe der behandelten Gruppe gesteigerte Proteinmengen für mARC1

vorhanden waren, die die erhöhte *N*-reduktive Aktivität verursachen. Des Weiteren wäre auch die Induktion eines bisher nicht bekannten murinen Enzyms in der Niere denkbar, welches in der Lage ist, Benzamidoxim zu reduzieren. Warum sich Lebergewebe und Nierengewebe diesbezüglich unterschiedlich verhalten, lässt sich nicht beantworten. Da die Gewebe aber grundsätzlich in ihrer Funktion, ihrem Aufbau und ihrer Regenerationsfähigkeit sehr unterschiedlich sind, ist eine unterschiedliche Adaption an die Situation mit Diabetes Typ 1 und dessen Heilung durch Inselzelltransplantation denkbar.

Nichtsdestotrotz konnte folglich für das STZ-Mausmodell gezeigt werden, dass ein Zusammenhang von mARC und *Diabetes mellitus* besteht. Diabetes Typ 1 führt bei Mäusen zu einem gesteigerten Vorkommen von mARC2 und einer gesteigerten *N*-reduktiven Aktivität.

Inwieweit die Veränderungen des Vorkommens des mARC-Proteins und der *N*-reduktiven Aktivität durch den Insulinmangel bei Diabetes Typ 1 direkt begründet sind, oder durch aus dem Insulinmangel resultierenden Stoffwechsellageisungen ausgelöst werden, ist bisher nicht geklärt. Hyperglykämie als Folge verminderter Glukoseaufnahme in die Zellen und gesteigerter Gluconeogenese, gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe und vermehrte freie Fettsäuren im Plasma, sowie vermehrter Proteinabbau im Muskel und gesteigerter oxidativer Stress sind die Folgen des Insulinmangels (Mutschler, 2001) und könnten direkt oder indirekt, einzeln oder in Kombination die Veränderungen des mARC-Proteins auslösen. Es wäre auch denkbar, dass die Veränderungen bezüglich des mARC-Proteins als Adaptionmechanismus des Körpers an den veränderten Energiestoffwechsel zu verstehen sind. Da die endogene Funktion des mARC-Proteins weiterhin unbekannt ist, ist diese Frage bisher nicht zu beantworten.

Neben der Induzierbarkeit des Enzyms durch Glukose (3.4.1) in Zellkulturen ist dies ein weiterer Hinweis auf eine Verknüpfung des Enzymsystems mit dem Kohlenhydrat- und/oder Energiestoffwechsel.

### **3.5 Zusammenfassung**

In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass das *N*-reduktive System mit dem mARC-Protein durch Glukose induziert wird. Eine Induktion durch oxidativen Stress, vermittelt durch Menadion, konnte nicht gezeigt werden, auch wenn das Enzymsystem durch Veränderungen des GSSG/GSH-Gleichgewichts bei Induktion mit Glukose möglicherweise reguliert wird.

Im diabetischen STZ-Mausmodell konnte ein Zusammenhang von mARC2 und Diabetes mellitus gezeigt werden. Diabetes Typ 1 führt zu einem gesteigerten Vorkommen von mARC2 und gesteigerter *N*-reduktiver Aktivität in Leber und Niere.

Folglich ist eine Verknüpfung des mARC-haltigen Enzymsystems mit dem Energiestoffwechsel wahrscheinlich, auch wenn die genauen Zusammenhänge und die endogene Funktion des Proteins weiterhin unklar sind.



## **4 Untersuchungen zur Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems am Energiestoffwechsel in verschiedenen Mausmodellen**

### **4.1 Thema und Zielsetzung**

In Kapitel 3 wurden Veränderungen in Bezug auf das mARC-haltige Enzymsystem bei Diabetes Typ 1 im Tiermodell festgestellt. Außerdem konnte die Induktion des mARC-Proteins durch Glukose in Zellkulturen weiter bestätigt werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine Verknüpfung des mARC-haltigen Enzymsystems mit dem Energiestoffwechsel im Bereich des Kohlenhydratmetabolismus hin. Aber auch eine Verknüpfung mit dem Lipidstoffwechsel ist möglich und Hinweise darauf wurden ebenfalls bereits beschrieben. So fanden Telsovich *et al.* (Teslovich *et al.*, 2010) einen SNP im mARC1-Locus, der mit veränderten Plasmakonzentrationen für Gesamtcholesterol und LDL-Cholesterol im Menschen einhergeht. Eine Co-Regulation des mARC-Proteins mit den Enzymen des Lipidstoffwechsel wurde außerdem von der Gruppe um Magnus Ingelman-Sundberg, Stockholm in einem Tagungsbeitrag beschrieben (Neve *et al.*, 2008). Da Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel eng miteinander verzahnt sind, ist eine Verknüpfung von mARC mit beiden Bereichen des Energiestoffwechsels oder mit einer oder mehrerer Schnittstellen dieser Metabolismuswege ebenfalls denkbar.

Im Rahmen einer breitangelegten Studie wurden nun verschiedene Mausmodelle für Störungen des Energiestoffwechsels untersucht, um weitere Hinweise auf mögliche Zusammenhänge mit dem *N*-reduktiven System zu erlangen. Neben Kontroll-Tieren wurden Mäuse, die mit hochfetthaltiger Diät (60 % der Kalorien aus Fett vs. 10 % Kalorien aus Fett bei üblichem Futter, *high fat diet* HFD) gefüttert wurden, betrachtet

(dt/dt-Mäuse). Außerdem kamen zwei Mausmodelle mit einer Störung im Leptin-Signalweg zum Einsatz, welche Symptome aufweisen, die dem metabolischen Syndrom im Menschen gleichen. Das ob/ob-Modell ist homozygot für eine Mutation im Leptin-Gen, das db/db-Modell für eine Mutation des Gens für den Leptin-Rezeptor. Das metabolische Profil der beiden letzten Mausmodelle ist weitestgehend identisch, Tiere beider Modelle sind fettleibig und weisen Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und erhöhte Konzentrationen an Plasmacholesterolemie auf. Die beiden Modelle unterscheiden sich im Wesentlichen dadurch, dass das ob/ob-Modell kein zirkulierendes Leptin im Körper aufweist, wohingegen das db/db-Modell hohe Konzentrationen an zirkulierendem Leptin aufweist, die proportional zum Grad der Fettleibigkeit sind (Kennedy *et al.*, 2010). Versuchsmäuse, die mit HFD gefüttert werden, weisen ebenfalls die Symptome des metabolischen Syndroms wie Fettleibigkeit, Dyslipidämien und Insulinresistenz auf (Panchal *et al.*, 2011). Dennoch ist von unterschiedlichen Mechanismen der Körperfett- und Gewichtszunahme auszugehen, da ob/ob-Mäuse auch an Gewicht zunehmen, wenn sie mit Diäten gefüttert werden, die bei Wildtyp-Mäusen keine Gewichtszunahme auslösen (Herstellerangaben von The Jackson Laboratory, Sacramento, USA). Im Vergleich dazu nehmen die dt/dt-Mäuse nur aufgrund der geänderten Diät an Gewicht zu.

Es wurde untersucht, ob die beschriebenen Tiermodelle mit ihren Veränderungen in Bezug auf Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel auch Veränderungen in Bezug auf das mARC-haltige Enzymsystem zeigen. Diese Betrachtung wurde in zwei Altersgruppen von Mäusen, 16 Wochen und 48 Wochen, durchgeführt, um den möglichen Einfluss des Alters zu testen. Außerdem wurde der Einfluss von Nahrungsentzug über Nacht in den beschriebenen Mausmodellen auf das betrachtete Enzymsystem getestet, um mögliche Veränderungen als Folge kurzfristiger Änderungen der Energieversorgung zu detektieren.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Materialien und Geräte

Soweit nicht anders angegeben sind die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 beschrieben.

#### 4.2.1.1 Tierversuche

Die Haltung der Versuchstiere und Durchführung der Tierversuche erfolgte am Maria Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center / Institut für Onkologie, Abteilung onkologische Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Jerzy Ostrowski und Dr. Michal Mikula in Warschau, Polen. Der Tierversuch wurde durch das 2. lokale Ethik-Komitee für Tierversuche in Warschau genehmigt. Die im Rahmen dieser Studie von mir verwendeten Versuchstiere und daraus resultierende Proben wurden außerdem von der Arbeitsgruppe Ostrowski im Rahmen von Studien zum mitochondrialen Proteom und zu histologischen Veränderungen des Lebergewebes bei hepatischer Steatose verwendet (Hennig *et al.*, 2014; Nesteruk *et al.*, 2013). Die Versuchsmäuse wurden im Alter von fünf Wochen von der Firma The Jackson Laboratory (Sacramento, USA) bezogen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen ( $21 \pm 2$  °C,  $55 \pm 10$  % Luftfeuchtigkeit) in einem 12-Stunden Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten.

#### 4.2.1.2 Kontrolltiere

Als Kontrolltiere dienten 24 C57BL/6J Mäuse (kn/kn).

#### 4.2.1.3 ob/ob-Mausmodell

Als adipöses Mausmodell, welches das metabolische Syndrom im Menschen simuliert, dienten 24 B6.V-Lep<sup>ob</sup>/J-Mäuse, die homozygot für eine Mutation im Leptin-Gen sind.

Diese Tiere zeigen Fettleibigkeit (bis zu dreifach erhöhtes Gewicht im Vergleich zu Wildtypmäusen) und ein diabetesartiges Syndrom mit Hyperglykämie, Glukoseintoleranz und erhöhten Plasmainsulinwerten (Herstellerangaben von The Jackson Laboratory, Sacramento, USA) sowie Hypotension.

#### 4.2.1.4 db/db-Mausmodell

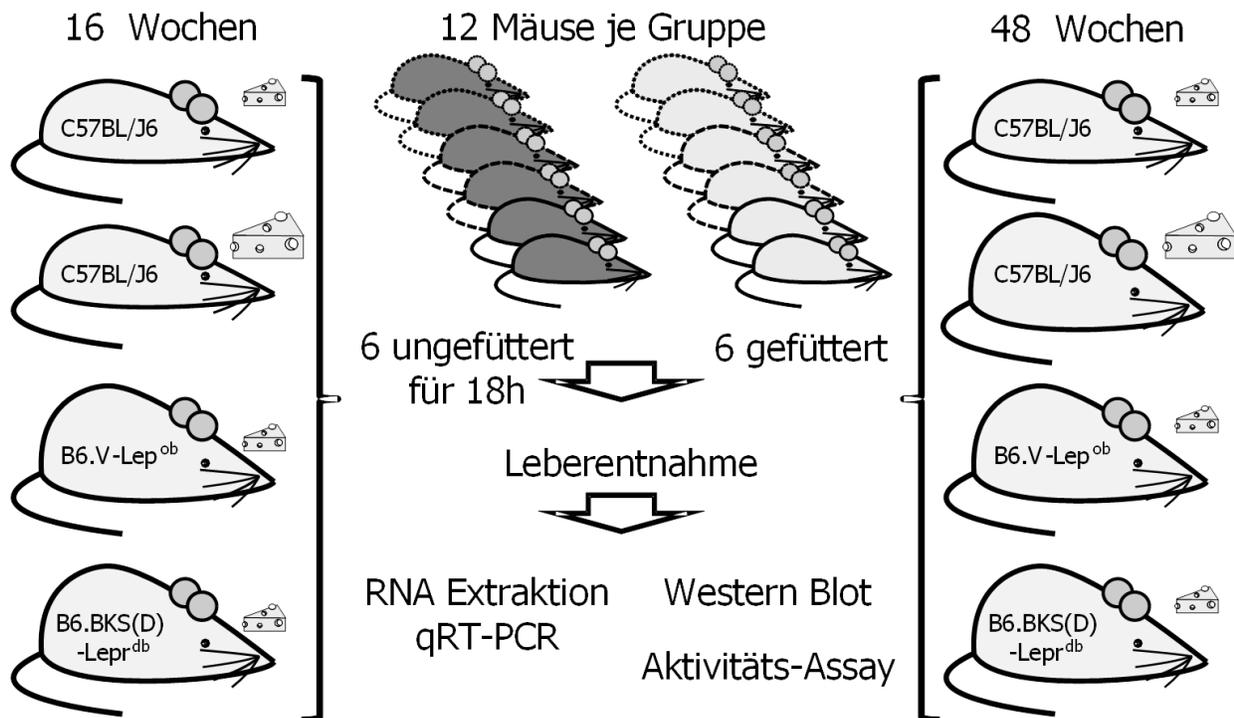
24 B6.BKS(D)-Lepr<sup>db</sup>/J-Mäuse, homozygote Tiere für eine Mutation des Leptinrezeptor-Gens, dienten als Modell für das metabolische Syndrom mit Diabetes Typ 2. Die Tiere werden mit zunehmendem Alter fettleibig und weisen außerdem erhöhte Plasmainsulinwerte und erhöhte Konzentrationen an Blutglukose auf. Die Tiere zeigen Anzeichen von Polydipsie und Polyurie. Allerdings zeigte sich, dass keines der Tiere im Laufe der Studie tatsächlich *Diabetes mellitus* entwickelte (Persönliche Korrespondenz mit Dr. Michal Mikula, Nesteruk *et al.*, 2013). Das Modell kann daher ebenfalls eher als adipöses Modell angesehen werden und modelliert somit Vorbedingungen der Entwicklung eines Diabetes Typ 2. Das Modell unterscheidet sich vom ob/ob-Modell dadurch, dass db/db-Mäuse hohe Konzentrationen an zirkulierendem Leptin aufweisen, wohingegen im ob/ob-Modell kein zirkulierendes Leptin vorhanden ist.

#### 4.2.1.5 dt/dt-Mausmodell

Um den Einfluss der Nahrungsbestandteile zu testen, wurden 24 C57BL/6J-Mäuse mit HFD gefüttert, bei welcher 60 % der Kalorien aus Fett entstammen (26,2 % Proteine, 26,3 % Kohlenhydrate, 34,9 % Fett, DI2492; Research Diets, New Brunswick, USA). Die Tiere entwickeln als Folge einen adipösen Habitus sowie weitere Symptome, die dem metabolischen Syndrom im Menschen gleichen, wie erhöhten Blutdruck, Insulinresistenz, Dyslipidämien und veränderte Glukosetoleranz (Panchal *et al.*, 2011).

#### 4.2.1.6 Versuchsablauf

Im Anschluss an die Lieferung folgte für alle Tiere eine einwöchige Adaptionsphase. Alle Mäuse mit Ausnahme der dt/dt-Gruppe erhielten während des gesamten Experiments Futter, welches zu 19,2 % aus Proteinen, 67,3 % aus Kohlenhydraten und 4,3 % aus Fett bestand und somit 10 % der Kalorien aus Fett bereit stellte (DI2450B, Research Diets, New Brunswick, USA). Der Versuch begann für alle Tiere im Alter von sechs Wochen, für je 12 Tiere der jeweiligen Gruppe endete der Versuchs im Alter von 16 Wochen, für die übrigen Versuchstiere lag der Versuchsendpunkt bei einem Alter von 48 Wochen. Um den Einfluss von Nahrungskarenz auf das mARC-haltige Enzymsystem zu überprüfen, wurden alle Gruppen in zwei Untergruppen unterteilt. Eine Gruppe erhielt Zugang zu Futter und Wasser bis zum Versuchsende, die zweite Gruppe erhielt ab 18 h vor Versuchsende kein Futter (Abbildung 42). Am Versuchsendpunkt wurden die Tiere getötet, die Lebern sowie weitere Gewebe für Studien der Arbeitsgruppe Ostrowski entnommen und bei -72 °C eingefroren. Die Lagerung der Gewebeproben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei - 80 °C.



**Abbildung 42. Schematischer Versuchsaufbau des Tierversuchs.**

Kleine Käsestücke symbolisieren Standardfutter, große Käsestücke hochfetthaltige Diät. C57BL/J6 = kn/kn-, B6.V-Lep<sup>ob</sup> = ob/ob-, B6.BKS(D)-Lepr<sup>db</sup> = db/db-Mäuse.

#### 4.2.2 RNA-Extraktion und Expressionsanalyse mittels qRT-PCR

Die Extraktion der RNA und die nachfolgende qRT-PCR wurden von Dr. Michal Mikula in Warschau durchgeführt.

Zur Extraktion der RNA wurde das RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden) bzw. das TRIzol Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit anschließendem DNase I-Verdau angewendet. Für die Synthese von cDNA mit Hilfe des Superscript III Kits (Life Technologies, Carlsbad, USA) wurden 1 µg gesamte RNA verwendet und die Synthese gemäß der Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Zur Quantifizierung der mRNA wurden das ABI 7900 HAT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA) sowie das Sensimix SYBR Kit (Bioline, Boston, USA) verwendet. Die Primer (Tabelle 4) wurden in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt.

Untersuchungen zur Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems am  
Energiestoffwechsel in verschiedenen Mausmodellen

---

Die Reaktionen wurden in 384-Well-Platten in 40 Zyklen mit je 15 s Denaturierung bei 95 °C und Hybridisierung für je eine Minute bei 60 °C durchgeführt. Der geometrische Mittelwert der Ct-Werte für Mucolin-1 (*Mcoln1*) und Hydroxymethylbilan-Synthase (*Hmbs*) mRNA wurden zur Normalisierung der Gen-Expressionen verwendet. Die mittlere normalisierte Expression wurde mit Hilfe des delta-delta Ct (ddCt)-Wertes berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., la Jolla, USA), es wurden je nach Bedarf t-Test und U-Test (paarweiser Vergleich) verwendet. *P*-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

**Tabelle 4: Verwendete Primer für die qRT-PCR.**

<b>Spezies</b>	<b>Gen</b>	<b>vorwärts (5'→3')</b>	<b>rückwärts (5'→3')</b>
Maus	<i>Hmbs</i>	AAGGGTTTTCCCGTTTGC	TCCCTGAAGGATGTGCCTA
Maus	<i>Mcoln1</i>	CCACCACGGACATAGGCATAC	GCTGGGTTACTCTGATGGGTC
Maus	<i>mARC1</i>	CATTTGCCGAGAACTTCTGGG	ATGCAGCTCAGTGGGTCAG
Maus	<i>mARC2</i>	GAACCTGTCGCGCACTTTG	GGATCTACCCGATCAAGTCCT
Maus	<i>CYB5B</i>	AGCTTTCAGTTGCATCAGCAC	GAGCCCTCCGTCACCTACTA
Maus	<i>CYB5R</i>	CAGGCCGCAACAGGATATCT	AACGACCACACCGTGTGCTA

#### **4.2.3 Herstellung von Leberhomogenaten zur weiteren Untersuchung**

Lebergewebeproben wurden wie in 3.2.4.3 beschrieben aufgearbeitet. Abweichend zu der in 3.2.4.3 beschriebenen Methode wurden je nach Größe der entsprechenden Gewebeprobe bis zu 1000 µl TPWL-Puffer eingesetzt. Der Proteingehalt der hergestellten Homogenate wurde wie in 2.2.2.3 beschrieben mit der BCA-Methode bestimmt.

#### **4.2.4 Western Blot-Analyse**

Eine Trennung der Homogenate per SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot wurde wie in 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Es wurden Proteinlösungen aufgetragen, in denen die Homogenate der Lebern aller Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe in gleichen Proteinmengen gepoolt wurden.

#### **4.2.5 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität**

Zur Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem wurde die Umsetzung des Modellsubstrates Benzamidoxim zu Benzamidin nach der in 3.2.4.6 beschriebenen Methode untersucht. Abweichend von der dort genannten Methode wurden 0,1 mg Leberhomogenat eingesetzt. Aufgrund der großen Probenanzahl wurden mehrere Experimente durchgeführt, bei denen die Verteilung der einzelnen Probe auf die verschiedenen Experimente mit Zufallszahlen bestimmt wurde. Um die Aktivitäten der nicht parallel inkubierten Ansätze vergleichen zu können, dienten Schweinelebermitochondrien als Referenzstandard. Diese wurden in jedem Experiment parallel inkubiert und die *N*-reduktive Aktivität der einzelnen Ansätze wurde als relativer Wert dieses Standards ausgedrückt. Außerdem wurden Inkubationen durchgeführt, in welchen die Aktivitäten verschiedener Proben direkt im selben Experiment verglichen wurden. Eine statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot (Version 11.0, Systat

Software, Inc., San Jose, USA), der t-Test wurde zur Prüfung auf statistische Signifikanz angewendet, p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

#### **4.2.6 Bestimmung von Lipidperoxiden als oxidativer Stressmarker mit der FOX-Methode**

Um mögliche Unterschiede in Bezug auf oxidativen Stress zwischen den Gruppen der Versuchstiere und einen möglichen Zusammenhang zum mARC-haltigen Enzymsystem zu untersuchen, wurde die FOX-Methode (*ferrous oxidation/xylene orange method*) (Hermes-Lima *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1992) im Arbeitskreis etabliert. Diese Methode dient zur Bestimmung von Lipidperoxiden z.B. in Gewebsextrakten und nutzt die Oxidation von zweiwertigem Eisen zu dreiwertigem Eisen durch diese Spezies. Dreiwertiges Eisen kann im Sauren mit dem Farbstoff Xylenolorange einen Komplex bilden und photometrisch vermessen werden. Eine Kalibrierung der Methode erfolgt mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol. Zur Extraktion und Bestimmung der Lipidperoxide als Marker für oxidativen Stress nach der FOX-Methode wurden die tiefgefrorenen Lebergewebeproben aufgetaut, auf Eis gelagert und fein zerhackt. 20 mg Gewebe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit 100 µl eiskaltem Methanol versetzt. Nach 30 min Schütteln bei 4 °C und 220 rpm folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 22.000 *g*. Die methanolischen Überstände wurde abgenommen und zur späteren Vermessung eingefroren. Zur Vermessung wurden die Proben 1:10 und 1:100 in Methanol verdünnt und in einer 96-Well-Platte mit 0,1 mM Xylenolorange, 0,25 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat in 25 mM Schwefelsäure bei pH 1,8 und einem Gesamtvolumen von 250 µl für 120 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Hierzu wurden die Platten mit einer Klebefolie verschlossen und zum Schutz vor Licht in Aluminiumfolie eingewickelt. Die Proben wurden dann bei 580 nm im Photometer vermessen. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung der jeweiligen Verdünnungen durchgeführt. Da aufgrund der großen Probenanzahl nicht alle Proben in einem Assay

## Untersuchungen zur Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems am Energiestoffwechsel in verschiedenen Mausmodellen

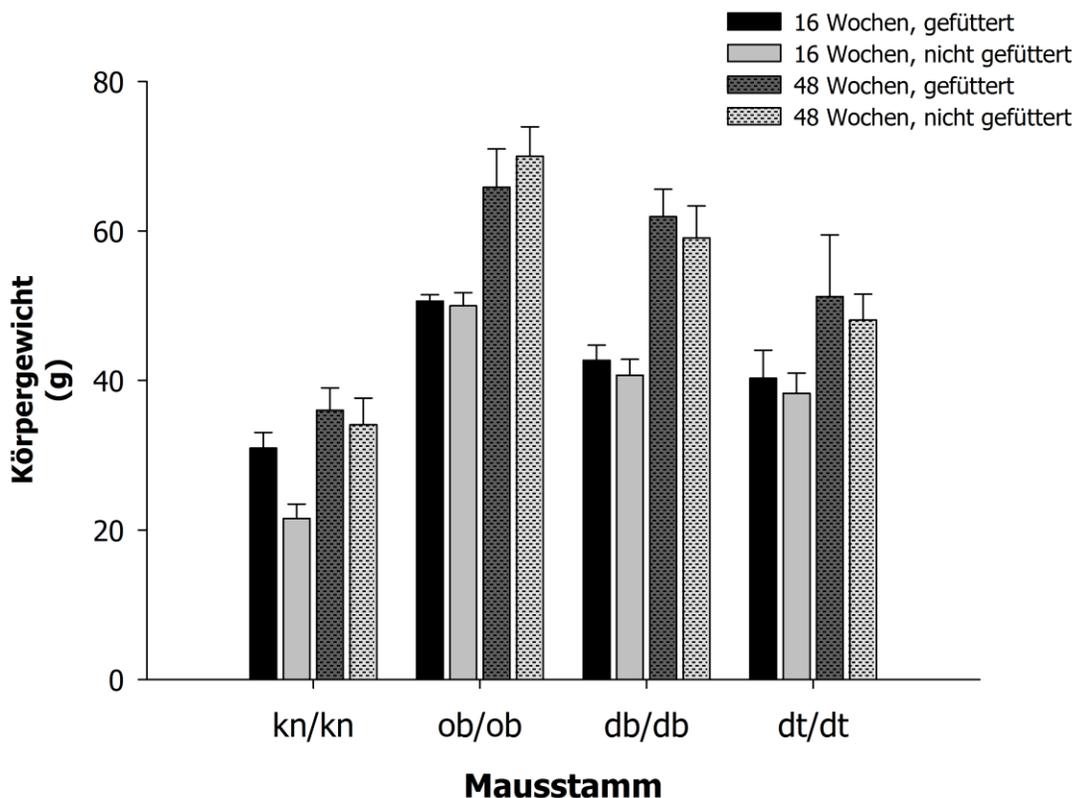
---

vermessen werden konnten, wurden insgesamt sechs 96-Well-Platten vermessen, die jeweils einzeln kalibriert wurden, wobei die Verteilung der Proben auf den jeweiligen Versuchsplatten mit Hilfe von Zufallszahlen vorgenommen wurde.

## **4.3 Ergebnisse**

### **4.3.1 Körpergewicht der Mäuse**

Das durchschnittliche Körpergewicht der Mäuse war im Vergleich zwischen den Stämmen für beide Altersgruppen in den ob/ob-, db/db- und dt/dt-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. In der Gruppe der 16 Wochen alten Tiere war der Einfluss des Fastens über Nacht auf das Körpergewicht in der Kontrollgruppe am höchsten. Die 48 Wochen alten Tiere wiesen im Vergleich zu den 16 Wochen alten Tieren ein erhöhtes Körpergewicht auf, im Vergleich zwischen den Stämmen war dieser Effekt bei der Kontrollgruppe am geringsten ausgeprägt (Abbildung 43).



**Abbildung 43. Durchschnittliches Körpergewicht der Mäuse zum Versuchsendpunkt.**

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus  $n = 4-6$  Versuchstieren. kn/kn = Kontrolltiere, ob/ob = Leptin-Gen-defiziente Tiere, db/db = Leptinrezeptor-defiziente Tiere, dt/dt = HFD gefütterte Tiere.

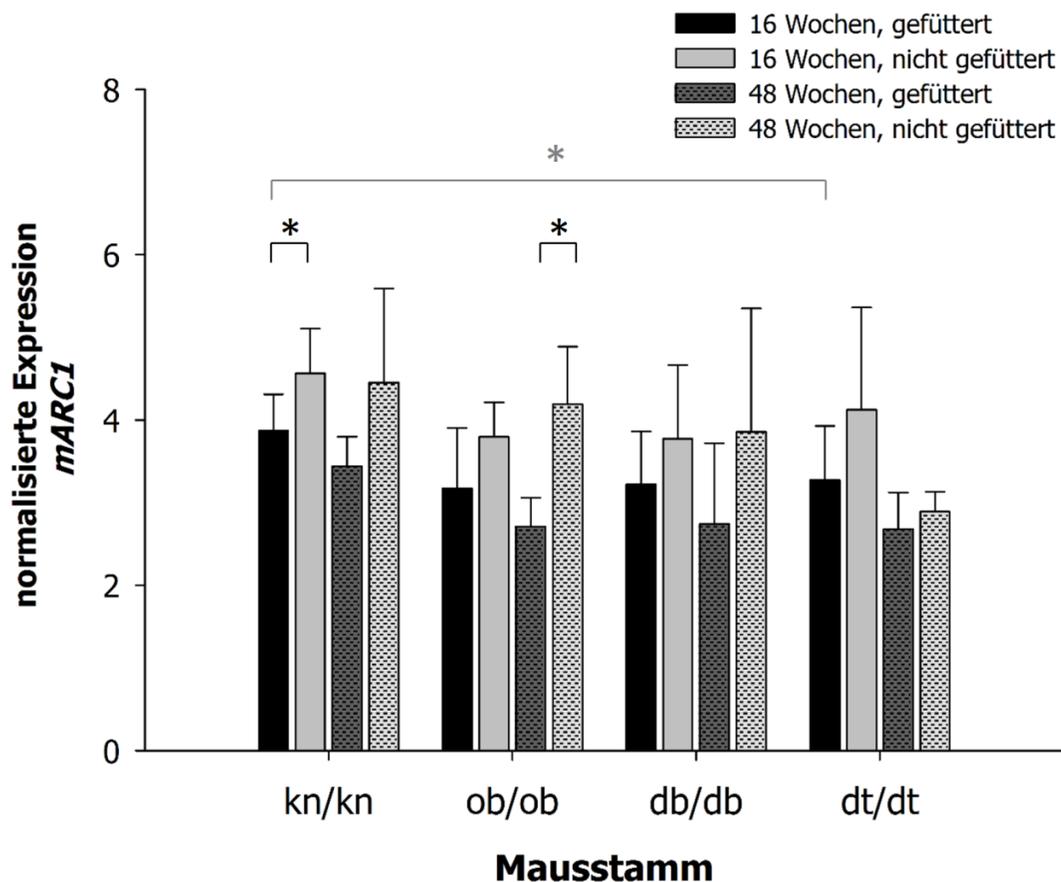
#### 4.3.2 Analyse der Expression von mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R

Die Expression von mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R wurde mittels qRT-PCR untersucht.

Für mARC1 ließ sich für alle Gruppen ein Trend von erhöhter Expression bei den nicht gefütterten Tieren im Vergleich zu den gefütterten Tieren erkennen. Allerdings war dies lediglich im Falle der 16 Wochen alten Kontrolltiere sowie der 48 Wochen alten ob/ob-Tiere statistisch signifikant. Außerdem war eine statistisch signifikant verminderte Expression bei den 16 Wochen alten dt/dt-Tieren im Vergleich zur Kontrolle messbar. Im

## Untersuchungen zur Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems am Energiestoffwechsel in verschiedenen Mausmodellen

Vergleich zwischen den Altersgruppen innerhalb der jeweiligen Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 44).

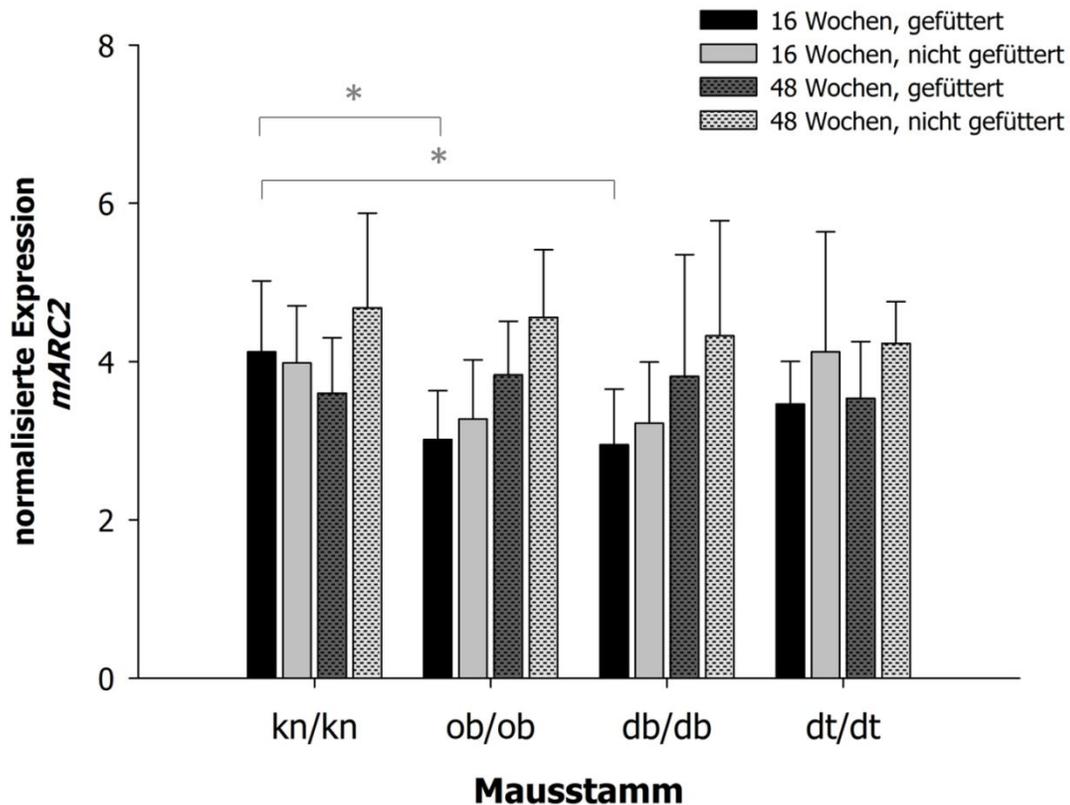


**Abbildung 44. Normalisierte Expression für mARC1.**

Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert und auf den geometrischen Mittelwert der Ct-Werte von *Mcoln1* und *Hbms* normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede (U-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, graue Klammern bezeichnen Unterschiede zwischen Mausmodellen, schwarze Klammern bezeichnen Unterschiede innerhalb von Modellen zwischen gefütterten und ungefütterten Tieren. kn/kn = Kontrolltiere, ob/ob = Leptin-Gen-defiziente Tiere, db/db = Leptinrezeptor-defiziente Tiere, dt/dt = HFD gefütterte Tiere.

Für mARC2 war der Trend von erhöhter Expression in der Gruppe der nicht gefütterten Tiere ebenfalls erkennbar, allerdings bei keiner der untersuchten Gruppen statistisch signifikant. Im Vergleich zwischen den Mausstämmen ließ sich eine statistisch signifikant reduzierte Expression in den ob/ob- und db/db-Tieren (16 Wochen) im Vergleich zur

Kontrolle feststellen. Im Vergleich zwischen den Altersgruppen innerhalb der jeweiligen Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 45).

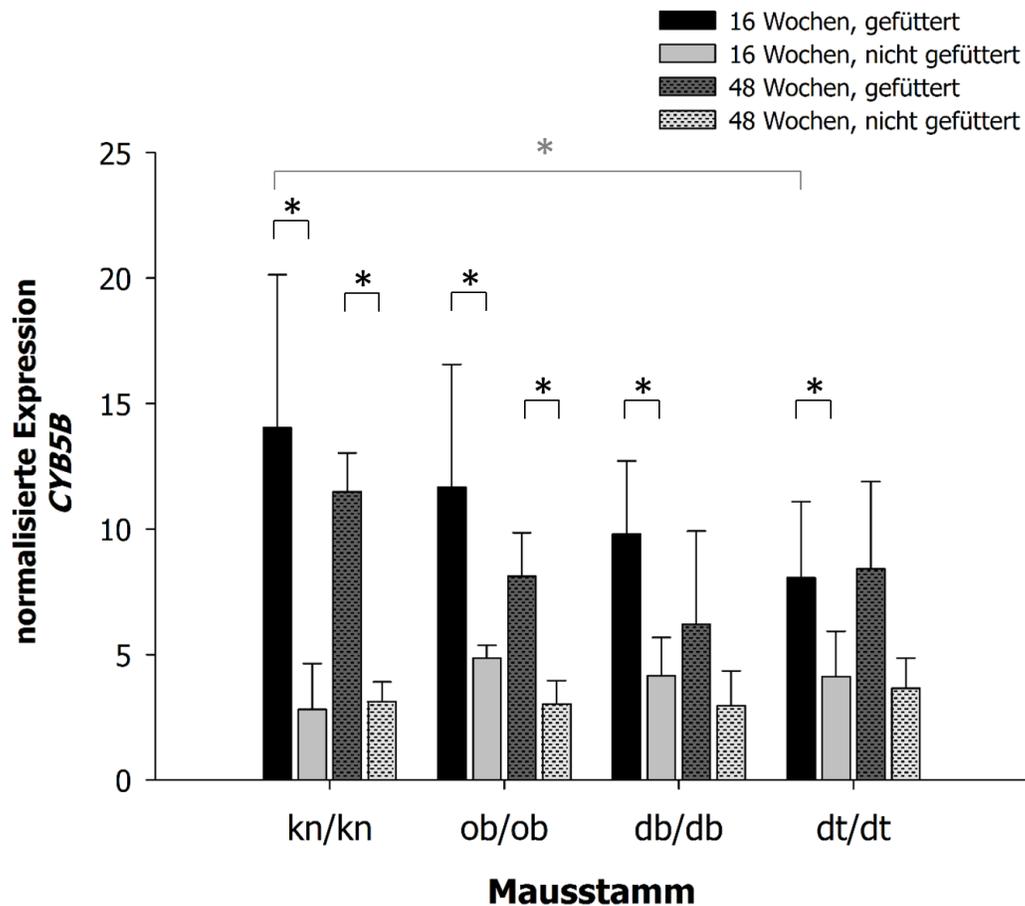


**Abbildung 45. Normalisierte Expression für mARC2.**

Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert und auf den geometrischen Mittelwert der Ct-Werte von *Mcoln1* und *Hbms* normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede (U-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet. kn/kn = Kontrolltiere, ob/ob = Leptin-Gen-defiziente Tiere, db/db = Leptinrezeptor-defiziente Tiere, dt/dt = HFD gefütterte Tiere.

Die Expression von CYB5B war in allen Gruppen für die nicht gefütterten Tiere im Vergleich zu den gefütterten Tieren reduziert. Allerdings war dies im Falle der 48 Wochen alten db/db- und dt/dt-Tiere nicht statistisch signifikant. Für die Tiere der 16 Wochen alten dt/dt-Gruppe zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Expression im Vergleich zur Kontrolle. Im Vergleich zwischen den Altersgruppen innerhalb der

jeweiligen Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 46).



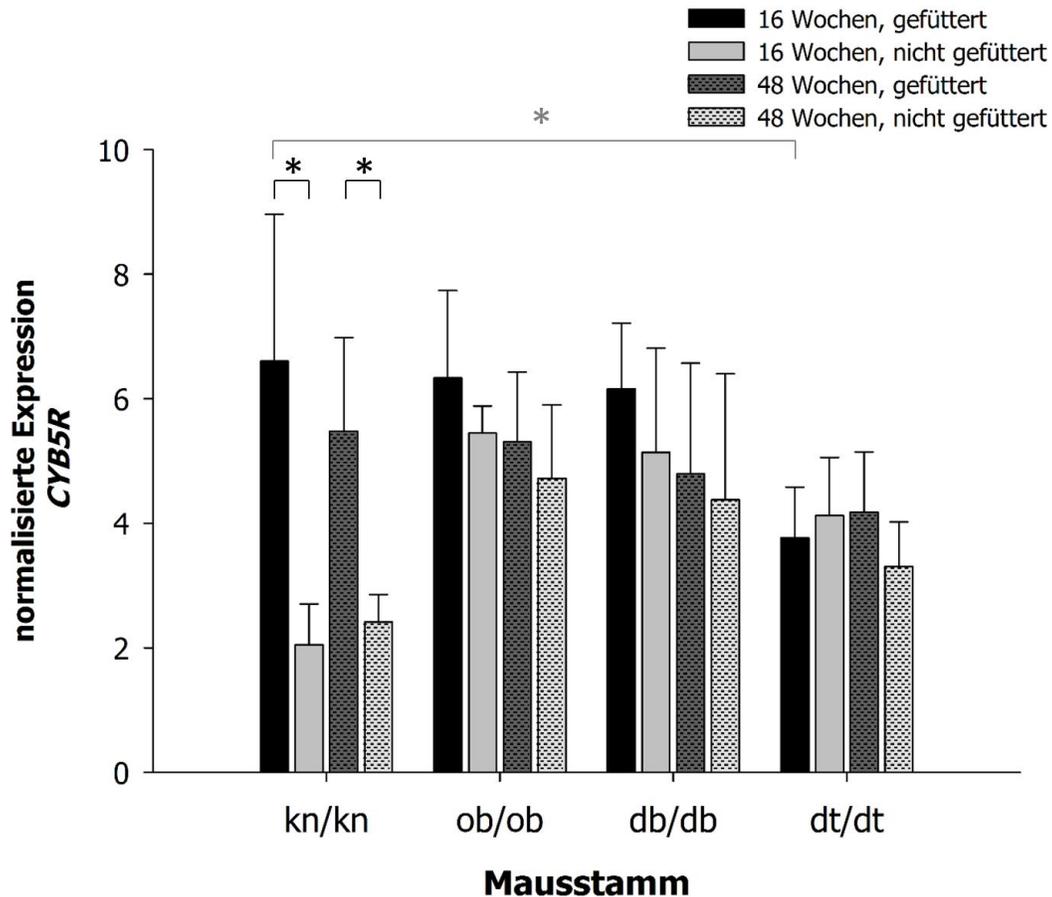
**Abbildung 46. Normalisierte Expression für CYB5B.**

Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert und auf den geometrischen Mittelwert der Ct-Werte von *Mcoln1* und *Hbms* normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede (U-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, graue Klammern bezeichnen Unterschiede zwischen Mausmodellen, schwarze Klammern bezeichnen Unterschiede innerhalb von Modellen zwischen gefütterten und ungefütterten Tieren. kn/kn = Kontrolltiere, ob/ob = Leptin-Gen-defiziente Tiere, db/db = Leptinrezeptor-defiziente Tiere, dt/dt = HFD gefütterte Tiere.

Auch CYB5R zeigte die Tendenz von reduzierter Expression in den Gruppen der nicht gefütterten Tiere im Vergleich zur jeweils gefütterten Gruppe, allerdings war dies lediglich im Falle der Kontrolltiere für beide Altersgruppen statistisch signifikant. Außerdem zeigte sich eine reduzierte Expression in den dt/dt-Tieren im Vergleich zur

## Untersuchungen zur Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems am Energiestoffwechsel in verschiedenen Mausmodellen

Kontrolle (16 Wochen). Im Vergleich zwischen den Altersgruppen innerhalb der jeweiligen Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 47).

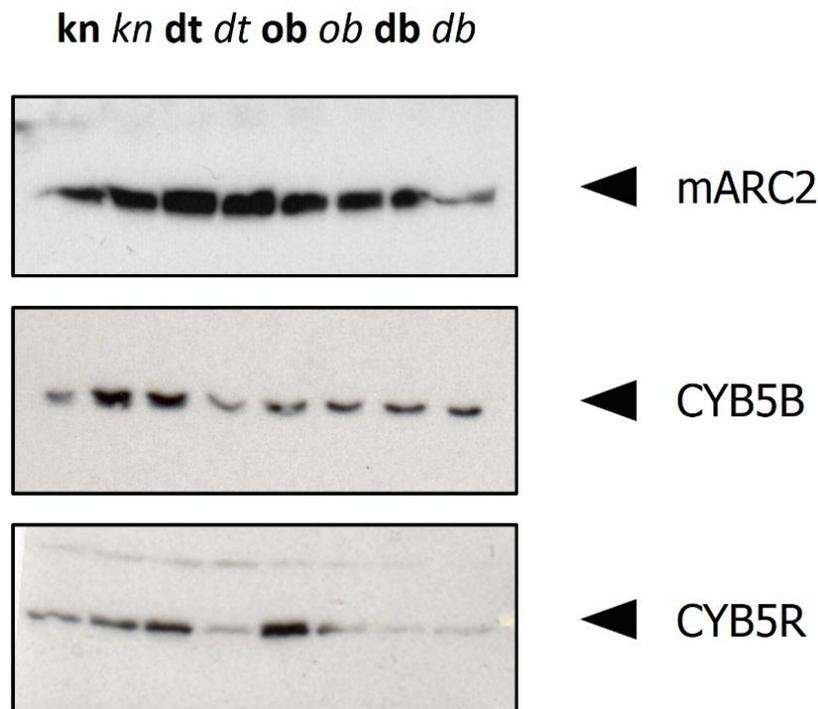


**Abbildung 47. Normalisierte Expression für CYB5R.**

Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert und auf den geometrischen Mittelwert der Ct-Werte von *Mcoln1* und *Hbms* normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede (U-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, graue Klammern bezeichnen Unterschiede zwischen Mausmodellen, schwarze Klammern bezeichnen Unterschiede innerhalb von Modellen zwischen gefütterten und ungefütterten Tieren. kn/kn = Kontrolltiere, ob/ob = Leptin-Gen-defiziente Tiere, db/db = Leptinrezeptor-defiziente Tiere, dt/dt = HFD gefütterte Tiere.

### **4.3.3 Western Blot-Analyse**

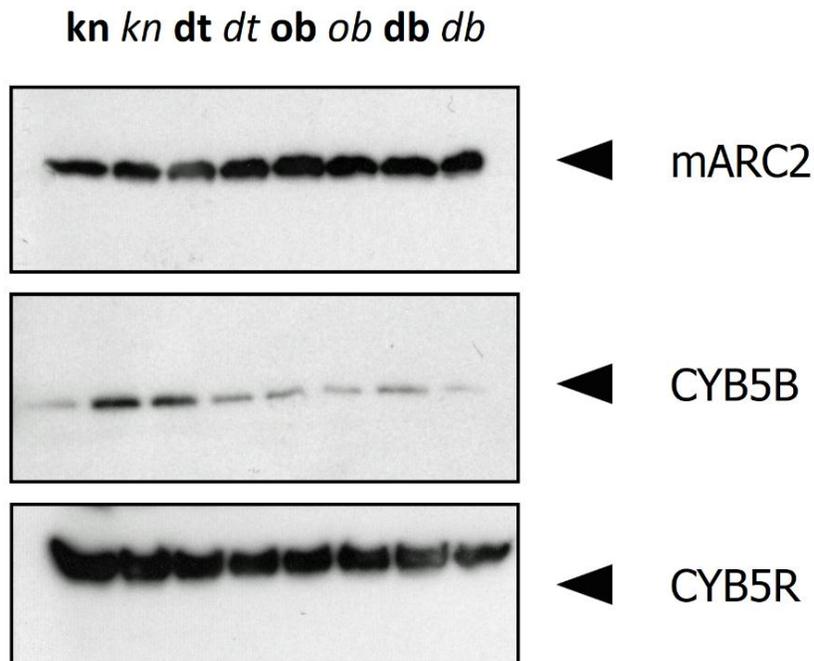
Um Unterschiede im Proteinvorkommen von CYB5B, CYB5R und mARC2 zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen mit den Homogenaten der Lebern der Versuchstiere durchgeführt. Das mARC1-Protein konnte in diesem Verfahren leider nicht weiter untersucht werden, da kein Antikörper gegen murines mARC1 verfügbar ist. Die Auswertung der Western Blot-Analyse mit gepoolten Homogenaten der einzelnen Versuchsgruppen der 16 Wochen alten Versuchsmäuse zeigte für mARC2 keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen (Abbildung 48). Lediglich für die dt/dt-Gruppen (gefüttert und ungefüttert) waren geringfügig erhöhte Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Die Gruppe der ungefütterten db/db-Mäuse zeigte außerdem eine verringerte Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle. Für CYB5B zeigte sich ebenfalls eine geringfügig höhere Proteinmenge in der dt/dt-Gruppe (gefüttert) im Vergleich zur Kontrolle. Für CYB5R zeigten sich geringfügig gesteigerte Proteinmengen der dt/dt- und ob/ob-Homogenate im gefütterten Zustand im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Keiner dieser Befunde spiegelte damit die Situation der Expressionsdaten wieder.



**Abbildung 48. Western Blot-Analyse der Mausleberhomogenate der 16 Wochen alten Tiere mit Antikörpern gegen mARC2, CYB5B und CYB5R.**

15 µg Protein wurden je Spur geladen. Die Auftragslösungen setzten sich aus gepoolten Proben von äquivalenten Proteinmengen aus den Leberhomogenaten von je sechs Versuchstieren zusammen. **Fette** Bezeichnungen stehen für die Proben gefütterter Tiere, *kursive* Beschriftungen für die entsprechenden ungefütterten Tiere. kn = Kontrolle, dt = dt/dt-Mäuse, ob = ob/ob-Mäuse, db = db/db-Mäuse. Verdünnung der eingesetzten primären Antikörper: 1:1.000, sekundärer anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) in der Verdünnung 1:10.000.

In der Gruppe der 48 Wochen alten Versuchstiere ergaben sich für die Proteinmengen von mARC2 in den gepoolten Homogenaten der Versuchsmäuse keine deutlichen Unterschiede (Abbildung 49). Für CYB5B war im Vergleich der gefütterten mit der ungefütterten Kontrolle für letztere eine erhöhte Menge an Protein detektierbar, im Falle der Expressionsdaten (4.3.2) trat der umgekehrte Effekt auf. Auch für die gefütterte dt/dt-Gruppe im Vergleich zur gefütterten Kontrolle war eine erhöhte Menge an CYB5B nachweisbar. Für CYB5R waren keine Unterschiede erkennbar.



**Abbildung 49. Western Blot-Analyse der Mausleberhomogenate der 48 Wochen alten Tiere mit Antikörpern gegen mARC2, CYB5B und CYB5R.**

15 µg Protein wurden je Spur geladen. Die Auftragslösungen setzten sich aus gepoolten Proben von äquivalenten Proteinmengen aus den Leberhomogenaten von je sechs Versuchstieren zusammen. **Fette** Bezeichnungen stehen für die Proben gefütterter Tiere, *kursive* Beschriftungen für die entsprechenden ungefütterten Tiere. kn = Kontrolle, dt = dt/dt-Mäuse, ob = ob/ob-Mäuse, db = db/db-Mäuse. Verdünnung der eingesetzten primären Antikörper: 1:1.000, sekundärer anti-Rabbit-IgG Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) in der Verdünnung 1:10.000.

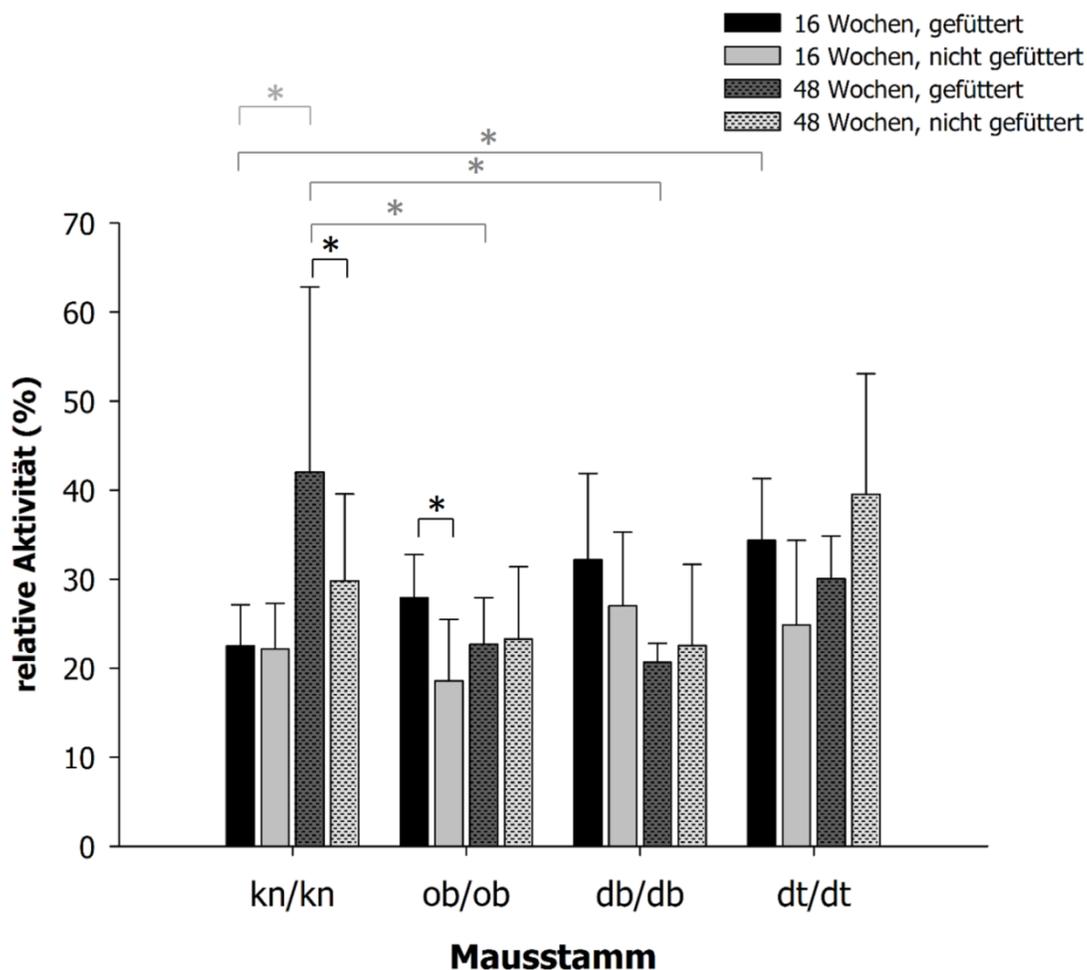
#### **4.3.4 *N*-reduktive Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem**

Die *N*-reduktive Aktivität als Markerreaktion für das mARC-haltige Enzymsystem wurde mittels der Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim bestimmt. Um die für murines Leberhomogenat optimalen Inkubationsbedingungen zu ermitteln, wurden abweichend von der in 4.2.5 beschriebenen Methode zeit- und substratabhängige Inkubationen durchgeführt. Die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin verlief über 60 Minuten linear und die Substratkonzentration von 3 mM lag im gesättigten Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik (Daten nicht gezeigt). Mit den so ermittelten Bedingungen

wurde die *N*-reduktive Aktivität der Leberhomogenate der Versuchstiere, wie in 4.2.5 beschrieben, bestimmt. Da aufgrund der großen Probenanzahl nicht alle Ansätze im selben Experiment verglichen werden konnten, wurden mehrere Inkubationen durchgeführt und die *N*-reduktive Aktivität auf den Referenzstandard Schweinelebermitochondrien bezogen. Der Variationskoeffizient der *N*-reduktiven Aktivität des Referenzstandards für die insgesamt neun durchgeführten Experimente betrug 13,6 %.

Für alle Gruppen der 16 Wochen alten Tiere und für die 48 Wochen alten Kontrolltiere zeigte sich ein Trend der verminderten *N*-reduktiven Aktivität im Leberhomogenat der nicht gefütterten Tiere im Vergleich zu den gefütterten Tieren der jeweiligen Gruppe (Abbildung 50). Allerdings war dies nur im Fall der 48-wöchigen Kontrolltiere sowie der 16-wöchigen ob/ob-Mäuse statistisch signifikant. Außerdem ergab die statistische Auswertung eine erhöhte *N*-reduktive Aktivität in der dt/dt-Gruppe (gefüttert, 16 Wochen) verglichen mit der entsprechenden gefütterten Kontrolle und eine reduzierte Aktivität sowohl für die ob/ob- und db/db-Gruppe (gefüttert, 48 Wochen) im Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle. Im Vergleich der jeweiligen Altersgruppen zeigte sich im Lebergewebe der 48 Wochen alten Kontrolltiere eine erhöhte *N*-reduktive Aktivität im Vergleich zum Gewebe der 16 Wochen alten Tiere.

## Untersuchungen zur Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems am Energiestoffwechsel in verschiedenen Mausmodellen

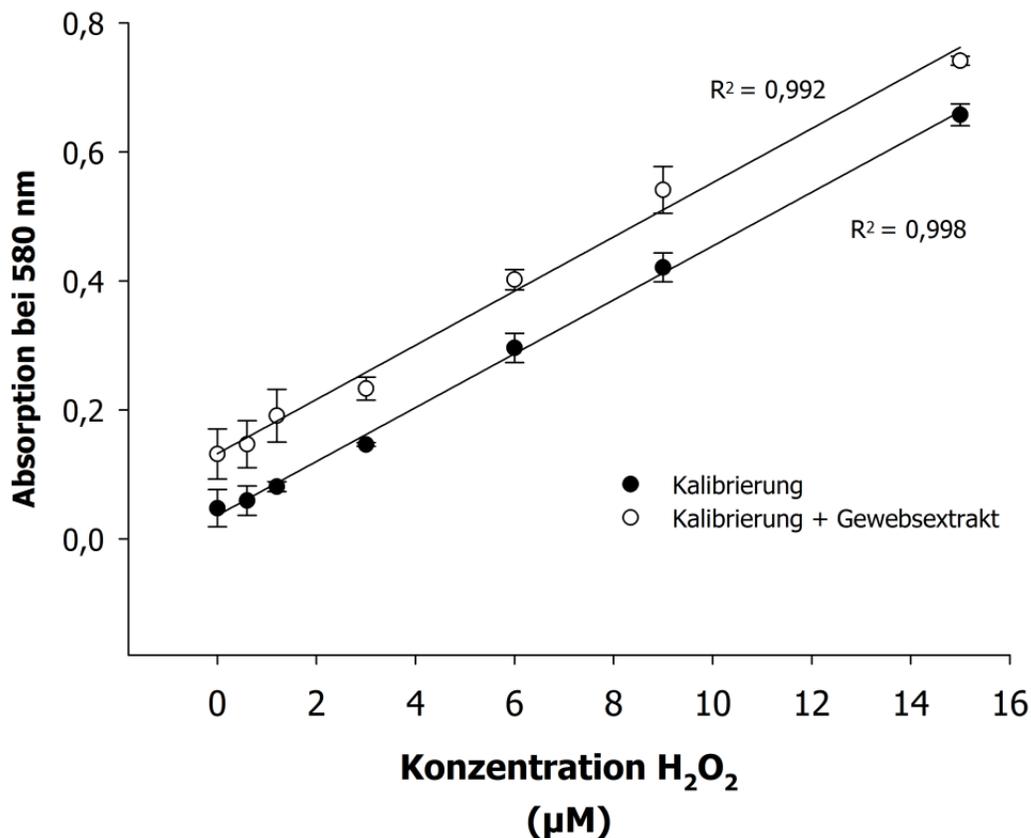


**Abbildung 50. N-reduktive Aktivität der Leberhomogenate der Versuchsmäuse.**

0,1 mg Leberhomogenat wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 20 min inkubiert. Nach Abstoppen mit einem äquivalenten Volumen Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und der resultierende Metabolit Benzamidin per HPLC quantifiziert. Die ermittelten Aktivitäten sind relativ als Prozent bezogen auf den Referenzstandard, Schweinelebermitochondrien, angegeben. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus 4–12 Inkubationsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, graue Klammern bezeichnen Unterschiede zwischen Mausmodellen, schwarze Klammern bezeichnen Unterschiede innerhalb von Modellen zwischen gefütterten und ungefütterten Tieren. kn/kn = Kontrolltiere, ob/ob = Leptin-Gen-defiziente Tiere, db/db = Leptinrezeptor-defiziente Tiere, dt/dt = HFD gefütterte Tiere.

#### **4.3.5 Lipidperoxide als Marker für oxidativen Stress**

Im Rahmen der Etablierung der FOX-Methode zeigte sich ein linearer Bereich der Kalibrierung von 0,6–10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Um den Einfluss von Matrixbestandteilen der Proben auf die Messung zu überprüfen, wurde eine Kalibrierung, sowie eine weitere Messreihe bestehend aus der Kalibrierung versetzt mit einem Gewebsextrakt, der analog zur Standardmethode aufgearbeitet wurde, vermessen. Die Kalibriergerade und die Gerade der mit Gewebsextrakt versetzten Messreihe zeigten einen parallelen Verlauf (Abbildung 51), eine Interferenz der Methode mit Matrixbestandteilen kann also ausgeschlossen werden. Eine stabile Einstellung der Färbung und die daraus resultierenden Absorption war nach 30 min erreicht, diese war für über sechs Stunden stabil. Das Absorptionsmaximum des entstehenden Komplexes aus Xylenorange und dreiwertigem Eisen wurde mit 580 nm bestimmt. Die Methodenpräzision einschließlich der Probenvorbereitung lag bei 2,3 %. Die Wiederholpräzision an verschiedenen Messtagen wurde mit 5,6 % bestimmt. Es konnte kein Einfluss von Einfrier- und Auftauzyklen auf die Proben festgestellt werden, auch unterschiedliche Perfusion der Gewebeproben vor der Aufarbeitung hatten keinen Einfluss auf das Messergebnis (Daten nicht gezeigt). Die so etablierte und wie in 4.2.6 durchgeführte Methode konnte für die Bestimmung der Lipidhydroperoxide in den Gewebeproben herangezogen werden. Die Ergebnisse wurde als  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Äquivalente (HPE) je mg feuchtes Gewebe angegeben (HPE/mg feuchtes Gewebe), da die Kalibrierung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte.

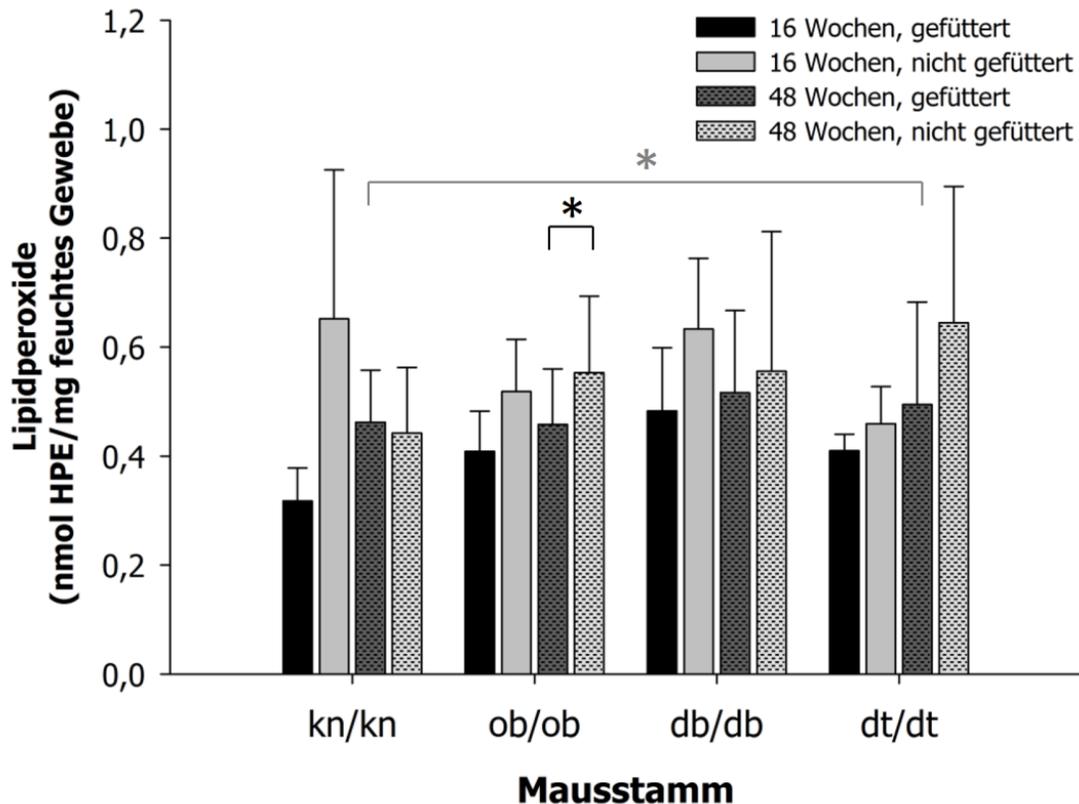


**Abbildung 51. Kalibrierung und Einfluss der Probenmatrix bei dem FOX-Assay.**

Eine Kalibrierung von 0,5–15 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie eine Kalibrierung + 10 µl eines Gewebsextraktes wurde für 120 min mit 0,1 mM Xylenolorange, 0,25 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat in 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei pH 1,8 in einem Gesamtvolumen von 250 µl in der Dunkelheit inkubiert. Es folgte die Vermessung bei 580 nm. Die ermittelten Absorptionen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von drei parallel inkubierten Ansätzen.

Die Bestimmung der Lipidperoxide in den Lebergewebeproben der Versuchsmäuse zeigte einen Trend zu erhöhtem oxidativen Stress in allen Gruppen für die nicht gefütterten Tiere im Vergleich zu den gefütterten Tieren mit Ausnahme der 48 Wochen alten Kontrollgruppe (Abbildung 52). Allerdings war dieser Unterschied lediglich für die 48-wöchigen ob/ob-Tiere statistisch signifikant. Außerdem ergab die statistische Auswertung signifikant erhöhte Werte für die Lipidperoxide in der gefütterten dt/dt-Gruppe (48 Wochen) verglichen mit der entsprechenden Kontrolle. Die

Unterschiede zwischen den Altersgruppen innerhalb der verschiedenen Stämme war nicht statistisch signifikant (Abbildung 52).



**Abbildung 52. Bestimmung der Lipidperoxide im Lebergewebe der Versuchstiere mittels FOX-Methode als Marker für oxidativen Stress.**

Zur Extraktion des Analyten wurden 20 mg fein gehacktes Lebergewebe mit Methanol aufgearbeitet, die so erhaltenen Extrakte wurden für 120 min mit 0,1 mM Xylenorange, 0,25 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat in 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei pH 1,8 in einem Gesamtvolumen von 250 µl in der Dunkelheit inkubiert. Es folgte die Vermessung bei 580 nm. Die ermittelten Absorptionen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von 4-12 Ansätzen. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, graue Klammern bezeichnen Unterschiede zwischen Mausmodellen, schwarze Klammern bezeichnen Unterschiede innerhalb von Modellen zwischen gefütterten und ungefütterten Tieren. kn/kn = Kontrolltiere, ob/ob = Leptin-Gen-defiziente Tiere, db/db = Leptinrezeptor-defiziente Tiere, dt/dt = HFD gefütterte Tiere.

## 4.4 Diskussion

Insgesamt waren die in der Studie gewonnenen Ergebnisse nur begrenzt aussagekräftig, da die zu beobachtenden Unterschiede in allen Bereichen der Studie klein und gleichzeitig häufig mit hohen Standardabweichungen besetzt waren. Nur einzelne Veränderungen zwischen Gruppen oder Zuständen (z.B. gefüttert vs. nicht gefüttert) waren statistisch signifikant, es ließen sich dennoch gewisse Trends erkennen. So war mit Ausnahmen eine verminderte Expression für CYB5B und CYB5R sowie eine erhöhte Expression der mARC-Gene im Zustand des Nahrungsentzugs verglichen mit den gefütterten Tieren erkennbar. Die Expression der Bestandteile des *N*-reduktiven Systems zeigt folglich nicht für alle Bestandteile dieselbe Tendenz. Die *N*-reduktive Aktivität zeigte ebenfalls den Trend zur erniedrigten Aktivität in den Gruppen der ungefütterten Mäuse (16 Wochen) und folgte somit dem Trend der Expression von CYB5B und CYB5R. Die Western Blot-Analyse konnte jedoch keine grundsätzlichen Unterschiede im Proteinvorkommen von mARC2, CYB5B und CYB5R zwischen den gefütterten und ungefütterten Mäusen detektieren, allerdings zeigten sich geringe Steigerungen der mARC2-Proteinmenge bei 16 Wochen alten dt/dt-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle. Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und der dt/dt-Gruppe waren auch für die Expression von CYB5B, CYB5R und mARC1 sowie für die *N*-reduktive Aktivität erkennbar, wobei die Tendenzen der Expression und der *N*-reduktiven Aktivität unterschiedlichen Richtungen folgen. Somit zeigte sich hier ein weiterer Trend für das *N*-reduktive System: Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Tieren unter HFD.

Die Gruppe der db/db-Mäuse als Modell für Diabetes des Typs 2 zeigen ebenfalls keine deutlichen Veränderungen in Bezug auf mARC2. Allerdings hatten die Tiere dieser Gruppe auch keinen *Diabetes mellitus* entwickelt (persönliche Korrespondenz mit Dr. M. Mikula, Nesteruk *et al.*, 2013). Somit ist es nicht verwunderlich, dass die für das STZ-Modell gefundenen Ergebnisse für Mäuse mit Diabetes Typ 1 (3.3.3) mit den hier

gefundenen Ergebnissen nicht vergleichbar sind und keinesfalls ein Hinweis darauf, dass sich die Veränderungen des mARC-Proteins bei Diabetes des Typs 1 und des Typs 2 unterscheiden.

Die Bestimmung des oxidativen Stress-Markers im FOX Assay zeigt einen umgekehrten Trend (statistisch nicht signifikant) als der, der *N*-reduktiven Aktivität: Erhöhte Werte für nicht-gefütterte Tiere im Vergleich zu gefütterten Tieren. Allerdings ist bekannt, dass Fasten bei Nagern mit erhöhtem oxidativen Stress einhergeht (Sorensen *et al.*, 2006). Ob hier ein kausaler Zusammenhang besteht oder lediglich eine Koinzidenz, ist den Daten nicht zu entnehmen.

Die gefundenen Tendenzen lassen die Vermutung zu, dass das mARC-haltige Enzymsystem bei Veränderungen in der Nahrungsaufnahme (Nahrungsentzug oder HFD) reguliert wird. Da die einzelnen Versuchsgruppen in dieser Studie mit  $n = 6$  Versuchsmäusen (oder ggf. weniger aufgrund von z.B. Verlust von Versuchstieren) relativ gering war, wurde eine nachfolgende Studie mit Wildtypmäusen (C57BL/6J) und größerer Versuchstierzahl durchgeführt. Hier wurden der Einfluss der Nahrungskarenz und der Fütterung mit HFD im Vergleich zur Kontrolle weiter untersucht. Außerdem wurden die Lebergewebe der Kontroll- und dt/dt-Tiere dieser Studie weiteren, genaueren Untersuchungen unterzogen (Kapitel 5).

## **4.5 Zusammenfassung**

Die durchgeführte Studie mit Kontroll-, ob/ob-, db/db- und dt/dt-Mäusen ergab keine deutlichen Zusammenhänge zwischen dem mARC-haltigen Enzymsystem und den betrachteten Zuständen. Allerdings war ein Trend von Veränderungen in Expression und *N*-reduktiver Aktivität durch Fasten über Nacht bei allen Gruppen zu erkennen. Außerdem zeigten sich Veränderungen in fast allen getesteten Parametern bei 16 Wochen alten Tieren, die mit HFD gefüttert wurden im Vergleich zur Kontrolle. Um

den beiden letzten Tendenzen weiter nachzugehen, wurde eine weitere Studie mit Wildtyp-Mäusen, die mit Nahrungsentzug oder mit HFD behandelt wurden, unternommen (Kapitel 5).



## **5 Untersuchungen zur Regulation von mARC durch Nahrungsaufnahme in Mäusen**

### **5.1 Thema und Zielsetzung**

In Kapitel 4 konnte in einer breit angelegten Untersuchung von Mäusen verschiedener metabolischer Modelle kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem mARC-haltigen Enzymsystem und einem der Modelle festgestellt werden. Dennoch ließen sich Muster von veränderten Parametern durch Nahrungsentzug in allen Modelle beobachten.

Nahrungsentzug, auch als Fasten bezeichnet, induziert in Nagern zahlreiche Veränderungen wie Gewichtsverlust, Übergang des Energiestoffwechsels in eine katabole Stoffwechsellage, Veränderungen von hormonellen und kardiovaskulären Parametern, sowie Veränderungen des hepatischen Fremdstoffstoffwechsels (Jensen *et al.*, 2013). Nächtliches Fasten (18 h) wird häufig als Standardprozedur im Rahmen von Tierstudien eingesetzt, um chirurgische Eingriffe zu erleichtern oder standardisierte Bedingungen, wie z.B. gleichmäßige Absorption von Testarzneistoffen, zu gewährleisten (Jensen *et al.*, 2013).

Die weitere Untersuchung einer möglichen Veränderung des mARC-haltigen Enzymsystems durch Fasten ist daher aus mehreren Aspekten interessant. Zum einen könnte eine mögliche Regulation des *N*-reduktiven Systems durch Nahrungskarenz ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Verknüpfung mit dem Energiestoffwechsel als Teil der bisher noch nicht vollständig aufgeklärten endogenen Funktion des Enzymsystems sein. Zum anderen wäre eine mögliche Veränderung des Enzymsystems und dessen Aktivität durch Fasten im Zusammenhang mit der Testung, neuer, durch mARC metabolisierter Arzneistoffe interessant. Im Rahmen der präklinischen Entwicklung solcher Stoffe werden Testungen zur Pharmakokinetik in Nagern durchgeführt.

Unterschiede in den Testprotokollen in Bezug auf Nahrungsaufnahme könnten folglich Einfluss auf die Aktivität des Enzymsystems und somit auf die Testergebnisse haben.

Eine zweite Intervention, die in den in Kapitel 4 durchgeführten Versuchen häufig mit veränderten Parametern in Bezug auf das mARC-haltige Enzymsystem zu beobachten war, war die Fütterung der Mäuse mit HFD. In Nagermodellen zur Untersuchung von Adipositas und metabolischem Syndrom wird neben zahlreichen genetischen Modellen die Fütterung mit hochfetthaltigen oder hochkohlenhydrathaltigen Diäten eingesetzt (Panchal *et al.*, 2011). So behandelte Tiere zeigen neben erhöhtem Körpergewicht alle Symptome des metabolischen Syndroms im Menschen (Panchal *et al.*, 2011). Eine Veränderung des mARC-haltigen Enzymsystems durch die Fütterung mit hochfetthaltiger Diät würde, ebenso wie Veränderungen durch Nahrungskarenz, auf eine Verbindung zwischen dem Enzymsystem und dem Energiestoffwechsel hindeuten.

Da die Leber das zentrale Organ des Energiestoffwechsels darstellt und gleichzeitig das mARC-haltige Enzymsystem hier in großen Mengen vorkommt (Krompholz *et al.*, 2012), wurden die Lebern der entsprechenden Versuchstiere untersucht. Mögliche Unterschiede in Bezug auf das mARC-haltige Enzymsystem durch Veränderungen im Energiestoffwechsel wären folglich in diesem Organ am wahrscheinlichsten zu detektieren.

Ziel der durchgeführten Experimente war es, zu untersuchen, ob das mARC-haltige Enzymsystem durch Nahrungsaufnahme beeinflusst wird. Hierzu wurde in Mäusen zum einen der Einfluss der Nahrungskarenz, zum anderen der Einfluss von hochfetthaltiger Diät untersucht. Außerdem wurde ein *in vitro* Zellkulturmodell, welches Nahrungskarenz simuliert (Malhotra *et al.*, 2013), mit humanen HepG2-Hepatom-Zellen hinzugezogen. Des Weiteren wurde der Einfluss von Nahrungskarenz über Nacht auf die Reduktion von Benzamidoxim *in vivo* untersucht.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Materialien und Geräte

Soweit nicht anders angegeben sind die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 beschrieben.

### 5.2.2 Zellkulturstudien im HepG2-Modellsystem

Die Kultivierung, Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität sowie die Ernte der HepG2-Zellen wurden von Dr. Michal Mikula und Artur Dzwonek in Warschau, Polen, durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 10 % FCS in 6-Well-Zellkulturplatten. Nach einem Tag wurden die Zellen in Medien kultiviert die entweder keine, 1,0 oder 4,5 g/l Glukose sowie 0,5 % FCS enthielten. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen zur Extraktion von RNA geerntet oder die *N*-reduktive Aktivität bestimmt und im Anschluss geerntet.

#### 5.2.2.1 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität von HepG2-Zellen

Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität wurde in Warschau nach der in 3.2.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt und die Überstände nach Kiel geschickt. Diese wurden wie in 3.2.2.5 beschrieben vermessen.

#### 5.2.2.2 Ernte und weitere Verarbeitung der Zellen

Die Zellen wurden mit eiskaltem DPBS-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Plastischabers abgelöst. Die so resultierende Suspension wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellpellets eingefroren. Die Pellets wurden entweder wie unter 3.2.4.4 beschrieben zur

RNA-Extraktion oder wie unter 3.2.2.4 beschrieben in Kiel zur Herstellung von Lysaten zwecks Western Blot-Analyse verwendet.

### **5.2.3 Tierversuche**

Die Haltung der Versuchstiere und Durchführung der Tierversuche erfolgte am Maria Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center/ Institut für Onkologie, Abteilung onkologische Genetik in der Arbeitsgruppe von Professor Jerzy Ostrowski und Dr. Michal Mikula in Warschau, Polen. Der Tierversuch wurde durch das 2. lokale Ethik-Komitee für Tierversuche in Warschau genehmigt.

Männliche C57BL/6W Mäuse wurden unter kontrollierten Temperatur- ( $21 \pm 2$  °C) und Feuchtigkeitsbedingungen ( $55 \pm 10$  %) in einem 12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere wurden mit Standardfutter gefüttert, welches 10 % der Kalorien aus Fett bereitstellt (19,2 % Proteine, 67,3 % Kohlenhydrate, 4,3 % Fett; DI2450B, Research Diets, New Brunswick, USA).

#### **5.2.3.1 Mausexperimente zur Untersuchung des Einflusses von Nahrungsentzug**

Im Alter von 18 Wochen wurden in einem ersten Experiment 12 von 24 Tieren für 18 h Futter und Wasser entzogen, die übrigen Tiere hatten vollen Zugang zu beidem und dienten als Kontrollgruppe. Nach diesem Zeitraum wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-72$  °C eingefroren. Ein weiteres analoges Experiment folgte, allerdings enthielten die Gruppe je 14 Individuen und die Zeitdauer der Nahrungskarenz betrug 24 h.

### 5.2.3.2 Mausexperiment zum Einfluss von Nahrungsentzug auf die *N*-reduktive Aktivität *in vivo*

24 Versuchsmäuse im Alter von 18 Wochen wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe erhielt vollen Zugang zu Futter und Wasser, der zweiten Gruppe wurde dies für 24 h entzogen. Nach 24 h wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital anästhetisiert, es folgte die Injektion von 20 mg/kg Körpergewicht Benzamidoxim. Nach 30 min wurden die Tiere getötet, Blut zur Gewinnung von Plasma sowie die Lebern entnommen und bei -72 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die eingesetzte Dosis Benzamidoxim und der Zeitpunkt der Probenentnahme wurden zuvor in Vorstudien getestet, um eine optimale Dosierung hinsichtlich der Verträglichkeit und der Detektion zu ermitteln. Hierzu wurden drei Benzamidoxim-Dosierungen (5, 10 und 20 mg/kg) sowie verschiedene Zeitpunkte der Probenentnahme (5, 60 und 180 min) untersucht.

### 5.2.3.3 Mausexperimente zum Einfluss von HFD

Die unter 4.2.1.1 gewonnenen Proben der 16 Wochen alten Tiere der dt/dt- und ob/ob-Gruppen sowie die der entsprechenden Kontrollgruppe wurden im direkten Vergleich der einzelnen Individuen einer genaueren Untersuchung unterzogen.

Außerdem konnten Proben aus einer weiteren Tierstudie von Frau Professor Ewa Henning, Warschau, zur Verfügung gestellt werden. Im Rahmen dieser Studie wurden die Lebern von 12 männlichen, 40 Wochen alten C57BL/6W Mäuse verwendet, von denen sieben mit HFD (60 % der Kalorien aus Fett, DI2492; Research Diets, New Brunswick, USA) gefüttert worden waren. Die übrigen Tiere hatten das Standardfutter erhalten (10 % der Kalorien aus Fett, DI2450B, Research Diets, New Brunswick, USA).

#### 5.2.4 RNA-Extraktion und Expressionsanalyse mittels qRT-PCR

Die Isolierung der mRNA und Quantifizierung per qRT-PCR wurde wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben für Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (PCK1), mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R durchgeführt. Im Falle der HepG2-Zellen wurde die Expression auf die Expression von *60S acid ribosomal protein P0 (RPLP0)* normalisiert. Die für PCK1 und RPLP0 eingesetzten Primer sind Tabelle 5 zu entnehmen.

**Tabelle 5. Für die qRT-PCR für PCK und RPLP0 eingesetzte Primer.**

Spezies	Gen	vorwärts (5'→3')	rückwärts (5'→3')
Maus	<i>PCK1</i>	GCCTTCCACGAACTTCCTCAC	CTGCATAACGGTCTGGACTTC
Maus	<i>RPLP0</i>	GCAATGTTGCCAGTGTCTG	GCCTTGACCTTTTCAGCAA

#### 5.2.5 Herstellung von Leberhomogenaten zur weiteren Untersuchung

Lebergewebeproben wurden wie in 3.2.4.2 beschrieben in 1000 µl TPWL-Puffer aufgearbeitet. Der Proteingehalt der hergestellten Homogenate wurde wie in 2.2.2.3 beschrieben mit der BCA-Methode bestimmt.

#### 5.2.6 Gewinnung von Plasma zur Quantifizierung von Benzamidin

Blut wurde direkt nach der Entnahme in EDTA-haltige Röhrchen überführt und im Anschluss bei 4 °C und 2.000 *g* für 5 min zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **5.2.7 Western Blot-Analyse**

Eine Trennung der Homogenate per SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot wurde wie in 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zu der dort beschriebenen Methode wurde zur Entwicklung der Western Blots außerdem anti-PCK1-Antikörper und anti-Histone H3-Antikörper verwendet. Es wurden Proteinlösungen aufgetragen, die entweder gepoolte Homogenate zweier Versuchstiere der jeweiligen Gruppe in gleichen Proteinmengen enthielten oder repräsentativ für einzelne Individuen waren. Die Information, um welche Art von Proben es sich handelt, ist den Bildunterschriften zu entnehmen.

### **5.2.8 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität**

Die Bestimmung der *N*-reduktive Aktivität der Leberhomogenate gegenüber dem Modellsubstrat Benzamidoxim wurde nach der in 3.2.4.6 beschriebenen Methode durchgeführt.

### **5.2.9 Bestimmung des Metaboliten Benzamidin in murinen Plasma- und Gewebeproben**

30 µl Plasma wurden mit zwei Aliquots und 40 µl Leberhomogenat mit 20 Aliquots Acetonitril versetzt und bei 4 °C für 30 min bei 220 rpm geschüttelt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 22.000 *g* wurde der Überstand mittels Gefriertrocknung über Nacht getrocknet. Die zur Fällung notwendige Menge Acetonitril wurde zuvor in Vorversuchen ermittelt. Das Lyophilisat wurde im Fließmittel der im Anschluss verwendeten HPLC-Analytik (10 mM Ocytlsulfonat-Natrium, 17 % Acetonitril (v/v)) gelöst und für 45 min bei 4 °C geschüttelt. Nach weiterer Zentrifugation bei 22.000 *g* für 30 min wurde der Überstand wie bei Clement *et al.* (Clement *et al.*, 2005) beschrieben per HPLC-Analytik vermessen.

Eine statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, USA), der t-Test wurde zur Prüfung auf statistische Signifikanz angewendet,  $p$ -Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet.

### 5.2.9.1 Bestimmung der Wiederfindung von Benzamidin in murinen Plasma- und Leberhomogenat-Proben

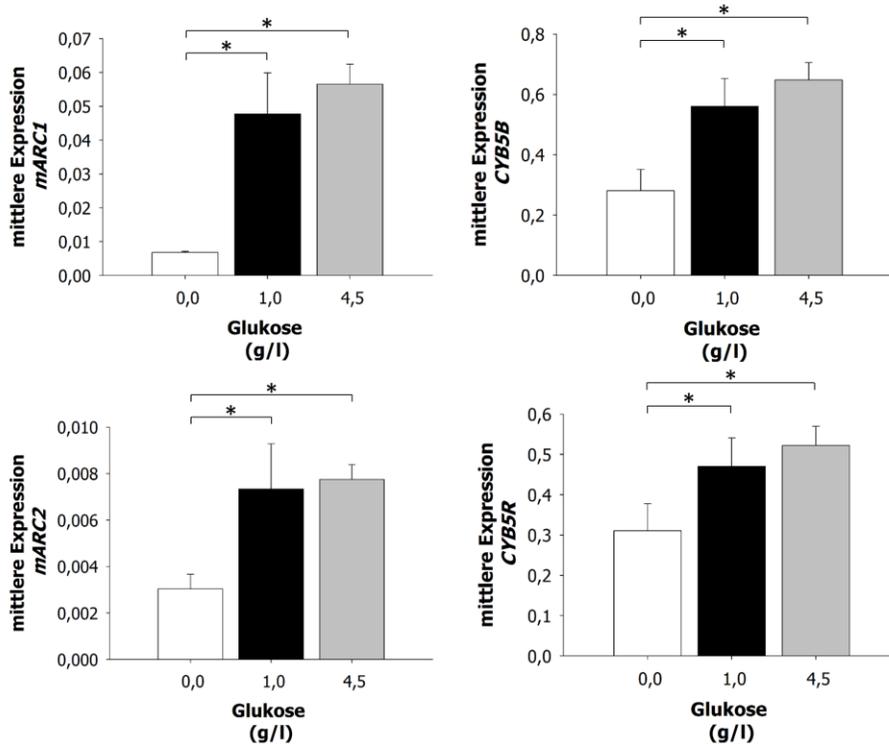
Zur Quantifizierung von Benzamidin in Plasma und Leberhomogenaten wurden Wiederfindungen erstellt und zur Berechnung der Metabolitenkonzentration verwendet. Hierzu wurde eine Konzentrationsreihe von 0,1–500  $\mu\text{M}$  Benzamidin in Plasma bzw. Leberhomogenat hergestellt, wie unter 5.2.9 beschrieben aufgearbeitet und wie bei Clement *et al.* (Clement *et al.*, 2005) beschrieben vermessen.

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Veränderungen in HepG2-Zellen als Modell der Nahrungskarenz

#### 5.3.1.1 Veränderung der Expression des *N*-reduktiven Systems durch Glukose im Wachstumsmedium

Die Expression von CYB5B, CYB5R, mARC1 und mARC2 stieg in humanen HepG2-Hepatomzellen mit steigender Glukosekonzentration im Wachstumsmedium statistisch signifikant an (U-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 53).

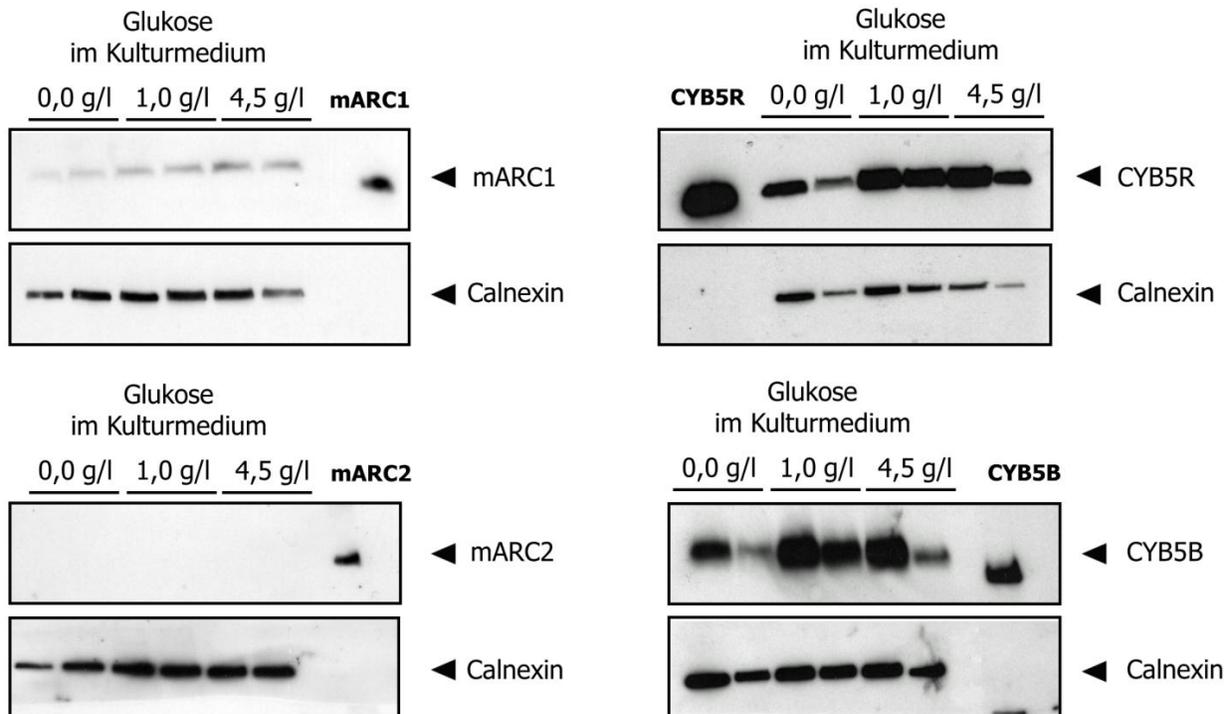


**Abbildung 53. Expression der Komponenten des *N*-reduktiven Systems in HepG2-Zellen.**

HepG2-Zellen wurden ohne oder mit 1,0 g/l bzw. 4,5 g/l Glukose im Kulturmedium kultiviert. Die Expression von mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf die Expression von *RPLP0* normalisiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von sechs Replikaten. Statistisch signifikante Unterschiede (U-Test) sind mit \* gekennzeichnet.

### 5.3.1.2 Veränderung der Proteinmengen des *N*-reduktiven Systems durch Glukose im Wachstumsmedium

Die Proteinmengen von mARC1, CYB5B und CYB5R stiegen ebenfalls glukoseabhängig an, mARC2 konnte jedoch für keinen der Zustände detektiert werden (Abbildung 54).

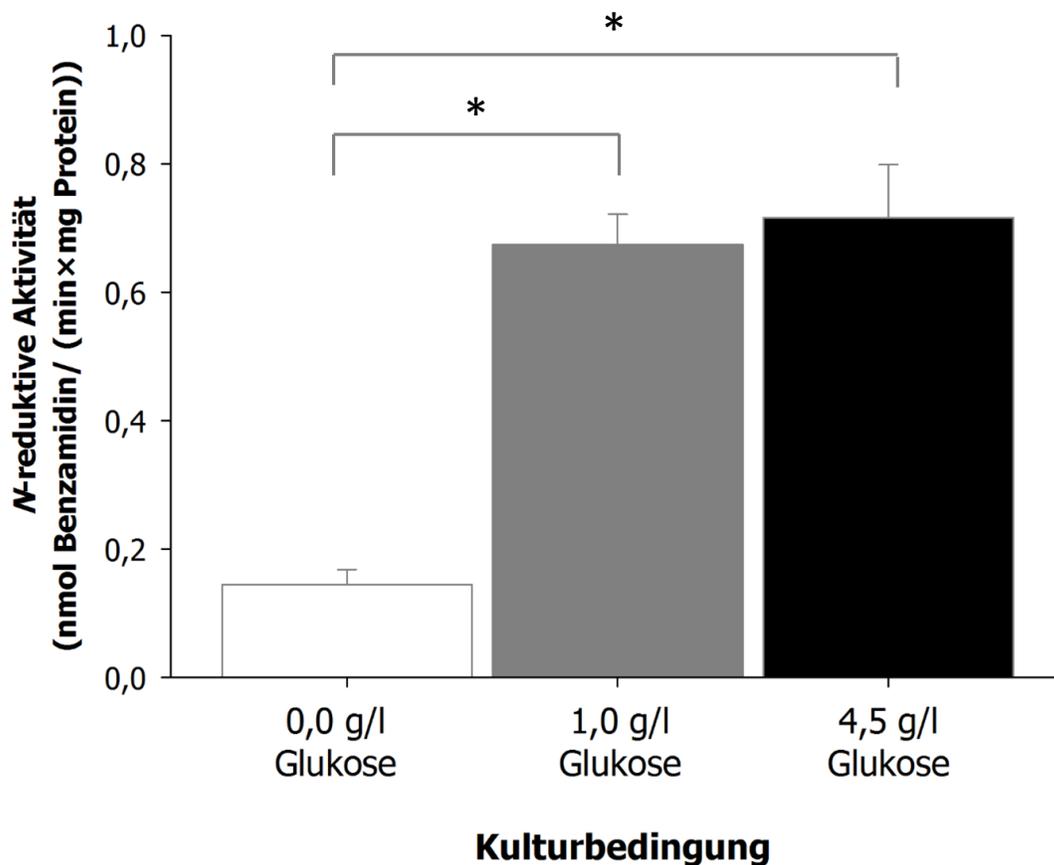


**Abbildung 54. Western Blot-Analyse von HepG2-Zellen nach Kultur in verschiedenen Glukosekonzentrationen.**

HepG2-Zellen wurden ohne oder mit 1,0 g/l bzw. 4,5 g/l Glukose im Kulturmedium kultiviert. Nach erfolgter SDS-PAGE mit 20 µg Protein in Form von Lysaten je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper, anti-CYB5B-Antikörper und anti-CYB5R-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:500 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidasegekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet. Als Kontrolle wurden jeweils 50 ng rekombinant hergestellte Proteine für mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R aufgetragen. Die Spur des Markers wurde aus der Abbildung entfernt.

### 5.3.1.3 Veränderung der *N*-reduktiven Aktivität durch Glukose im Wachstumsmedium

Die *N*-reduktive Aktivität der humanen HepG2-Zellen gegenüber dem Modellsubstrat Benzamidoxim stieg ebenfalls mit steigender Glukosekonzentration im Wachstumsmedium statistisch signifikant an (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 55).

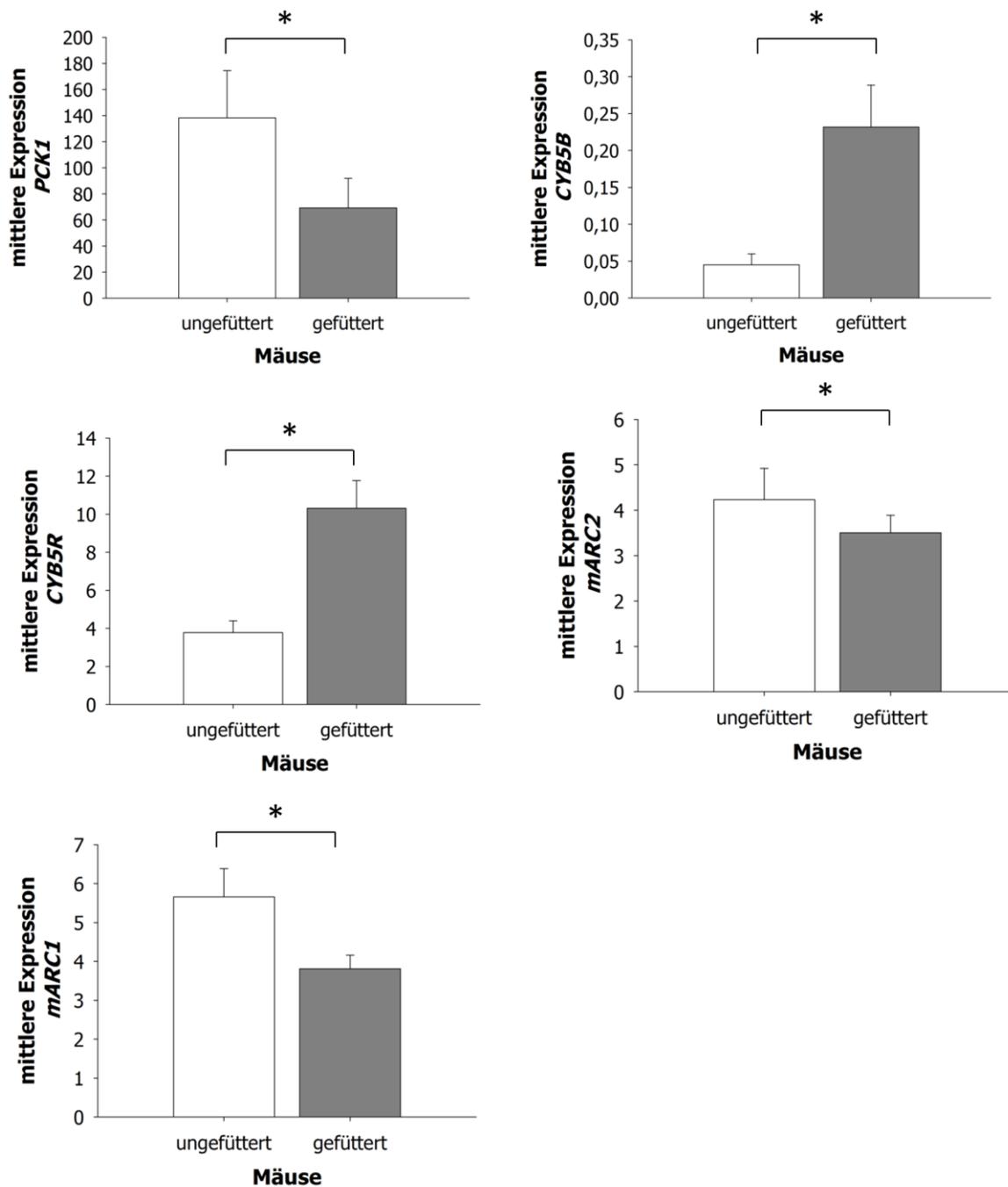


**Abbildung 55. *N*-reduktive Aktivität von HepG2-Zellen nach Kultur in verschiedenen Glukosekonzentrationen.**

Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte mit 5 mM Benzamidoxim im Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min. Der Metabolit Benzamidin wurde im Inkubationspuffer per HPLC-Analytik quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von sechs parallel inkubierten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

### **5.3.2 Veränderung der Expressionen von mARC1, mARC2, CYB5B, CYB5R und PCK1 durch Nahrungsentzug bei Mäusen**

Die Expression der PCK1 wurde als Marker für den Zustand bei Nahrungskarenz untersucht, da bekannt ist, dass dieses Protein bei Fasten herauf reguliert wird (Raab *et al.*, 2005). Die Expression von PCK1 nahm wie erwartet in der Gruppe der ungefütterten Tiere statistisch signifikant zu (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 56). Die Expression für CYB5B und CYB5R nahm in beiden Versuchen (18 und 24 h Fasten) in der Gruppe der ungefütterten Tiere statistisch signifikant ab (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Expression für mARC1 und mARC2 hingegen nahm in der Gruppe der ungefütterten Tiere in beiden Versuchen statistisch signifikant zu (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 56, Daten für 18 h Fasten, Daten für 24 h nicht gezeigt, Abbildung 58 A für mARC2 und 24 h Fasten).



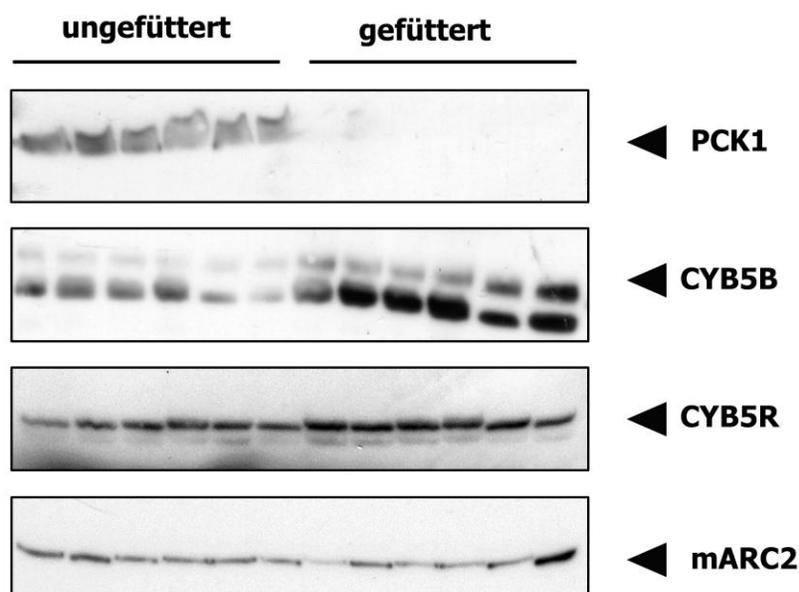
**Abbildung 56. Expression für PCK1 und die Komponenten des *N*-reduktiven Systems in der murinen Leber.**

Zwei Gruppen von je 12 C57BL/6W-Mäusen wurde für 18 h Nahrung und Wasser entzogen (ungefüttert) oder hatten vollen Zugang zu Futter und Wasser (gefüttert).

Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert und auf den geometrischen Mittelwert der Ct Werte von *Mcoln1* und *Hbms* normalisiert (n = 12). Statistisch signifikante Unterschiede (t Test,  $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.

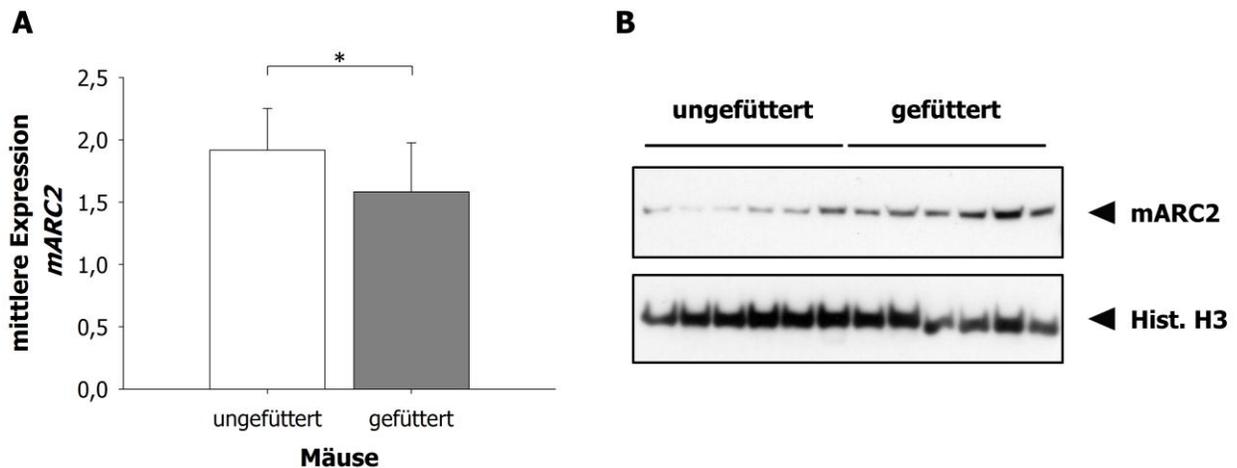
### 5.3.3 Veränderung der Proteinmenge von mARC2, CYB5B, CYB5R und PCK1 durch Nahrungsentzug bei Mäusen

Die Proteinmengen von PCK1 nahmen wie erwartet in der Gruppe der ungefütterten Mäuse zu. Für CYB5B und CYB5R ließen sich für die Gruppe der ungefütterten Mäuse reduzierte Proteinlevel sowohl nach 18 als auch 24 stündiger Nahrungskarenz detektieren (Abbildung 57, Daten für 24 h nicht gezeigt). Für mARC2 konnte nach 18 h Nahrungskarenz keine Veränderung in der Proteinmenge detektiert werden, nach 24 stündiger Nahrungskarenz hingegen nahm die Proteinmenge für mARC2 in der Gruppe der ungefütterten Tiere ab (Abbildung 57 und Abbildung 58 B).



**Abbildung 57. Proteinvorkommen für PCK1 und die Komponenten des *N*-reduktiven Systems in der murinen Leber.**

15 µg Protein wurden je Spur geladen. Die Auftragslösungen setzten sich aus gepoolten Homogenaten zweier Individuen zusammen. Zur Detektion kamen anti-PCK1-Antikörper in der Verdünnung 1:750, anti-CYB5B-Antikörper, anti-CYB5R-Antikörper und anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000 sowie sekundärer anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) in der Verdünnung 1:10.000 zum Einsatz.



**Abbildung 58. Expression und Proteinlevel für mARC2 in der murinen Leber nach 24 h Nahrungsentzug.**

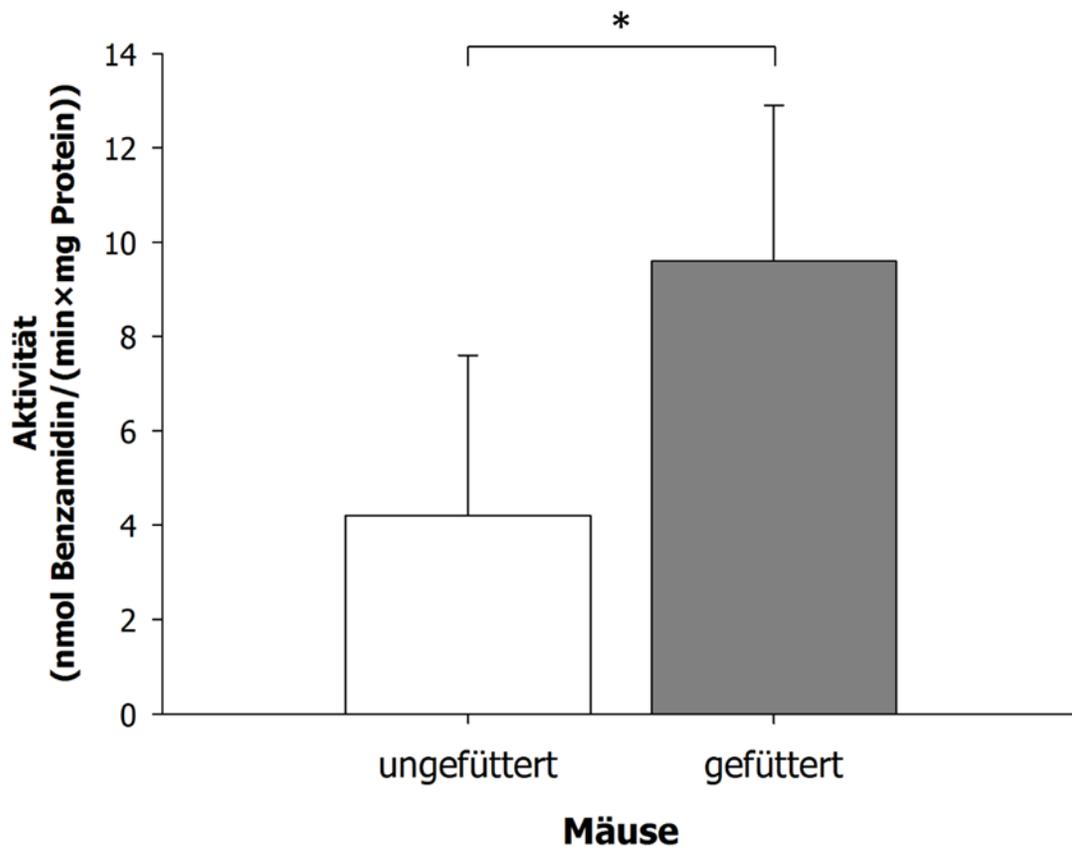
Zwei Gruppen von je 14 C57BL/6W-Mäusen wurde für 18 h Nahrung und Wasser entzogen (ungefüttert) oder hatten vollen Zugang zu Futter und Wasser (gefüttert).

**A** Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert und auf den geometrischen Mittelwert der Ct-Werte von *Mcoln1* und *Hbms* normalisiert (n = 14). Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

**B** 15 µg Protein wurden je Spur geladen. Die Auftragslösungen setzten sich aus gepoolten Homogenaten zweier Individuen zusammen. Zur Detektion wurden anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000 und anti-Histone H3-Antikörper der Verdünnung 1:5.000 als Ladekontrolle, sowie sekundärer anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) in der Verdünnung 1:10.000 verwendet.

### 5.3.4 Veränderung der *N*-reduktiven Aktivität durch Nahrungsentzug bei Mäusen

Die *N*-reduktive Aktivität gegenüber dem Modellsubstrat Benzamidoxim nahm in den Leberhomogenaten der ungefütterten Mäuse in beiden Studien (18 und 24 h fasten) statistisch signifikant ab (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 59, Daten für 18 h nicht gezeigt).



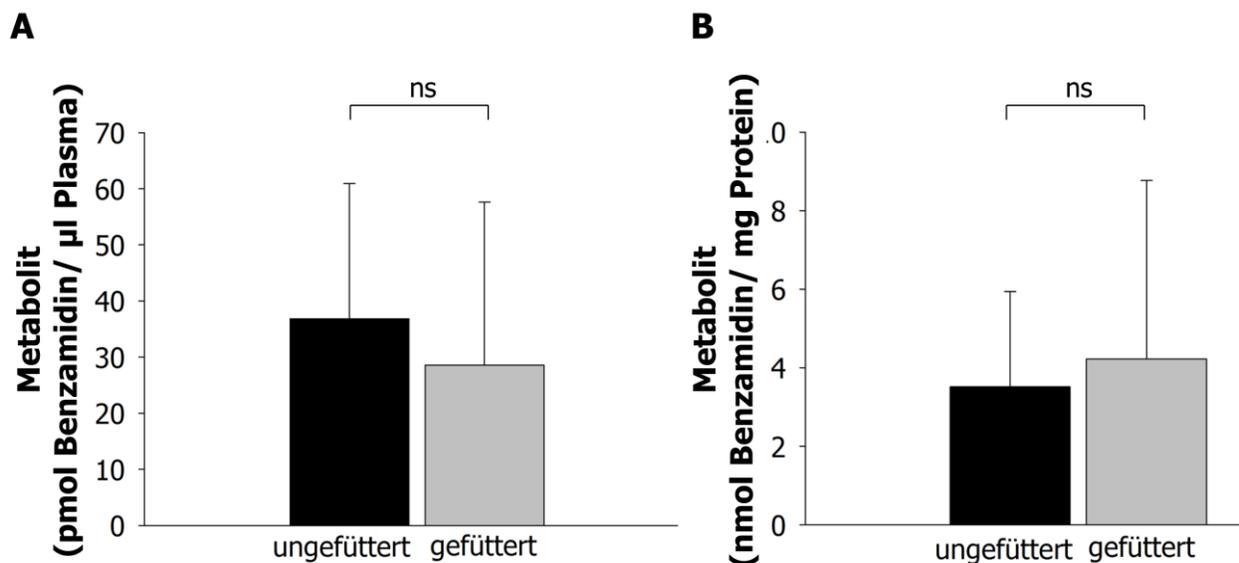
**Abbildung 59. *N*-reduktive Aktivität in murinen Leberhomogenaten nach 24 h Nahrungsentzug.**

0,05 mg Leberhomogenat wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 20 min inkubiert. Nach Abstoppen mit einem äquivalenten Volumen Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und der resultierende Metabolit Benzamidin per HPLC quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus je 14 Inkubationsansätzen die jeweils doppelt vermessen wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

### 5.3.5 Einfluss von Nahrungsentzug auf die *N*-reduktive Aktivität *in vivo*

Für die Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin in Plasma und in Leberhomogenaten wurden Wiederfindungen in beiden Matrices erstellt. Für Plasma war die Wiederfindung in einem Bereich von 0,5–500  $\mu$ M Benzamidin linear ( $R^2=0,9961$ ), die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 39,1 %. Für Leberhomogenat war die Wiederfindung im selben Bereich mit  $R^2 = 0,9989$  ebenfalls linear, die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug hier 36,2 %. Trotz einer verringerten *N*-reduktiven Aktivität

der Leberhomogenate der ungefütterten Tiere *in vitro*, konnten *in vivo* keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Plasma- und Lebergewebskonzentrationen des Metaboliten Benzamidin nach Benzamidoximgabe zwischen den Gruppen der gefütterten und ungefütterten Mäuse festgestellt werden (Abbildung 60).



**Abbildung 60. Konzentrationen des Metaboliten Benzamidin in Plasma und Lebergewebe nach Benzamidoximgabe.**

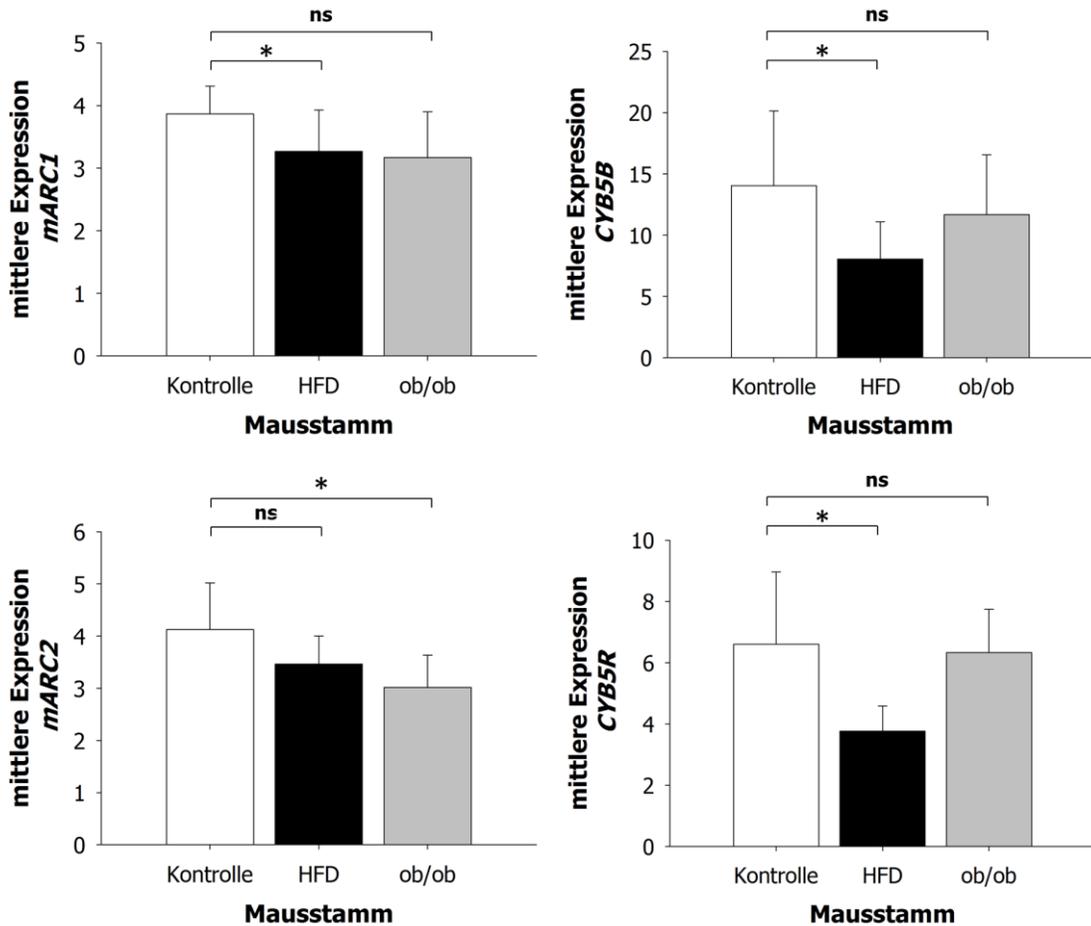
**A** Metabolit im Plasma **B** Metabolit im Lebergewebe.

24 Mäusen wurde 20 mg/kg Benzamidoxim injiziert, zwölf hatten zuvor für 24 h gefastet. 30 min nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Proben entnommen. Plasma und Lebergewebe wurden aufgearbeitet und vermessen. Die Konzentration des Metaboliten wurde bestimmt, es handelt sich um die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus Proben von 12 Versuchstieren je Gruppe, die jeweils doppelt bestimmt wurden. ns = statistisch nicht signifikant (t-Test  $p > 0,05$ ).

### 5.3.6 Veränderung der Expressionen von mARC1, mARC2, CYB5B und CYB5R durch hochfetthaltige Diät bei Mäusen

Die Expression der untersuchten Gene der 16 Wochen alten Tiere der dt/dt-Gruppe (mit HFD gefüttert), der ob/ob-Gruppe sowie der Kontrolltiere ist bereits unter 4.3.2 beschrieben. Zur besseren Übersicht sind die Daten für CYB5B, CYB5R, mARC1 und mARC2 in Abbildung 61 im direkten Vergleich von Kontrolle, HFD-gefütterten Tieren und ob/ob-Mäusen dargestellt. Für CYB5B, CYB5R und mARC2 ist im Falle der

HFD-gefütterten Mäuse die Expression im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant erniedrigt. Im Fall der ob/ob-Mäuse ist lediglich die Expression von mARC2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt (U-Test,  $p < 0,05$ ).

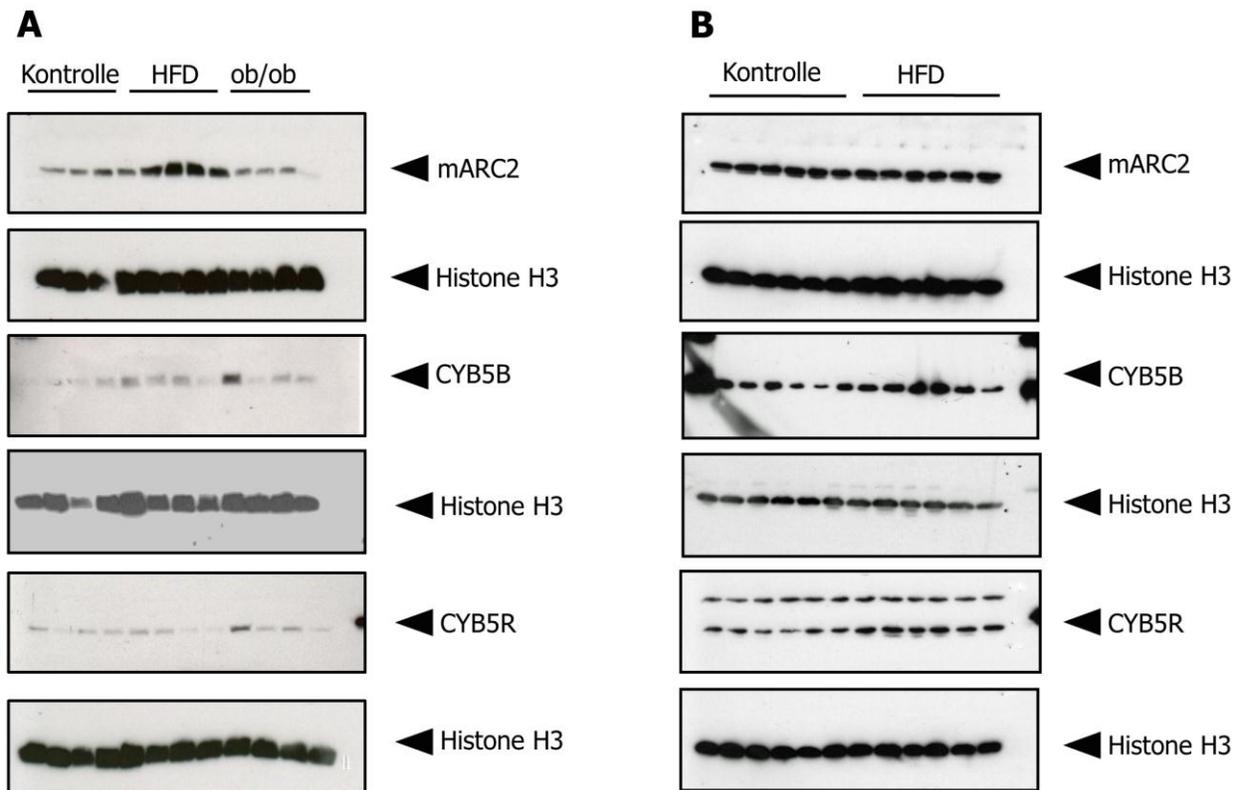


**Abbildung 61. Expression der Komponenten des *N*-reduktiven Systems in der murinen Leber.**

Die Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert und auf den geometrischen Mittelwert der Ct-Werte von *Mcoln1* und *Hbms* normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede (U-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, ns = statistisch nicht signifikant.

### **5.3.7 Veränderung der Proteinmenge von mARC2, CYB5B und CYB5R durch hochfetthaltige Diät bei Mäusen**

Im Falle der 16 Wochen alten Mäuse zeigten sich erhöhte Proteinmengen für mARC2 bei Tieren, die mit HFD gefüttert wurden, im Vergleich zur Kontrolle. Für CYB5B und CYB5R waren keine Veränderungen detektierbar. Das ob/ob-Mausmodell hingegen zeigte keine Veränderungen in Bezug auf die Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 62 A). Im Falle der 40 Wochen alten Tiere konnten für CYB5B und CYB5R geringfügig gesteigerte Proteinmengen detektiert werden, für mARC2 waren keine Unterschiede festzustellen (Abbildung 62 B).



**Abbildung 62. Western Blot-Analyse der Komponenten des *N*-reduktiven Systems in Lebern von 16 und 40 Wochen alten Mäusen unter HFD.**

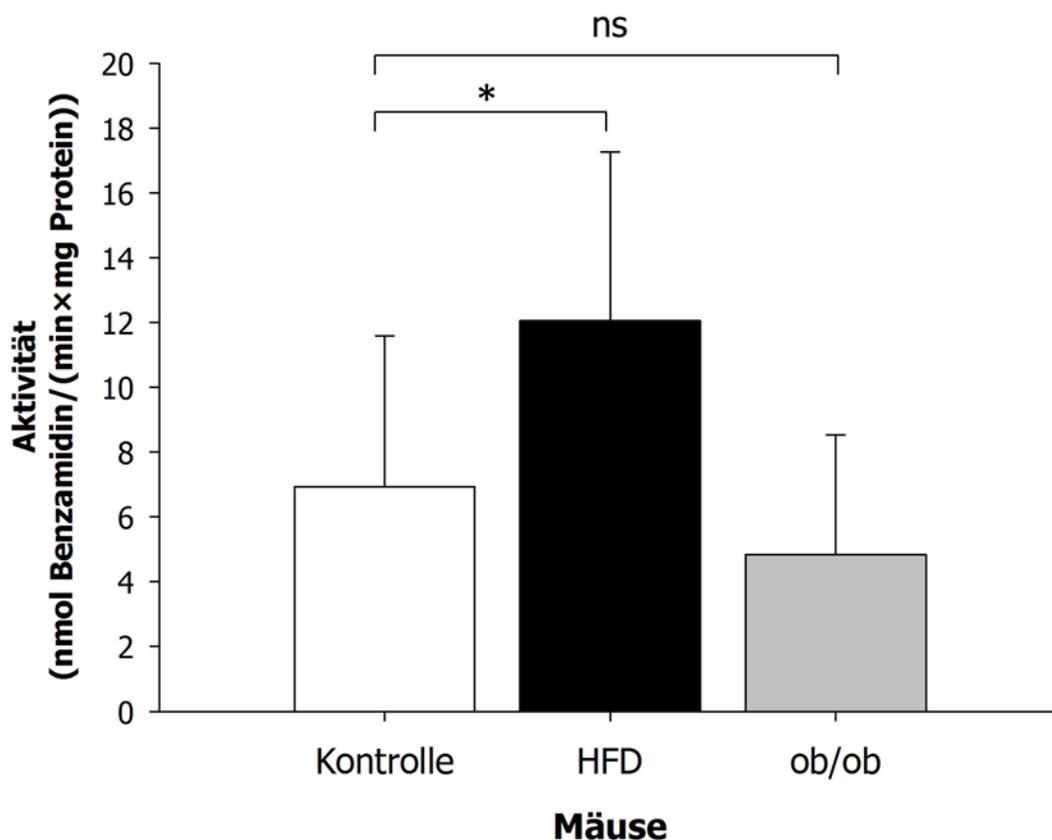
Es wurden 15 µg Protein je Spur geladen. Die Auftragslösungen bestehen aus Homogenaten einzelner Individuen. Zur Detektion kamen anti-CYB5B-Antikörper, anti-CYB5R-Antikörper und anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000 und anti-Histone H3-Antikörper der Verdünnung 1:5.000, sowie sekundärer anti-Rabbit-IgG-Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) in der Verdünnung 1:10.000 zum Einsatz.

**A** Leberhomogenate 16 Wochen alter Mäuse, die entweder mit normaler Diät gefüttert wurden (Kontrolle) oder HFD erhielten (HFD), sowie von ob/ob-Mäusen (ob/ob), die ebenfalls normale Diät erhielten.

**B** Leberhomogenate 40 Wochen alter Mäuse, die entweder mit normaler Diät gefüttert wurden (Kontrolle) oder HFD erhielten (HFD).

### 5.3.8 Veränderung der *N*-reduktiven Aktivität durch hochfetthaltige Diät bei Mäusen

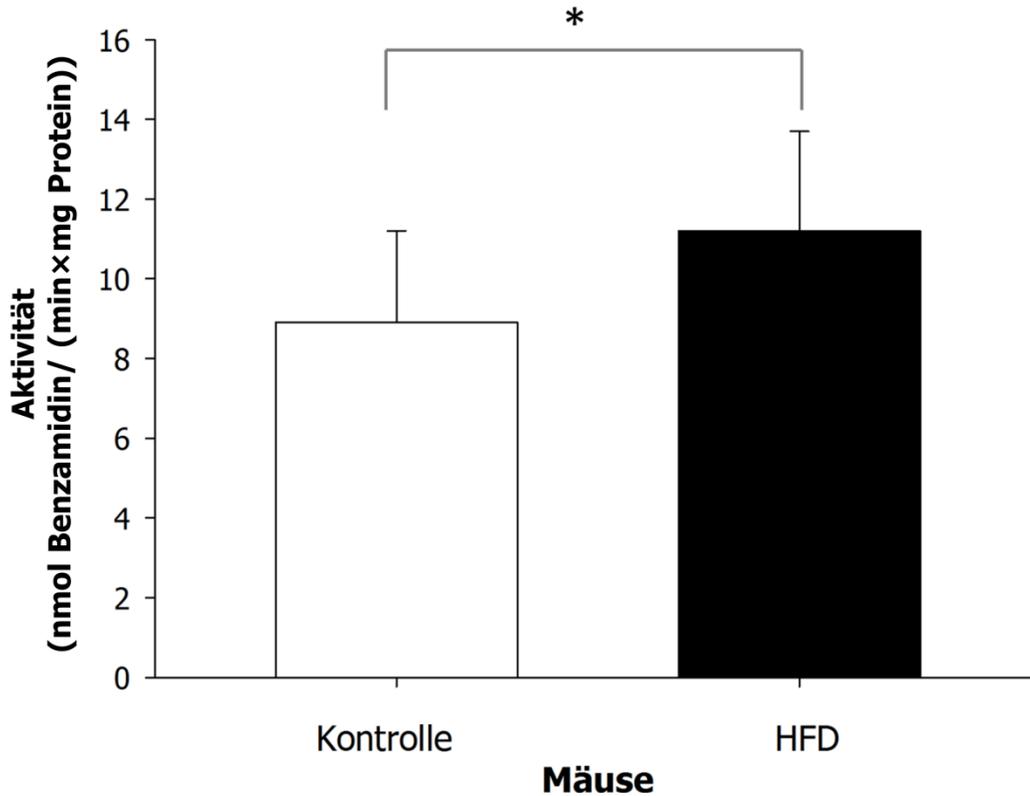
Im Falle der 16 Wochen alten Tiere zeigte sich eine erhöhte *N*-reduktive Aktivität in den Leberhomogenaten der Gruppe der Tiere, die mit hochfetthaltiger Diät gefüttert wurden. Die Gruppe der ob/ob-Tiere zeigte hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 63).



**Abbildung 63. *N*-reduktive Aktivität muriner Leberhomogenate von 16 Wochen alten Mäusen unter HFD sowie von ob/ob-Mäusen.**

0,05 mg Leberhomogenat wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 20 min inkubiert. Nach Abstoppen mit einem äquivalenten Volumen Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und der resultierende Metabolit Benzamidin per HPLC quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus je acht Inkubationsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, ns = statistisch nicht signifikant.

Die Leberhomogenate der Gruppe der 40 Wochen alten, mit hochfetthaltiger Diät gefütterten Mäuse zeigte eine statistisch signifikant erhöhte *N*-reduktive Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 64).

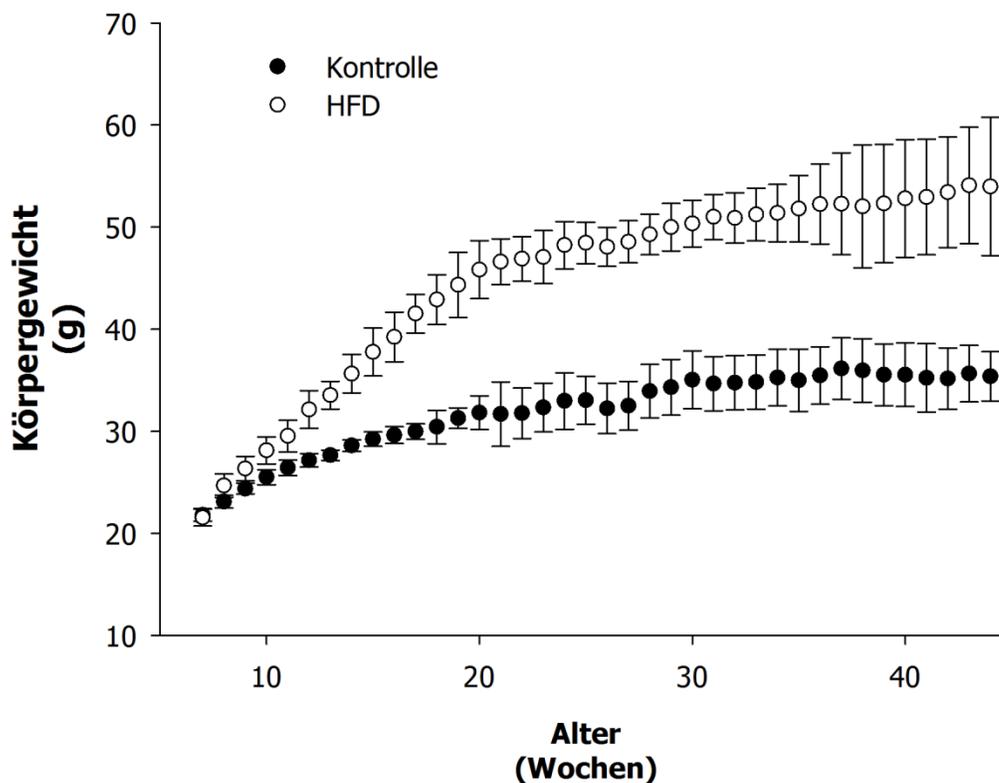


**Abbildung 64. *N*-reduktive Aktivität muriner Leberhomogenate von 40 Wochen alten Mäusen unter HFD.**

0,05 mg Leberhomogenat wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH für 20 min inkubiert. Nach Abstoppen mit einem äquivalenten Volumen Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und der resultierende Metabolit Benzamidin per HPLC quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus je 14 Inkubationsansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

### 5.3.9 Entwicklung des Körpergewichts von Mäusen unter Standarddiät und HFD

Die Entwicklung des Körpergewichts von Mäusen unter normaler Diät und HFD wurde über 48 Wochen durch wöchentliche Gewichtskontrolle untersucht (Abbildung 65). Mäuse unter Standardfutter nahmen bis zur 19. Woche, Mäuse unter HFD bis zur 21. Woche zu und erlangten dann ein Gewichtsplateau. Die hierzu herangezogenen Daten entstammen den Versuchen aus Kapitel 4 und sind außerdem bei Nesteruk *et al.* (Nesteruk *et al.*, 2013) beschrieben.



**Abbildung 65. Entwicklung des Körpergewichts von Mäusen unter normaler Diät und HFD.**

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 48 Wochen wöchentlich gewogen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus  $n = 6$  Versuchstieren/Gewichtsbestimmungen.

## 5.4 Diskussion

Im Rahmen der in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Versuche konnte eindeutig gezeigt werden, dass das mARC-haltige Enzymsystem nahrungsabhängig reguliert wird.

Der Entzug von Glukose in Zellkulturen kann als Modell für Fasten verwendet werden (Malhotra *et al.*, 2013). In den von uns so mit humanen HepG2-Leberzellen durchgeführten Modellversuchen zeigte sich eine glukoseabhängige Regulation aller drei Komponenten des mARC-haltigen Enzymsystems sowohl in Bezug auf die Expression und Proteinmengen als auch auf die *N*-reduktive Aktivität. Somit konnten die Ergebnisse mit humanen Nierenzelllinien, in welchen sich eine Induzierbarkeit von mARC und *N*-reduktiver Aktivität durch Glukose gezeigt hatte (3.3.2.1), auch für Leberzellen weiter bestätigt werden. Es ist bekannt, dass Glukose neben Genen des globalen Zellstoffwechsels eine Vielzahl von Genen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels direkt oder indirekt reguliert (Meugnier *et al.*, 2007; Vaultont *et al.*, 2000). Die Regulation des *N*-reduktiven Systems in Leberzellen durch Glukose ist folglich ein möglicher Hinweis auf eine Verknüpfung mit dem Kohlenhydrat- und/oder Energiestoffwechsel. Allerdings ist dies kein Hinweis darauf, dass das Protein tatsächlich auch an der Umsetzung von Energieträgern beteiligt ist.

Hinweise auf eine Verknüpfung zum Energiestoffwechsel konnten in Tierstudien mit Mäusen weiter bestätigt werden, in welchen zum einen der Einfluss von Nahrungskarenz, zum anderen die Fütterung mit HFD untersucht wurde.

Nahrungskarenz in Mäusen führte zu einer verminderten Expression von CYB5B und CYB5R sowie einer erhöhten Expression von mARC1 und mARC2. In Bezug auf die Proteinmengen ließen sich bereits nach 18 h reduzierte Proteinmengen durch Nahrungskarenz für CYB5B und CYB5R nachweisen. Für mARC2 zeigte sich nach 18 h jedoch keine Veränderung, nach 24 h hingegen eine Reduktion der Proteinmenge in der

Gruppe der ungefütterten Mäuse. Somit stehen die gefundenen Proteinmengen für CYB5B und CYB5R im Einklang mit der gemessenen Expression, für mARC2 hingegen verhalten sich Expression und Proteinmengen gegenläufig. Es ist folglich von einer bisher noch nicht weiter beschriebenen posttranskriptionalen oder posttranslationalen Modifikation für mARC2 auszugehen. Um was für einen Mechanismus es sich handelt, lässt sich aufgrund der gewonnenen Daten nicht sagen. Allerdings ist dies ein Hinweis, dass Studien, die sich mit Veränderungen des mARC-Proteins befassen, nicht allein aufgrund von Expressionsdaten interpretiert werden sollten, sondern auch Proteindaten zu Rate gezogen werden müssen. Die Tatsache, dass sich in Bezug auf die mARC2-Proteinmengen, anders als für CYB5B und CYB5R, nach 18 h Nahrungskarenz keine, nach 24 h jedoch messbare Unterschiede ergeben, weist darauf hin, dass mARC2 entweder einer langsameren Regulation oder einem langsameren Proteinauf- oder -abbau als CYB5B und CYB5R unterliegt. Dieses Phänomen ist auch für ein anderes dreigliedriges Enzymsystem mit CYB5B und CYB5R beschrieben, in dem die Stearyl-CoA-Desaturase (SCD) als drittes Protein fungiert. Auch hier unterscheidet sich die Abbaugeschwindigkeit von CYB5B und CYB5R von der der SCD (Paton *et al.*, 2009).

Die *N*-reduktive Aktivität der Leberhomogenate der ungefütterten Tiere war in beiden Studien reduziert. Im Falle der 18 stündigen Nahrungskarenz ist dies, trotz der unveränderten Proteinmengen von mARC2, mit den reduzierten Proteinmengen von CYB5B und CYB5R zu begründen. Im Falle des 24 stündigen Fastens tragen die reduzierten Proteinmengen aller drei Komponenten des *N*-reduktiven Systems zur verminderten Aktivität der Leberhomogenate der ungefütterten Tiere bei.

Bei Mäusen handelt es sich um nachtaktive Tiere, die 2/3 ihrer Nahrungsaufnahme während der Nachtstunden ausführen. Somit ist nächtliches Fasten bei Mäusen, anders als Nahrungskarenz über Nacht beim Menschen, als nicht-physiologischer Zustand zu verstehen, welcher die Tiere gegebenenfalls unter Stress setzt (Jensen *et al.*, 2013). Die

längste freiwillige Zeitdauer ohne Nahrungsaufnahme ist bei Mäusen mit 5 h, die längst mögliche Dauer des Fasten mit fünf Tagen beschrieben, längere Nahrungskarenz führt zum Exitus der Tiere (Jensen *et al.*, 2013). Die von uns angewendeten Zeitdauern von 18 und 24 h stellen somit für die Versuchstiere ein ungewöhnliches Ereignis und einen nicht physiologischen Zustand dar. Trotzdem konnten im Verhalten und Aussehen der Tiere keinerlei Anzeichen für erhöhten Stress oder sonstige Beeinträchtigungen bemerkt werden. Ebenso wenig waren Anzeichen von hepatischer Steatose zu erkennen (persönliche Korrespondenz mit Marta Gajewska, Leiterin der Tierversuchsabteilung in Warschau). Hepatische Steatose ist bei Mäusen ab einer Fastendauer von 16 h beschrieben (Jensen *et al.*, 2013), hierbei kommt es zu einer nicht physiologischen Fettakkumulation in der Leber, wo aufgrund des Fastens eine vermehrte Synthese von Triglyceriden aus den aus dem Speicherfett freigesetzten freien Fettsäuren stattfindet, um andere Gewebe mit Energieträgern zu versorgen. Ungenügender Abtransport dieser Fette in Form von *low-density* Lipoproteinen führt dann zur Steatose. Da die Tiere keine extremen oder krankhaften Reaktionen auf den nicht physiologischen Zustand des Fastens zeigten, gibt der gefundene Zusammenhang von Nahrungskarenz und Herunterregulation des *N*-reduktiven Systems dennoch Hinweise auf die unbekannt Funktion des mARC-Proteins unter physiologischen Bedingungen: Eine funktionelle Verknüpfung des Enzyms mit dem Energiestoffwechsel und steht somit im Einklang mit den in Zellkulturstudien gewonnenen Daten.

Da Fasten bei Nagern Teil vieler Standardversuchsprotokolle ist (Jensen *et al.*, 2013), wären Veränderungen in Bezug auf die *N*-reduktive Aktivität *in vivo*, wie sie *in vitro* für Leberhomogenate durch Nahrungskarenz der Versuchstiere nachgewiesen werden konnten, für die potentielle präklinische Testung von durch mARC metabolisierten Verbindungen interessant. Daher wurde in einem Mäuseexperiment der Einfluss von Fasten auf die Metabolitenkonzentration von Benzamidin nach Injektion des Substrats der *N*-reduktiven Reaktion, Benzamidoxim, getestet. Es konnten weder im Plasma noch

im Lebergewebe Unterschiede zwischen gefütterten und ungefütterten Tieren festgestellt werden. Das mARC-haltige *N*-reduktive System ist im Vergleich zu anderen Xenobiotika-metabolisierenden Systemen, wie z.B. der Familie der Cytochrom-P450-Enzyme, hoch aktiv und katalysiert Umsetzungen sehr schnell. Folglich wird, trotz der Herunterregulation des Enzymsystems durch Fasten, das Substrat quantitativ und schnell umgesetzt, so dass sich keine messbaren Unterschiede für die Metabolitenkonzentration ergeben. In Bezug auf die *in vivo* Testung neuer durch mARC metabolisierter Verbindungen sollten Unterschiede in den Testprotokollen in Bezug auf die Fütterung der Versuchstiere kein Problem darstellen. Wie eingangs beschrieben, ist nächtliches Fasten bei Nagern nicht mit nächtlichem Fasten im Menschen aufgrund der nächtlichen Ruhephase vergleichbar und stellt im Gegensatz zu letzterem einen nicht physiologischen Zustand dar. Somit gibt es keinen Hinweis, dass im Menschen Veränderungen des *N*-reduktiven Systems durch physiologische Veränderungen der Nahrungsaufnahme die Metabolisierung der Substrate des mARC-haltigen Enzymsystems, wie z.B. durch mARC aktivierte Prodrugs, im Sinne von veränderten Plasmaspiegeln beeinflussen sollten.

Durch die Fütterung mit HFD wurde mARC2 in 16 Wochen alten Mäusen deutlich induziert, für CYB5B und CYB5R ließen sich kaum Unterschiede erkennen. Keines der Tiere zeigte Anzeichen von hepatischer Steatose, wie sie durch HFD ausgelöst werden kann (Nesteruk *et al.*, 2013). Lebergewebe von 16 Wochen alten ob/ob-Mäusen, die aufgrund einer Mutation im Leptin-Gen fettleibig waren, obwohl sie mit normaler Diät gefüttert wurden, zeigen hingegen kein erhöhtes Vorkommen von mARC2 oder erhöhte *N*-reduktive Aktivität, allerdings Anzeichen von leichter hepatischer Steatose (Nesteruk *et al.*, 2013). Folglich ist die Induktion des mARC2-Proteins und seiner Aktivität nicht mit der Fettleibigkeit an sich, sondern durch die Diät begründet. Außerdem konnten Hennig *et al.* (Hennig *et al.*, 2014) in den hier verwendeten Versuchstieren erhöhte Plasmaglukosewerte in der Gruppe der HFD gefütterten Tiere, nicht jedoch in den

Gruppen der Kontroll- bzw. ob/ob-Tiere feststellen. Der Anstieg des mARC2-Proteins und der *N*-reduktiven Aktivität geht folglich ebenfalls mit einem Anstieg der Plasmaglukose einher. In 40 Wochen alten, HFD-gefütterten Tieren ließen sich hingegen nur geringfügige Veränderungen erkennen. Die CYB5B und CYB5R Proteinmengen stiegen leicht an, für mARC2 waren keine Unterschiede erkennbar. Dennoch war auch hier die *N*-reduktive Aktivität signifikant erhöht. Anzeichen von hepatischer Steatose waren nicht erkennbar (persönliche Korrespondenz mit Marta Gajewska, Leiterin der Tierversuchsabteilung in Warschau). Über die Plasmaglukosewerte dieser Versuchstiere gibt es keine Informationen, allerdings ist für 48 Wochen alte Mäuse unter HFD beschrieben, dass sich die Plasmaglukosewerte nicht von denen der Kontrolltiere unter Standarddiät unterscheiden (Hennig *et al.*, 2014). Es ist also denkbar, dass die Veränderungen in Bezug auf das mARC2-Protein und die *N*-reduktive Aktivität im Zusammenhang mit den Plasmaglukosewerten stehen. Außerdem zeigt der Anstieg von mARC2-Protein und *N*-reduktiver Aktivität einen Zusammenhang mit der Gewichtszunahme der Mäuse. Mäuse, die mit HFD gefüttert werden, nehmen bis zur ca. 21. Woche an Körpergewicht zu. Danach unterliegt das Gewicht zwar noch Schwankungen, verbleibt aber grundsätzlich auf einem stabilen Niveau. Es lassen sich also stärkere Änderungen in Bezug auf das mARC-Protein feststellen, solange die Mäuse zunehmen. Folglich ist es denkbar, dass das mARC2-Protein induziert wird, wenn ein aktiver Fettstoffwechsel mit Lipogenese zur Erstellung von Speicherfetten stattfindet. Die Voraussetzung für die Bildung von Speicherfetten sind wiederum hinreichende Plasmaglukosewerte. Das zuvor untersuchte Fasten wiederum führt zu einer katabolen Stoffwechsellage mit vermindertem Fettauf- und gesteigertem Fettabbau und verminderten Plasmaglukosewerten. Unter dem eben erörterten Gesichtspunkt ist folglich eine Herabregulation des mARC-haltigen Enzymsystems durch Nahrungskarenz in Einklang mit der beschriebenen Hypothese. Die von uns in diesem Teil der Studie

erhobenen Daten deuten folglich auf die Verknüpfung von mARC-haltigem Enzymsystem mit dem Energie- und/oder dem Fettstoffwechsel hin.

Teile der hier untersuchten Proben waren von mir zuvor im Rahmen einer breitangelegten Versuchsreihe mit verschiedenen Mausmodellen (Kapitel 4) untersucht worden. Die dort gefundenen Unterschiede für die Proteinmengen im Western Blot mit gepoolten Proteinproben waren zwar erkennbar, aber nicht so deutlich ausgeprägt wie in der hier durchgeführten Untersuchung der einzelnen Homogenate der Individuen. Vermutlich ist dies mit Ungenauigkeiten in Bezug auf die Proteingehaltsbestimmung zu erklären, die der Herstellung von gepoolten Homogenaten für die Western Blots in Kapitel 4 zu Grunde liegt. Im Sinne einer Fehlerfortpflanzung können so Ungenauigkeiten das Ergebnis beeinflussen.

### **5.5 Zusammenfassung**

Das mARC-haltige Enzymsystem wird glukoseabhängig *in vitro* und nahrungsabhängig *in vivo* reguliert. Bei Mäusen führt Nahrungskarenz zu einer Herunterregulation des *N*-reduktiven Systems, HFD hingegen zur Induktion von mARC2 und *N*-reduktiver Aktivität. Die Induktion durch HFD ist vermehrt in jüngeren, zunehmenden und Fettdepot-bildenden Tieren zu beobachten, die erhöhte Plasmaglukosewerte aufweisen; Leptin-Gen-defiziente, fettleibige Tiere (ob/ob-Mäuse) ohne erhöhte Plasmaglukosewerte zeigen den Effekt jedoch nicht. Das *N*-reduktive System unterliegt folglich Veränderungen, wenn sich Veränderungen in der Energiestoffwechsellage und dem Fettstoffwechsel ergeben, dies deutet auf eine funktionelle Verknüpfung mit selbigen hin.



## **6 *In vitro* Studien zur Verknüpfung von mARC und Fettstoffwechsel**

### **6.1 Thema und Zielsetzung**

In den Kapiteln 3, 4 und 5 ergaben sich Hinweise auf eine Verknüpfung des mARC-haltigen Enzymsystems mit dem Energie- bzw. Fettstoffwechsel. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurden *in vitro* Studien mit Adipozytenmodellen sowie Studien zur Wechselwirkung von Acyl-CoAs mit dem mARC-haltigen Enzymsystem unternommen.

Eines der verwendeten Adipozytenmodelle ist die Zelllinie 3T3-L1. Hierbei handelt es sich um fibroblastenartige Adipozyten-Vorläuferzellen, die durch Induktion zu Adipozyten differenzieren können (Green *et al.*, 1975). Die Zelllinie ist ein Abkömmling der murinen 3T3-Fibroblastenzelllinie, die 1962 aus den Embryonen von Mäusen (*Swiss albino* Maus) isoliert wurde (Todaro *et al.*, 1963). Diese Zellen sind in der Erforschung des Fettstoffwechsels und verwandter Fragestellungen etabliert und Newton *et al.* konnten bereits in einer auf Proteomic-Technologien basierenden Studie Veränderungen in Bezug auf mARC2 während der Differenzierung von 3T3-L1 zu Adipozyten nachweisen (Newton *et al.*, 2011). Dieses Modell wurde von uns genutzt, um einen möglichen Zusammenhang von mARC-haltigem Enzymsystem und Fettstoffwechsel weiter zu untersuchen. Da bereits beschrieben wurde, dass NAC in der Lage ist, die adipogene Differenzierung von 3T3-L1 zu hemmen (Calzadilla *et al.*, 2011), und sich in Kapitel 3.3.2.2 bereits ein Einfluss von NAC auf die Induktion von mARC *in vitro* in HMCL und HEK-293 gezeigt hatte, wurde auch Studien zum Einfluss von NAC auf mARC in 3T3-L1 durchgeführt.

Zur Untersuchung eines humanen Adipozytenmodells wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) der adipogenen Differenzierung unterzogen. Bei hMSCs handelt

es sich um multipotente Zellen, die unter geeigneten Bedingungen in der Lage sind, zu verschiedenen Typen von Bindegewebszellen zu differenzieren. Zu diesen Zelltypen gehören Fibroblasten, Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten (Väänänen, 2005). Die hMSCs kommen neben den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark von adulten Organismen vor, allerdings nehmen ihre Anzahl und ihr Differenzierungspotential im Alter ab. Neben dem Knochenmark sind die Zellen auch in anderen Geweben beschrieben worden, wie z.B. der Placenta, der Gelenksflüssigkeit, dem humanen Nabelschnurblut und dem Fettgewebe (Sethe *et al.*, 2006; Väänänen, 2005). Auch wenn die Mechanismen der Differenzierung der hMSCs noch nicht vollständig verstanden sind (Sethe *et al.*, 2006; Väänänen, 2005), gibt es bekannte Protokolle zur Induktion der Zellen *in vitro*. So führt z.B. der Zusatz von Isobutyl-methyl-xanthin (IBMX), Dexamethason, Insulin und Indometacin zur adipogenen Differenzierung (Nombela-Arrieta *et al.*, 2011). Die so erhaltenen Adipozytenkulturen können zu Studien des Verlaufs der Differenzierung, sowie der erhaltenen Zelltypen genutzt werden (Janderová *et al.*, 2003). Dies wurde zur Untersuchung von möglichen Veränderungen des mARC-haltigen Enzymsystems durch die Differenzierung von hMSCs zu Adipozyten genutzt.

Untersuchungen des Arbeitskreises (Schwering, 2010) hatten die Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität von Schweinelebermitochondrien durch verschiedene Acyl-CoAs gezeigt. Es gibt Hinweise, dass Acyl-CoAs neben ihrer Funktion als Intermediate des Energiestoffwechsels die Funktion von Signalmolekülen im Zusammenhang mit Transportprozessen, Apoptose und Transkriptionsprozessen übernehmen können (Shrago, 2000). Eine mögliche Hemmung des *N*-reduktiven Systems durch Acyl-CoAs könnte folglich mit einer möglichen Verknüpfung des Enzymsystems mit Energiestoff- und Fettstoffwechsel in Zusammenhang stehen. Daher wurde diese mögliche Inhibition der *N*-reduktiven Aktivität mit dem humanen rekombinant hergestellten,

rekonstituierten Enzymsystem aus mARC1 oder mARC2, CYB5B und CYB5R weiter untersucht.

Mit dem Ziel, weitere Erkenntnisse zum Zusammenhang von mARC-haltigem Enzymsystem und Fettstoffwechsel zu gewinnen, wurden Unterschiede in Bezug auf mARC vor und nach der Differenzierung von murinen Präadipozyten bzw. hMSCs zu Adipozyten untersucht. Außerdem wurde die bereits beschriebene Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität durch Acyl-CoAs im rekombinant hergestellten, rekonstituierten humanen Enzymsystem untersucht.

## **6.2 Methoden**

### **6.2.1 Materialien und Geräte**

Soweit nicht anders angegeben sind die verwendeten Materialien und Geräte in Kapitel 8 beschrieben.

### **6.2.2 Kultivierung von 3T3-L1-Zellen**

Die murine 3T3-L1-Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Janin Andres, Abt. Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der Charité Berlin in Form eingefrorener Zellen zur Verfügung gestellt.

Zur Kultivierung wurde DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 0,1 g/l Natriumpyruvat und stabilem Glutamin sowie 10 % FCS verwendet.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben aufgetaut und mit  $0,5 \times 10^6$  Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in Kultur genommen. Die Zentrifugation erfolgte abweichend von der in 3.2.2.1 beschriebenen Methode bei 900 g für 3 min. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 60 % wie unter 3.2.2.1 beschrieben im Verhältnis 1:2 bis 1:3 passagiert. Nach drei Passagen erfolgte die Aussaat der Zellen mit 10.000 Zellen/Well in 6-Well-Zellkulturplatten zur Durchführung weiterer Versuche.

#### **6.2.2.1 Einfrieren der Zellen**

Nach erfolgreicher Expansion wurden die Zellen für zukünftige Versuche wie unter 3.2.2.1.1 beschrieben eingefroren. Abweichend von der dort beschriebenen Methode erfolgte die Zentrifugation bei 900 g für 3 min, das Kryomedium bestand aus 70 % DMEM, 20 % FCS und 10 % DMSO.

### 6.2.3 Adipogene Induktion von 3T3-L1-Prädipozyten

Die adipogene Induktion der 3T3-L1-Prädipozyten erfolgte durch die Kultivierung in Kulturmedium mit 1  $\mu$ M Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 1  $\mu$ M Rosiglitazon und 0,01 mg/ml Insulin, im Folgenden als Induktionsmedium bezeichnet, für 48 h und anschließender Kultivierung in Folgemedium bestehend aus 0,01 mg/ml Insulin in Kulturmedium.

Zur Herstellung des Induktionsmediums wurden Stammlösungen der Zusätze hergestellt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Im Falle von IBMX enthielt diese 10 mM IBMX in *Aqua bidest.*, welches zur Lösung des Stoffes sowie nach dem Auftauen und vor Zugabe zum Kulturmedium erwärmt wurde. Die weiteren Stammlösungen bestanden aus 10 mM Dexamethason in unvergälltem, absoluten Alkohol, welches vor Zusatz zum Kulturmedium im Verhältnis 1:100 in DPBS weiter verdünnt wurde, sowie Rosiglitazon als 2,5 mM Stammlösung in unvergälltem absoluten Ethanol, welches vor Zusatz zum Kulturmedium ebenfalls 1:25 in DPBS verdünnt wurde.

Bei Erreichen von 100 % Konfluenz wurden die Zellen noch zwei weitere Tage kultiviert und anschließend die Induktion durch Ersatz des Kulturmediums durch Induktionsmedium eingeleitet. Nach 48 h wurde das Induktionsmedium durch Folgemedium ersetzt, selbiges wurde über die gesamte Wachstumsdauer alle 2 Tage erneuert.

Um die Veränderungen in Bezug auf das *N*-reduktive System im Verlauf der adipogenen Differenzierung zu untersuchen, wurden Zellen induziert und nach Kultivierung in Folgemedium für fünf, acht, elf bzw. fünfzehn Tage mittels Oil-Red-O-Färbung, Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität sowie durch Westen Blot-Analyse untersucht. Als Referenz dienten nicht induzierte 3T3-L1-Zellen.

#### **6.2.4 Adipogene Induktion von 3T3-L1-Prädipozyten unter Zusatz von NAC**

Um zu überprüfen, ob die Induktion von mARC2 in 3T3-Zellen während der adipogenen Differenzierung durch NAC hemmbar ist, wurden Kultur- und Induktionsversuch mit NAC-Zusatz durchgeführt.

3T3-L1-Zellen wurden kultiviert, ausgesät und wie unter 6.2.3 beschrieben induziert. Allerdings wurden dem Induktions- sowie Folgemedium 0,01–1 mM NAC zugesetzt. Die NAC-haltigen Medien wurden vor jedem Mediumwechsel frisch hergestellt. Die Medien wurden täglich erneuert. Nach neun Tagen wurde die *N*-reduktive Aktivität bestimmt und die Zellen geerntet bzw. die Oil-Red-O-Färbung durchgeführt.

#### **6.2.5 Kultivierung von hMSCs**

Die humanen MSCs aus Nabelschnurblut wurden freundlicherweise von Dr. Alexandra Stolzing, Fraunhofer Institut, Leipzig, zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben aufgetaut und mit  $10^6$  Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche kultiviert. Abweichend von der dort beschriebenen Methode erfolgte die Zentrifugation bei 900 *g* für 3 min. Das Kulturmedium bestand aus DMEM mit 10 % FCS Superior Qualität (Biochrome AG, Berlin), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin und wurde alle 3 Tage gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen wie unter 3.2.2.1 beschrieben im Verhältnis 1:3 passagiert, abweichend von der dort beschriebenen Methode erfolgte die Zentrifugation bei 900 *g* für 3 min.

Die Zellen wurden zur Durchführung weiterer Versuche mit einer Zelldichte von 25.000 Zellen/Well in 6-Well-Zellkulturplatten wie unter 3.2.2.2 beschrieben ausgesät. Die Zentrifugation erfolgte abweichend von der dort beschriebenen Methode bei 900 *g* für 3 min.

#### 6.2.5.1 Einfrieren der Zellen

Nach erfolgreicher Expansion wurden die Zellen wie unter 3.2.2.1.1 eingefroren, um Zellen für zukünftige Versuche zur Verfügung zu haben. Abweichend von der dort beschriebenen Methode wurden 130.000 Zellen/Kryoröhrchen eingefroren, außerdem bestand das Kryomedium aus 90 % FCS und 10 % DMSO und die Zentrifugation erfolgte bei 900 *g* für 3 min.

#### 6.2.6 Adipogene Induktion von hMSCs

Um hMSCs der adipogenen Differenzierung zu unterziehen, wurde ein Induktionsmedium eingesetzt. Dieses bestand aus Kulturmedium mit Zusatz von 1  $\mu\text{M}$  Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 1  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon, 200  $\mu\text{M}$  Indometacin und 0,01 mg/ml Insulin. Zur Herstellung des Mediums wurden die unter 6.2.3 beschriebenen Stammlösungen, sowie eine Stammlösung von 20 mM Indometacin in *Aqua bidest.* verwendet. Es wurde außerdem ein Folgemedium, bestehend aus 0,01 mg/ml Insulin in Kulturmedium eingesetzt.

Nach Erreichen von 100 % Konfluenz wurden die Zellen weitere vier Tage kultiviert, dann wurde das Kulturmedium durch eine Mischung aus je einem Teil Induktionsmedium und einem Teil Kulturmedium ersetzt. Nach 72 h wurde das Medium für 24 h durch Folgemedium ersetzt. Es folgten dann wiederum eine Kultivierung für 72 h in Induktionsmedium und ein weiterer Wechsel für 24 h auf Folgemedium, diese Prozedur wurde im Anschluss ein weiteres Mal wiederholt. Nachfolgend wurden die Zellen in Folgemedium kultiviert, welches alle drei Tage ersetzt wurde, bis ausreichende Fettakkumulation zu verzeichnen war.

Nach 17, 29 und 33 Tagen nach Einleitung der Induktion wurden die Zellen in Bezug auf *N*-reduktive Aktivität, Oil-Red-O-Färbung sowie mittels Western Blot-Analyse weiter untersucht.

### **6.2.7 Bestimmung der Lipidakkumulation mittels Oil-Red-O-Färbung**

Zur Bestimmung der Fettakkumulation nach adipogener Differenzierung wurde eine Färbung mit dem lipophilen Farbstoff Oil-Red-O durchgeführt.

Der Farbstoff Oil-Red-O wurde in Form einer Stammlösung mit 0,35 % (m/v) in Isopropanol gelagert.

Zur Durchführung der Färbung wurde die Oil-Red-O-Arbeitslösung stets frisch hergestellt, indem sechs Teile Oil-Red-O-Stammlösung mit vier Teilen *Aqua bidest.* versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Abschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µM-Sterilfilter filtriert, um eventuelle ungelöste Feststoffe zu entfernen.

Zur Färbung wurde das Kulturmedium abgenommen und durch 2,4 ml 10 % Formalin (neutral gepuffert) ersetzt, um die Zellen am Boden der Kulturplatten zu fixieren. Nach fünf minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung durch 2,4 ml frisches Formalin ersetzt und die Zellkulturplatte mit Hilfe von Parafilm® und Alufolie dicht verschlossen. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde das Formalin entnommen, mit 2,4 ml 60 % Isopropanol gewaschen und an der Luft vollständig trocknen gelassen. Anschließend wurde 1 ml Oil-Red-O-Arbeitslösung hinzugefügt und für 10 min inkubiert. Die Lösung wurde nach erfolgter Inkubationszeit umgehend entfernt und die Zellkulturplatte unter fließendem demineralisiertem Wasser gewaschen, bis das ablaufende Wasser klar war. Nach Trocknung an der Luft wurde die Platte mikroskopiert und ggf. fotografiert.

Im Anschluss erfolgte die Elution des Farbstoffes durch 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Bewegung mit 1 ml 100 % Isopropanol je Well. Das erhaltene Eluat konnte im Photometer bei 500 nm vermessen werden. Ein leeres Well der Zellkulturplatte wurde ebenfalls der Färbung unterzogen und diente der Ermittlung eines Blindwertes.

Eine statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, USA), der t-Test wurde zur Prüfung auf statistische Signifikanz angewendet,  $p$ -Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet.

### **6.2.8 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität**

Die *N*-reduktive Aktivität wurde nach der in 3.2.2.3 beschriebenen Methode bestimmt. Anschließend wurden die Zellen wie in 3.2.2.4 geerntet und lysiert, und der Proteingehalt der resultierenden Lysate wie in 2.2.2.3 beschrieben bestimmt.

In zellengefüllten Wells der Zellkulturplatte, die nicht zur Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität herangezogen, sondern anschließend mittels Oil-Red-O-Färbung (6.2.7) untersucht wurden, wurden während der Inkubation das Kulturmedium durch substratfreien Inkubationspuffer ersetzt. Im Gegensatz zum herkömmlichen Kulturmedium ist der pH-Wert des Inkubationspuffers ohne CO<sub>2</sub>-Atmosphäre während der Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität stabil.

Eine statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, USA), der t-Test wurde zur Prüfung auf statistische Signifikanz angewendet,  $p$ -Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet.

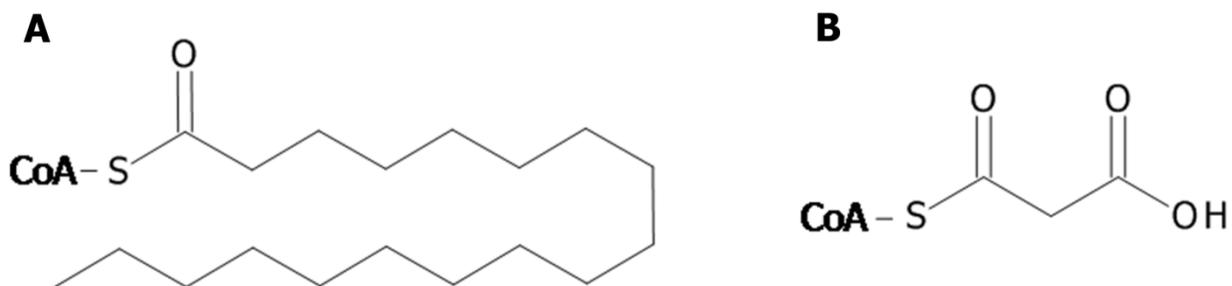
### **6.2.9 Western Blot-Analyse**

Die hergestellten Lysate wurden wie in 2.2.6 beschrieben per SDS-PAGE getrennt und wie in 2.2.7 beschrieben per Western Blot untersucht. Es wurden 30-35 µg Protein in

Form von Lysat je Spur geladen, außerdem dienten 50 ng rekombinant hergestellte mARC-Proteine als Kontrolle. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper und anti-mARC2-Antikörper, anti-SOD2-Antikörper, sowie anti-Calnexin-Antikörper als Ladekontrolle zum Einsatz.

### 6.2.10 Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität durch Acyl-CoAs im *in vitro* Biotransformationsansatz rekombinant hergestellter Proteine

Um den Einfluss und eine mögliche Inhibition durch Stearyl- bzw. Malonyl-CoA auf die *N*-reduktive Aktivität *in vitro* zu testen, wurden Inhibitor-Studien durchgeführt. Hierzu wurde der in 2.2.5 beschriebene *in vitro* Biotransformationsansatz verwendet. Abweichend von der dort beschriebenen Methode wurden 3 mM Benzamidoxim als Substrat eingesetzt, die Inkubationsdauer betrug 15 min. Zusätzlich wurden Stearyl-CoA in den Konzentrationen von 5–100  $\mu$ M sowie Malonyl-CoA in den Konzentrationen 0,1–3 mM zugesetzt. Die Ansätze wurden nach erfolgter Inkubation wie unter 2.2.5 aufgearbeitet und wie bei Clement *et al.* (Clement *et al.*, 2005) beschrieben vermessen. Die Strukturen der eingesetzten Acyl-CoAs sind Abbildung 66 zu entnehmen.



**Abbildung 66. Strukturformeln der eingesetzten Acyl-CoAs.**

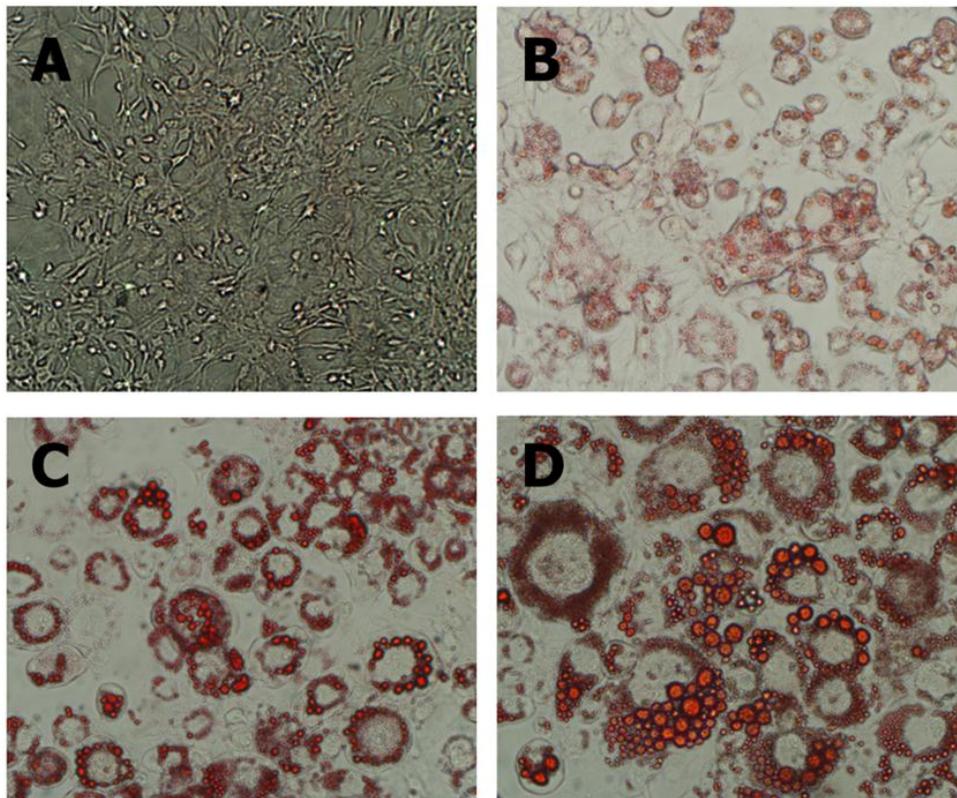
**A** Stearyl-CoA **B** Malonyl-CoA.

## 6.3 Ergebnisse

### 6.3.1 Adipogene Induktion von 3T3-Prädipozyten

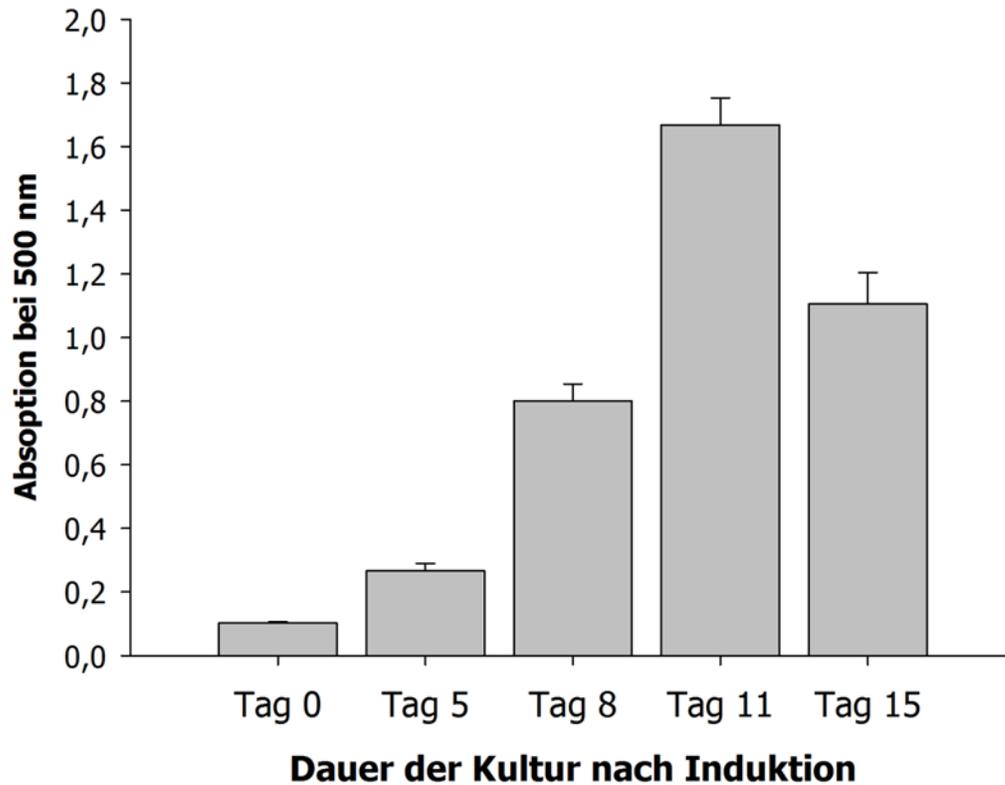
#### 6.3.1.1 Bestimmung der Lipidakkumulation mittels Oil-Red-O-Färbung

Nach erfolgter adipogener Differenzierung wurde die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen gemessen. Der mikroskopische Befund der Färbung zeigte eine deutliche Zunahme von Fett im Laufe der Zeit (Abbildung 67). Die Lipidakkumulation, ermittelt durch Oil-Red-O-Färbung, nahm bis zu Tag elf zu, an Tag 15 hingegen war sie geringer als an Tag elf, jedoch immer noch höher als an Tag acht (Abbildung 68).



**Abbildung 67. Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen nach adipogener Differenzierung.**

Mikroskopiert mit einem Olympus Inversmikroskop CK2 in 125-facher Vergrößerung, aufgenommen mit der digitalen Spiegelreflexkamera Nikon D80. **A** Tag 0 ohne Induktion, **B** Tag 5 nach Induktion, **C** Tag 11 nach Induktion, **D** Tag 15 nach Induktion.

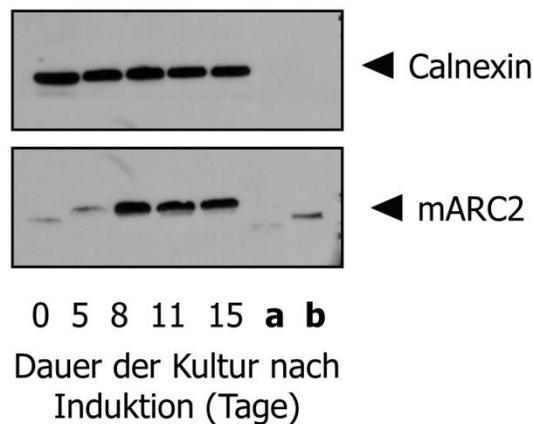


**Abbildung 68. Oil-Red-O-Färbung von 3T3-L1-Zellen nach adipogener Differenzierung.**

Der Farbstoff Oil-Red-O wurde nach erfolgter Färbung der akkumulierten Lipide der Zellen mit 100 % Isopropanol eluiert und das Eluat bei 500 nm im Photometer vermessen. Bei den ermittelten Werten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei Ansätzen (Wells), die jeweils dreifach vermessen wurden.

### 6.3.1.2 Western Blot-Analyse

Die Proteinmenge von mARC2 nahm nach adipogener Differenzierung mit zunehmender Kulturdauer zu (Abbildung 69). mARC1 konnte nicht untersucht werden, da kein Antikörper mit Reaktivität gegen das murine mARC1 verfügbar ist.

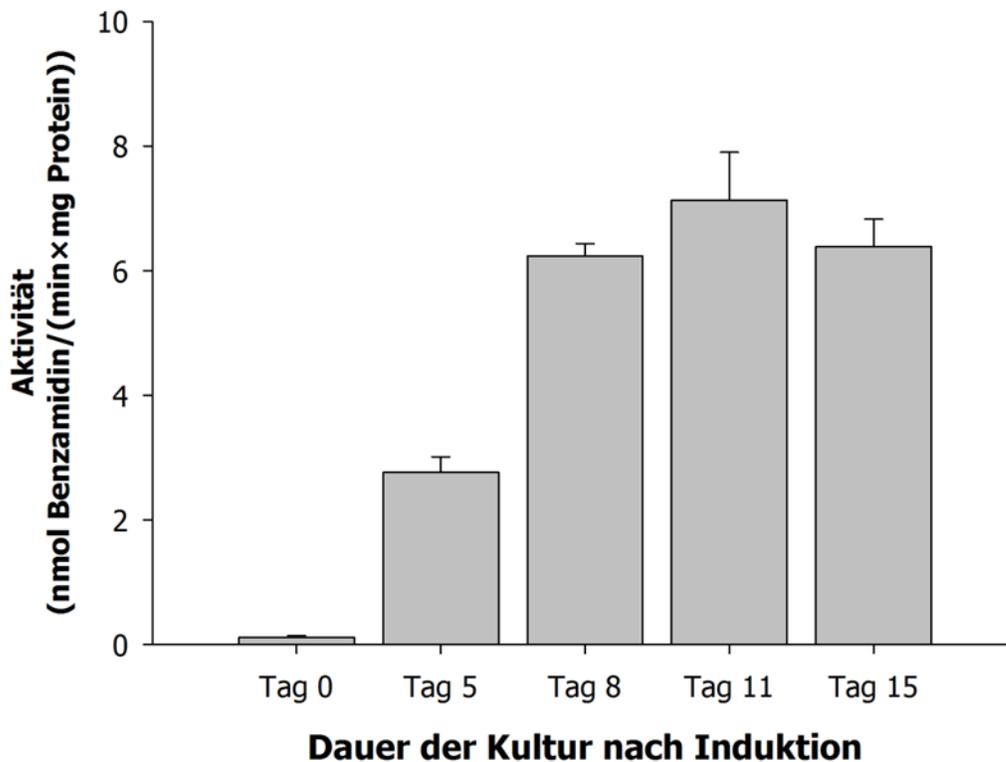


**Abbildung 69. Western Blot-Analyse von 3T3-L1-Zellen nach adipogener Differenzierung.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 35 µg Protein in Form von Lysaten je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierbei repräsentierte jedes Lysat ein Well der Zellkulturplatte. Zur Detektion kamen anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:1.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet. Als Kontrolle wurden 50 ng rekombinant hergestellte mARC-Proteine aufgetragen: **a** = mARC1, **b** = mARC2. Die Spur des Molekulargewichtsmarkers wurde aus der Abbildung entfernt.

### 6.3.1.3 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität

Nach erfolgter adipogener Differenzierung wurde die *N*-reduktive Aktivität in 3T3-L1-Zellen gemessen. Die Aktivität war für Zellen auf einem auffällig hohen Niveau (ca. Faktor 10 im Vergleich mit HMCL oder HEK-293), nahm bis zu Tag elf zu, an Tag 15 hingegen war sie geringer als an Tag elf, jedoch immer noch höher als an Tag acht (Abbildung 70).

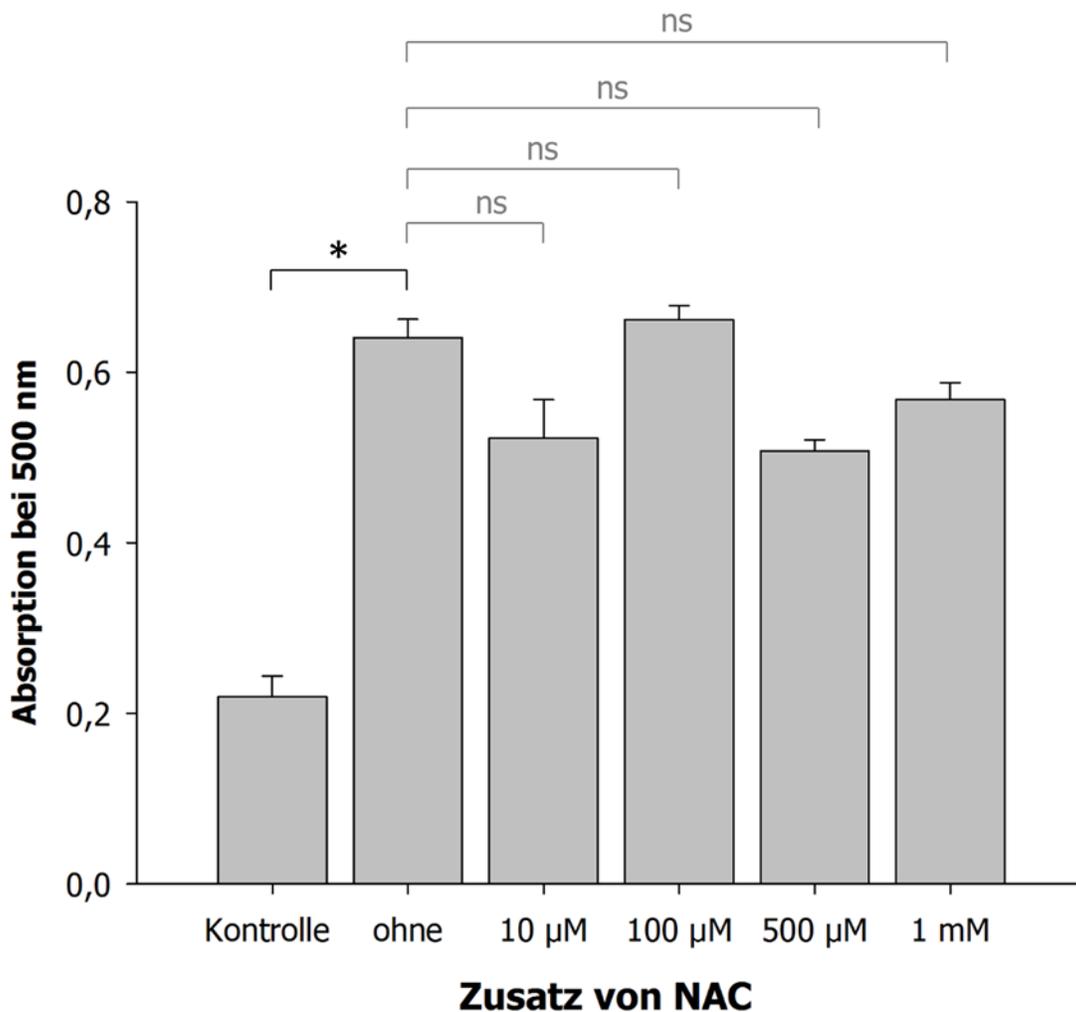


**Abbildung 70. *N*-reduktive Aktivität von 3T3-L1-Zellen nach adipogener Differenzierung.**

Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte mit 5 mM Benzamidoxim im Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min. Der Metabolit Benzamidin wurde im Inkubationspuffer per HPLC Analytik quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von drei parallel inkubierten Ansätzen (Wells), die jeweils doppelt vermessen wurden.

#### 6.3.1.4 Adipogene Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mit NAC-Zusatz

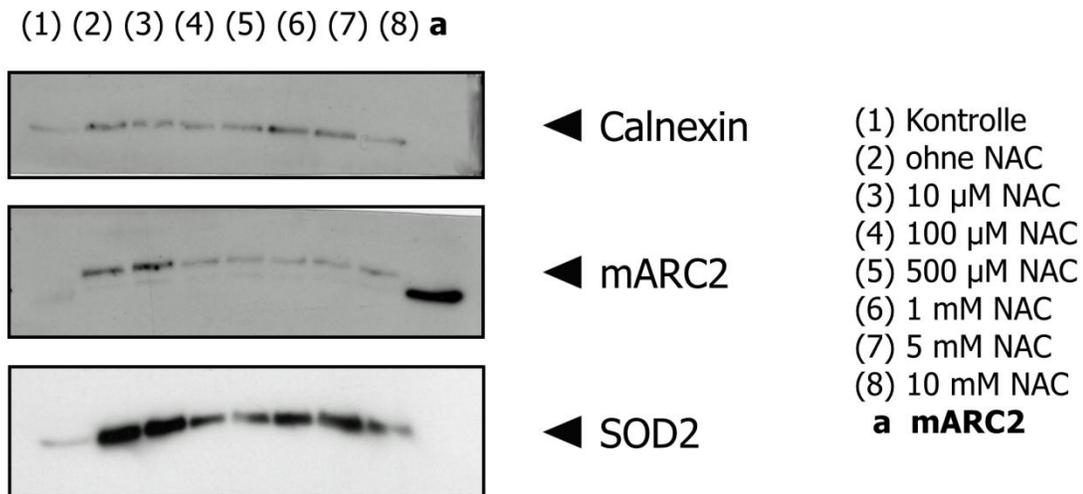
Nach adipogener Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mit NAC-Zusatz zeigte sich eine verringerte Lipidakkumulation (Oil-Red-O-Färbung) bei Zusatz von 10, 500 und 1.000  $\mu$ M NAC zum Induktions- und Folgemedium (Abbildung 71), die jedoch im Vergleich zum Ansatz ohne NAC nicht statistisch signifikant war (t-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 71. Oil-Red-O-Färbung von 3T3-L1-Zellen nach adipogener Differenzierung mit NAC-Zusatz.**

Der Farbstoff Oil-Red-O wurde nach erfolgter Färbung der akkumulierten Lipide der Zellen mit 100 % Isopropanol eluiert und das Eluat bei 500 nm im Photometer vermessen. Bei den ermittelten Werten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei Ansätzen (Wells), die jeweils dreifach vermessen wurden. Kontrolle: Zellen ohne adipogene Differenzierung, „ohne“ Zellen nach adipogener Differenzierung aber ohne Zusatz von NAC. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, ns = nicht signifikant.

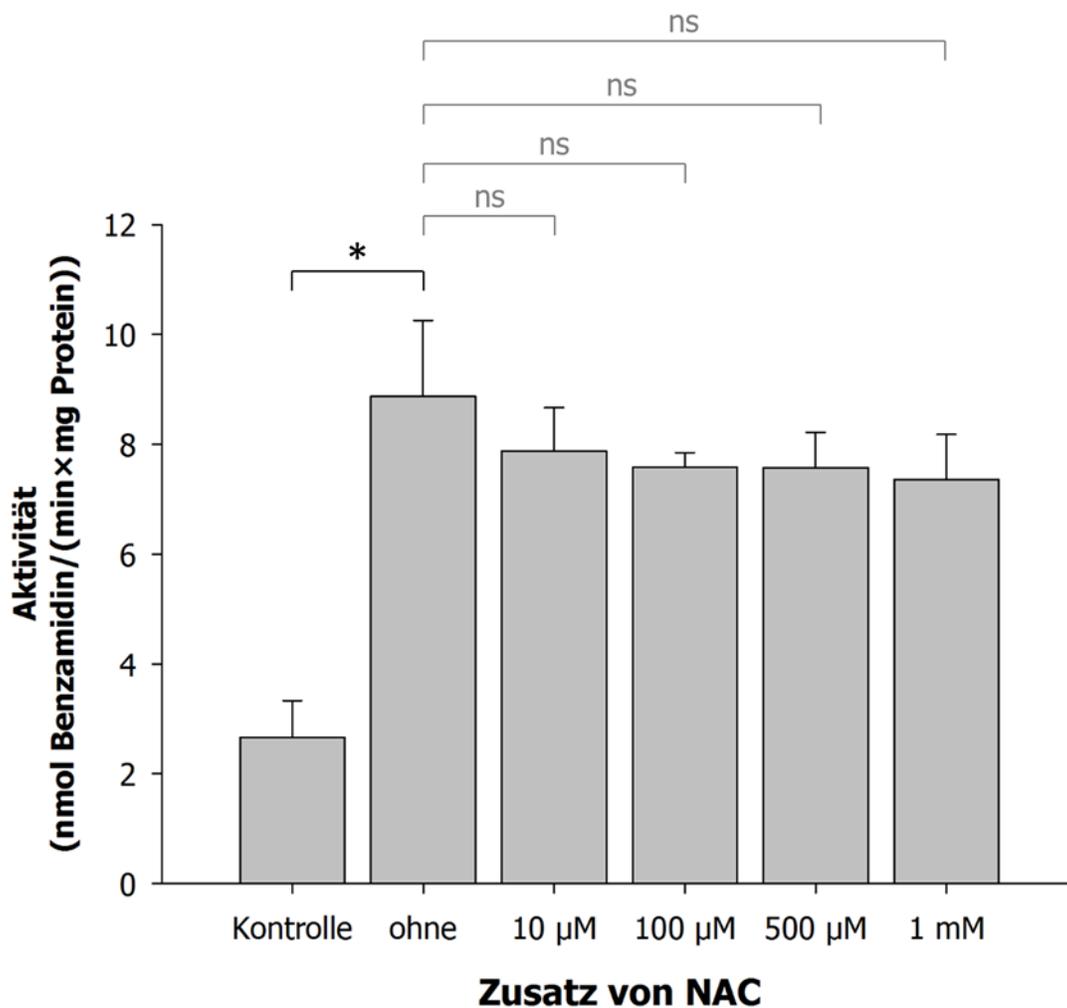
Im Western Blot hingegen waren deutlich reduzierte Proteinmengen für mARC2 in allen Ansätzen mit einer NAC-Konzentration größer als 10  $\mu$ M im Vergleich zur Kultur ohne NAC erkennbar, die Proteinlevel für SOD2 verhielten sich ebenso (Abbildung 72).



**Abbildung 72. Western Blot-Analyse von 3T3-L1-Zellen nach adipogener Differenzierung mit NAC-Zusatz.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 35  $\mu$ g Protein in Form von Lysaten je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierbei repräsentierte jedes Lysat ein Well der Zellkulturplatte. Zur Detektion kamen anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000, anti-SOD2-Antikörper der Verdünnung 1:2.500, sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:1.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet. Als Kontrolle wurden 50 ng rekombinant hergestelltes mARC2 aufgetragen. Die Spur des Molekulargewichtsmarkers wurde aus der Abbildung entfernt. Kontrolle: Zellen ohne adipogene Differenzierung.

Die *N*-reduktive Aktivität der Ansätze mit NAC lag geringfügig unterhalb der Kulturansätze ohne NAC (Abbildung 73), die Unterschiede waren jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 73. *N*-reduktive Aktivität von 3T3-L1-Zellen nach adipogener Differenzierung mit NAC-Zusatz.**

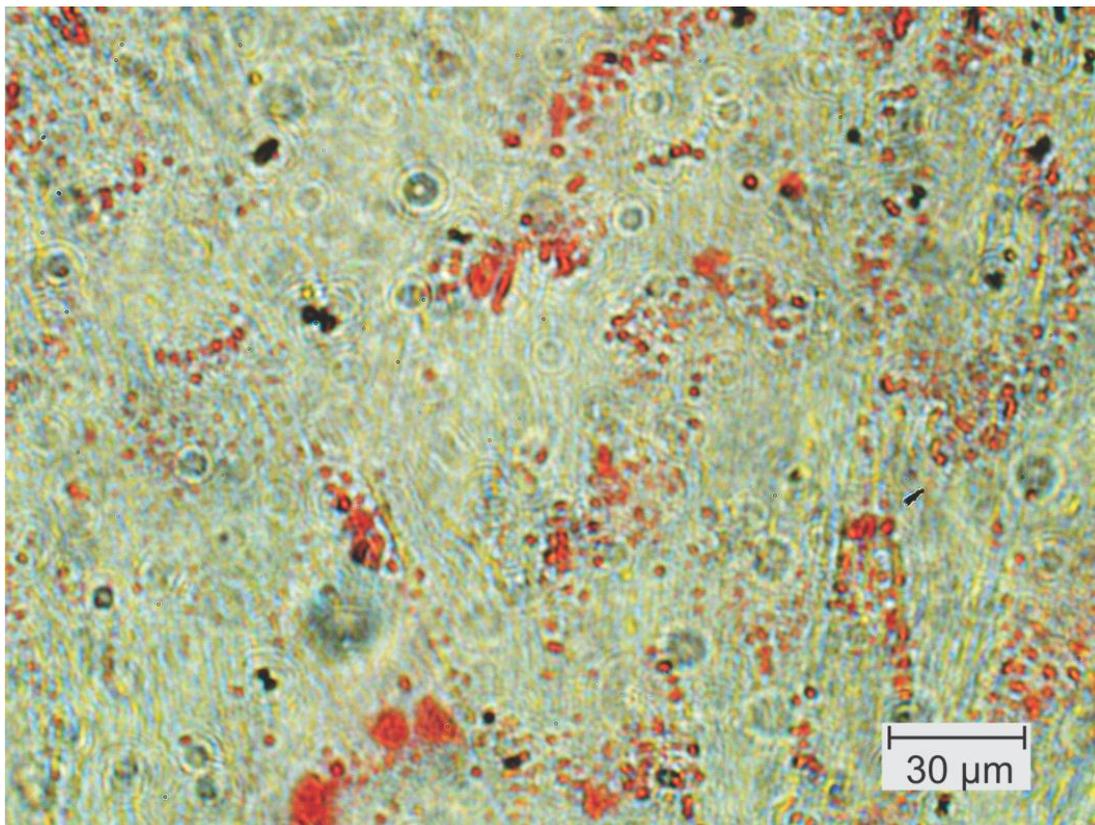
Die Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität erfolgte mit 5 mM Benzamidoxim im Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min. Der Metabolit Benzamidin wurde im Inkubationspuffer per HPLC-Analytik quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von drei parallel inkubierten Ansätzen (Wells), die jeweils doppelt vermessen wurden. Kontrolle: Zellen ohne adipogene Differenzierung, „ohne“ Zellen nach adipogener Differenzierung aber ohne Zusatz von NAC. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet, ns = nicht signifikant.

### 6.3.2 Adipogene Induktion von hMSCs

Im Falle der hMSCs wurden insgesamt drei Versuche der adipogenen Differenzierung unternommen. Die Zellen wachsen sehr langsam und sind im Umgang anspruchsvoll.

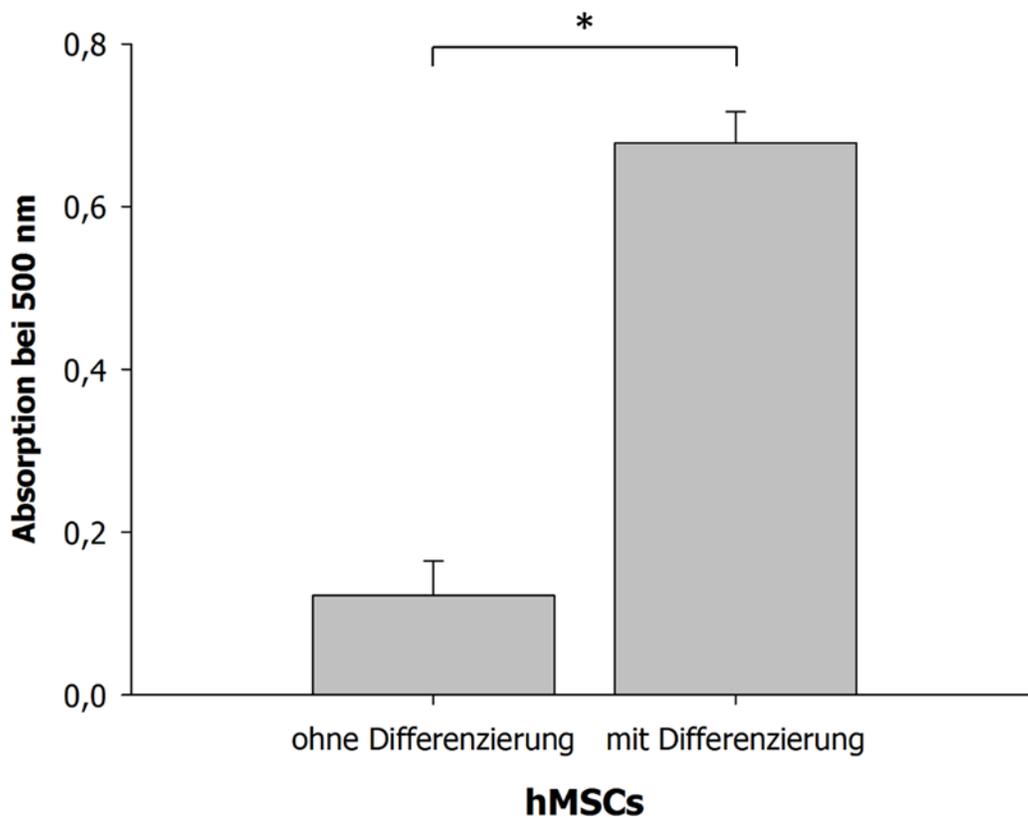
### 6.3.2.1 Bestimmung der Lipidakkumulation mittels Oil-Red-O-Färbung

In allen durchgeführten Versuchen konnte eine statistisch signifikante Zunahme der Absorption bei 500 nm nach erfolgter Oil-Red-O-Färbung festgestellt werden (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 75). Auch im mikroskopischen Befund waren die Veränderung der äußeren Form zu rundlichen Zellen sowie die Ansammlung von Lipidtröpfchen innerhalb der Zellen gut erkennbar, allerdings waren die Lipidtröpfchen kleiner und feiner verteilt als im Falle der murinen 3T3-L1-Zellen (Abbildung 74).



**Abbildung 74. hMSCs nach adipogener Differenzierung und Oil-Red-O-Färbung.**

Mikroskopiert mit einem Olympus Inversmikroskop CK2 in 125-facher Vergrößerung, aufgenommen mit der digitalen Spiegelreflexkamera Nikon D80.

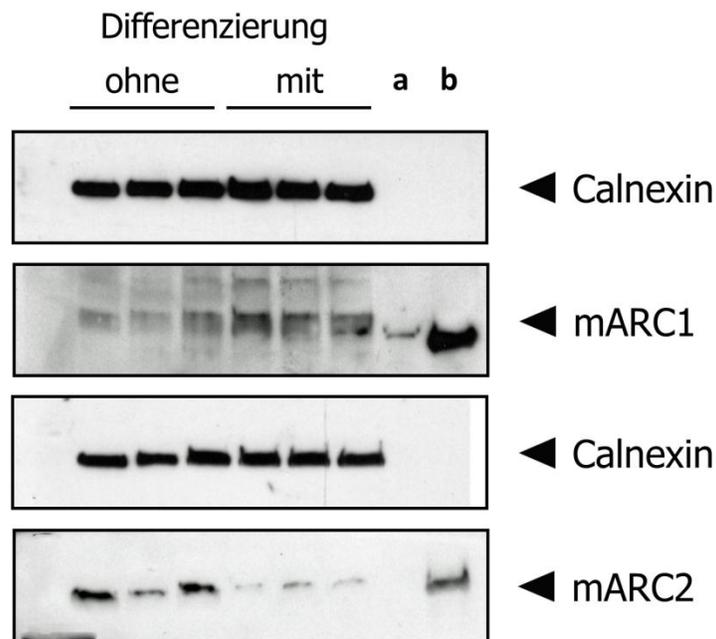


**Abbildung 75. Oil-Red-O-Färbung von hMSCs nach adipogener Differenzierung.**

Der Farbstoff Oil-Red-O wurde nach erfolgter Färbung der akkumulierten Lipide der Zellen mit 100 % Isopropanol eluiert und das Eluat bei 500 nm im Photometer vermessen. Bei den ermittelten Werten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei Ansätzen (Wells), die jeweils dreifach vermessen wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

#### 6.3.2.2 Western Blot-Analyse nach adipogener Differenzierung

Im ersten Experiment, in welchem eine Zunahme der *N*-reduktiven Aktivität auftrat, konnten weder mARC1 noch mARC2 detektiert werden. Im zweiten Experiment, in welchem ebenfalls eine Zunahme der *N*-reduktiven Aktivität auftrat, konnte mARC2 nicht detektiert werden, für mARC1 war jedoch eine Zunahme erkennbar. Im dritten Experiment, in welchem eine Abnahme der *N*-reduktiven Aktivität auftrat, war ein Rückgang von mARC2 sowie eine Zunahme von mARC1 in den Zellen nach adipogener Differenzierung im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen erkennbar (Abbildung 76).

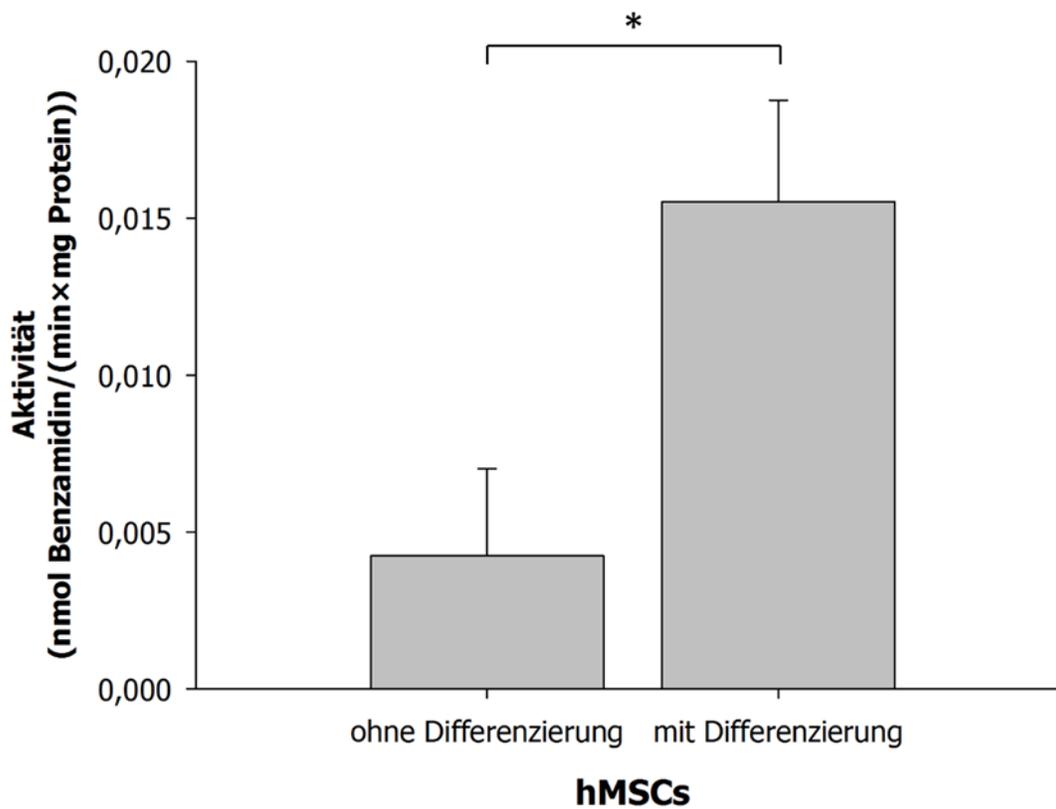


**Abbildung 76. Western Blot-Analyse von hMSCs nach adipogener Differenzierung.**

Nach erfolgter SDS-PAGE mit 30 µg Protein in Form von Lysaten je Spur wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierbei repräsentierte jedes Lysat ein Well der Zellkulturplatte. Zur Detektion kamen anti-mARC1-Antikörper und anti-mARC2-Antikörper in der Verdünnung 1:1.000 sowie anti-Calnexin-Antikörper der Verdünnung 1:1.000 als Ladekontrolle zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase-gekoppelter anti-Rabbit-IgG-Antikörper der Verdünnung 1:10.000 verwendet. Als Kontrolle wurden 50 ng rekombinant hergestellte Proteine für mARC1 und mARC2 aufgetragen; mARC1-Western Blot: **a** = mARC2, **b** = mARC1, mARC2-Western Blot **a** = mARC1, **b** = mARC2. Die Spur des Molekulargewichtsmarkers wurde aus der Abbildung entfernt.

**6.3.2.3 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität**

In zwei der drei durchgeführten Versuche wurde die *N*-reduktive Aktivität nach adipogener Differenzierung statistisch signifikant gesteigert (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 77), allerdings waren die absoluten Werte der Aktivität auf einem vergleichsweise geringen Niveau (Faktor 10 kleiner als bei HEK-293/ HMCL, Faktor 100 kleiner als bei 3T3-L1-Zellen). Lediglich in einem der durchgeführten Experimente nahm die *N*-reduktive Aktivität nach erfolgreicher adipogener Differenzierung (mikroskopischer Befund, Färbung) ab.

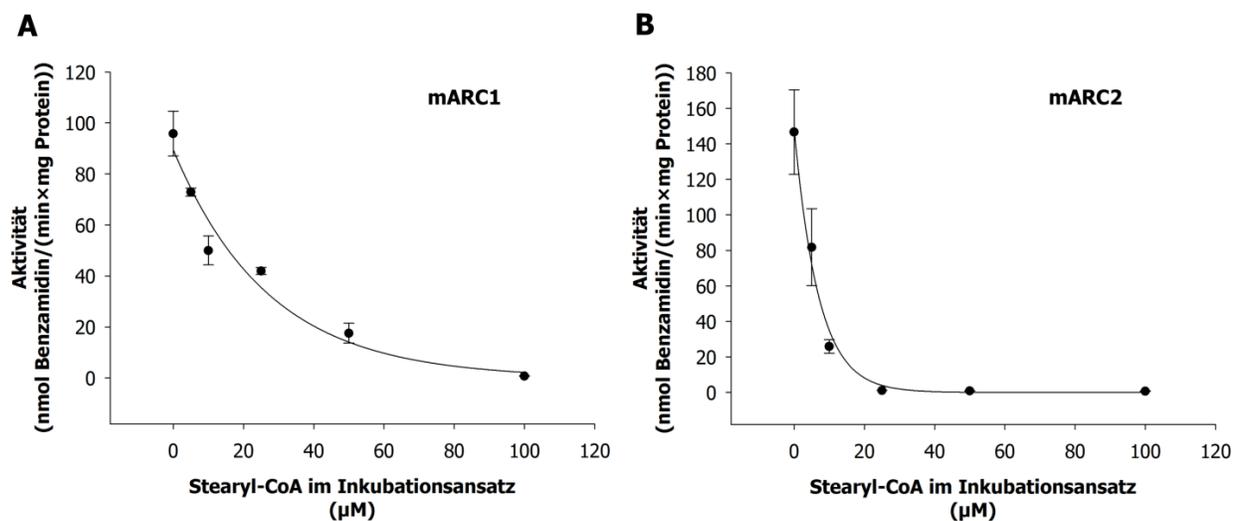


**Abbildung 77. N-reduktive Aktivität in hMSCs nach adipogener Differenzierung.**

Die Bestimmung der N-reduktiven Aktivität erfolgte mit 5 mM Benzamidoxim im Inkubationspuffer und einer Inkubationsdauer von 120 min. Der Metabolit Benzamidin wurde im Inkubationspuffer per HPLC Analytik quantifiziert. Bei den ermittelten Aktivitäten handelt sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von drei parallel inkubierten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

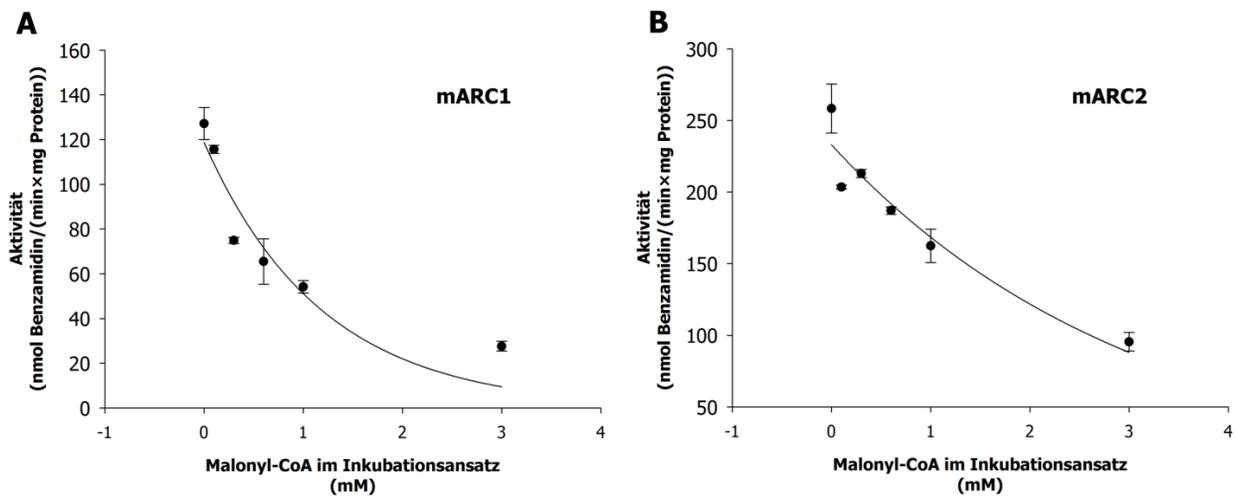
### 6.3.3 Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität durch Acyl-CoAs im *in vitro* Biotransformationsansatz rekombinant hergestellter Proteine

Die *N*-reduktive Aktivität des humanen rekombinant hergestellten, rekonstituierten Enzymsystems mit CYB5B, CYB5R und mARC1 bzw. mARC2 wird durch den Zusatz von Stearyl-CoA oder Malonyl-CoA gehemmt. Im Falle von Stearyl-CoA ist diese Hemmung für mARC2 stärker ausgeprägt als für mARC1 (Abbildung 78) und liegt im mikromolaren Bereich. Für Malonyl-CoA sind die zu verzeichnenden Hemmungen der *N*-reduktiven Aktivität für mARC1 und mARC2 vergleichbar und liegen im millimolaren Bereich (Abbildung 79). Somit stellt Stearyl-CoA einen deutlich stärkeren Inhibitor als Malonyl-CoA dar.



**Abbildung 78. Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität von mARC1 und mARC2 durch Stearyl-CoA.**

10 µg mARC1 oder mARC2, CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYB5R in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in MES-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH und Stearyl-CoA im Konzentrationsbereich von 0-100 µM für 20 min inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. **A** mARC1, **B** mARC2.



**Abbildung 79. Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität von mARC1 und mARC2 durch Malonyl-CoA.**

10 µg mARC1 oder mARC2, CYB5B in einer 76 pmol Häm-entsprechenden Menge und CYB5R in einer 7,6 pmol FAD-entsprechenden Menge wurden in MES-Puffer pH 6,0 mit 3 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH und Malonyl-CoA im Konzentrationsbereich von 0-3 mM für 20 min inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl Methanol wurden die Ansätze aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Aktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier parallel inkubierter Ansätze, die jeweils doppelt vermessen wurden. **A** mARC1, **B** mARC2.

## 6.4 Diskussion

Nachdem in vorangegangenen Studien Hinweise auf die Verknüpfung von *N*-reduktivem System und Energie- bzw. Fettstoffwechsel deutlich geworden waren, wurden *in vitro* Studien in Adipozytenmodellen und Studien mit dem *N*-reduktiven System und Acyl-CoAs durchgeführt.

Im murinen 3T3-L1-Adipozytenmodell wurden die Veränderungen in Bezug auf mARC bei der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten untersucht.

Die Zellen konnten erfolgreich der adipogenen Differenzierung unterzogen werden. Sowohl im mikroskopischen Befund als auch durch die Oil-Red-O-Färbung ließ sich die Akkumulation von Lipiden nachweisen. Das äußere Erscheinungsbild der Zellen veränderte sich von länglichen, fibroblastenartigen Strukturen zu runden, adipozytenartigen Zellen. Im selben Maße wie Lipide akkumulierten, nahm auch die *N*-reduktive Aktivität und die Proteinmenge von mARC2 zu. Für mARC1 konnten keine Western Blot Untersuchungen angestellt werden, da kein Antikörper gegen murines mARC1 zur Verfügung steht. Somit konnten die bereits von Anderen gefundenen Erkenntnisse, dass das Vorkommen von mARC2 und die *N*-reduktive Aktivität während der adipogenen Differenzierung von 3T3-L1 zunehmen (Neve *et al.*, 2012; Newton *et al.*, 2011), bestätigt werden. Neve *et al.* beschrieben für mARC1 ebenfalls einen Anstieg der mRNA nach adipogener Differenzierung (Neve *et al.*, 2012); Newton *et al.* konnten allerdings keinen Anstieg an mARC1-Protein in ihrer auf Proteomic-Techniken basierenden Studie finden (Newton, 01. Nov. 2012, persönliche Korrespondenz mit Billy Newton, Texas). Diskrepanzen zwischen mRNA und Proteinnengen für die mARC-Proteine waren allerdings auch in eigenen Studien in Mäusen (Kapitel 5) zu verzeichnen. Folglich sollte die Induktion von 3T3-L1 zu Adipozyten wiederholt werden, sobald ein Antikörper gegen das murine mARC1 zur Verfügung steht, um Erkenntnisse über

Veränderungen und ggf. Unterschiede zwischen den beiden Isoformen des mARC-Proteins zu erlangen.

Es wurde ferner beschrieben, dass die Differenzierung von 3T3-L1 zu Adipozyten mit einem massiven Anstieg an oxidativem Stress einhergeht (Calzadilla *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2011) und sich die Lipidakkumulation während der Differenzierung durch Zusatz von NAC antagonisieren lässt. In eigenen Studien zur Differenzierung mit NAC-Zusatz ließ sich lediglich ein geringfügiger Rückgang der Färbung mit Oil-Red-O und somit der Lipidakkumulation beobachten. Die von Calzadilla *et al.* gefundenen Ergebnisse konnten so nicht bestätigt werden. Calzadilla *et al.* verwendeten 10  $\mu\text{M}$  NAC zur Induktion, da sie bei Konzentrationen größer als 50  $\mu\text{M}$  NAC zytotoxische Effekte beobachteten (Calzadilla *et al.*, 2011). In vorangegangenen, eigenen Dosisfindungsversuchen konnte dies nicht bestätigt werden, hingegen waren größere NAC-Konzentrationen nötig, um überhaupt Effekte auf die Lipidakkumulation, gemessen als Oil-Red-O-Färbung, zu erreichen. Calzadilla *et al.* verwendeten zur Bestimmung der Lipidakkumulation allerdings nicht die Oil-Red-O-Färbung, sondern bestimmten die Konzentration an Lipiden mit Hilfe eines Assay-Kits, welches auf einer enzymatischen Reaktion beruht (Calzadilla *et al.*, 2011). Möglicherweise war die von uns gewählte Methode weniger empfindlich und mögliche Effekte durch NAC-Zusatz konnten erst bei höheren Konzentrationen detektiert werden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den notwendigen NAC-Konzentrationen. Denkbar wäre auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen gegenüber NAC aufgrund z.B. des Alters bzw. der Passagezahl der Zellen.

Die *N*-reduktive Aktivität nahm in den von uns durchgeführten Versuchen unter NAC-Zusatz ebenfalls nur geringfügig ab. Im Western Blot hingegen ließ sich ein deutlich vermindertes Vorkommen von mARC2 ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  NAC verzeichnen. Außerdem wurde das Vorkommen von SOD2, ein antioxidativ wirksames

Protein und somit Markerprotein für oxidativen Stress, untersucht. Auch das Vorkommen von SOD2 nahm mit zunehmender NAC-Konzentration während der Differenzierung ab. Das verminderte Vorkommen von mARC2 beeinflusst die *N*-reduktive Aktivität folglich lediglich geringfügig. Eine mögliche Erklärung wäre ggf. im Vorkommen von mARC1 zu suchen, welches ebenfalls zur *N*-reduktiven Aktivität der Zellen beitragen könnte, dessen Proteinvorkommen aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers allerdings nicht untersucht werden konnte. Trotzdem lässt sich, wie bereits für HMCL und HEK-293 gezeigt, die Induktion des mARC2-Proteins durch NAC antagonisieren. Wie bereits für HEK-293 und HMCL diskutiert (3.4.1), könnte es sich hierbei um einen direkten Einfluss von NAC auf z.B. das GSSG/GSH-Gleichgewicht handeln, da für 3T3-L1 ein Anstieg der intrazellulären GSH-Konzentration durch NAC-Zusatz während der Differenzierung beschrieben ist (Calzadilla *et al.*, 2011). Eine Antagonisierung der Induktion über den verringerten oxidativen Stress, vermittelt durch gesteigerte GSH-Konzentrationen und angezeigt durch den Rückgang des Vorkommens von SOD2, wäre ebenfalls denkbar. Welcher der möglichen Gründe bei 3T3-L1 zugrunde liegt, oder ob gegebenenfalls ein weiterer unbekannter Mechanismus verantwortlich ist, lässt sich aufgrund der gewonnenen Daten nicht sagen. Da aber im Falle von HEK-293 und HMCL keine Induktion von mARC aufgrund von gesteigertem oxidativem Stress zu verzeichnen war (3.4.1), gibt es keine Hinweise, dass der während der Differenzierung von 3T3-L1 zu Adipozyten auftretende gesteigerte oxidative Stress (Calzadilla *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2011) für die Induktion des mARC-Proteins verantwortlich ist. Weitere Studien, die die Differenzierung von 3T3-L1 und die Veränderungen in Bezug auf mARC unter Zusatz eines anderen, nicht das GSSG/GSH-Gleichgewicht beeinflussenden Antioxidans, untersuchen, könnten zur Klärung dieser Frage beitragen. Wahrscheinlicher ist eine Induktion des Proteins aufgrund der Anpassung der metabolischen Gegebenheiten der 3T3-L1-Zellen an den Fettstoffwechsel, wie sie bereits durch Newton *et al.* (Newton *et al.*, 2011) beschrieben wurde.

Da im Falle der murinen 3T3-L1-Adipozyten nur die Betrachtung der mARC2-Proteinmengen möglich war, wurden humane hMSCs der adipogenen Differenzierung unterzogen. Für Proteine humanen Ursprungs stehen Antikörper sowohl gegen mARC1 als auch gegen mARC2 zur Verfügung. Die adipogene Differenzierung der hMSCs war erfolgreich, im mikroskopischen Befund und mittels Oil-Red-O-Färbung ließ sich die Akkumulation von Lipiden nachweisen. Allerdings war dies auf einem deutlich geringeren Niveau als bei 3T3-L1 der Fall, die Lipidtröpfchen waren kleiner und feiner verteilt. Auch eine verlängerte Kultivierung führte nicht zu einer weiteren Zunahme an Lipiden. Trotzdem ließen sich eine gesteigerte *N*-reduktive Aktivität in zwei von drei Experimenten und ein Zunahme von mARC1 nachweisen. mARC2 war nur in einem Fall detektierbar, hier nahm die Proteinmenge nach der Differenzierung ab; dies ging mit einer reduzierten *N*-reduktiven Aktivität einher. Die gesteigerte Proteinmenge von mARC1 konnte die verminderte Proteinmenge von mARC2 in Bezug auf die *N*-reduktive Aktivität in diesem Experiment nicht kompensieren. In den übrigen Versuchen lag mARC2 unterhalb der Nachweisgrenze. Die in den Versuchen verwendeten hMSCs stammten jeweils aus dem Nabelschnurblut unterschiedlicher Spender und unterschieden sich in ihrer Kultivierbarkeit und Wachstumsgeschwindigkeit. Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten könnten in interindividuellen Unterschieden der Spenderzellen begründet sein. Im Vergleich zu 3T3-L1 war die Ausbeute an zu Adipozyten differenzierten Zellen gering (mikroskopische Befunde) und erklärt somit die relativ geringe *N*-reduktive Aktivität (Faktor 10 kleiner als bei HEK-293/HMCL, Faktor 100 kleiner als bei 3T3-Zellen) sowie die zum Teil unterhalb der Nachweisgrenze befindlichen Proteinmengen des mARC-Proteins. Anders als bei 3T3-L1-Zellen, die ausschließlich zu Adipozyten differenzieren, ist die Differenzierung von hMSCs zu den unterschiedlichen möglichen Zelltypen komplizierter. Die *in vitro* Differenzierung von hMSCs kann von vielen Faktoren und Parametern beeinflusst werden (Janderová *et al.*, 2003), folglich wäre ein Optimierung der

Differenzierungsprotokolle mit höheren Ausbeuten an Adipozyten hilfreich, um genauere Aussagen über die Veränderungen in Bezug auf die mARC-Proteine machen zu können. Außerdem wäre die Verwendung von hMSCs, die aus dem humanen Fettgewebe gewonnen werden, ebenfalls sinnvoll. Aus bisher unbekanntem Gründen differenzieren hMSCs aus Fettgewebe einfacher zu Adipozyten als hMSCs aus Knochenmark oder Nabelschnurblut (Stolzing, 10. Okt. 2012, persönliche Korrespondenz mit Dr. Stolzing, Leipzig; Väänänen, 2005). Zusammenfassend lässt sich dennoch sagen, dass die adipogene Differenzierung mit Veränderungen in Bezug auf die mARC-Proteine einhergeht. Des Weiteren scheinen sich Unterschiede zwischen mARC1 und mARC2 durch die Differenzierung von hMSCs zu Adipozyten abzuzeichnen. Dies deutet evtl. auf unterschiedliche endogene Funktionen der beiden Proteine hin und könnte ein Grund für das Vorkommen zweier Isoformen sein. Da mARC2 allerdings nur in einem Experiment detektiert werden konnte, wären hierzu weitere Studien nötig.

Versuche mit den Acyl-CoAs Stearyl-CoA und Malonyl-CoA zeigten eine Inhibition der *N*-reduktiven Aktivität des humanen rekombinant hergestellten rekonstituierten Systems durch diese Substanzen. Somit konnten die von Schwering (Schwering, 2010) gefundenen Ergebnisse für Schweinelebermitochondrien im rekombinant hergestellten, rekonstituierten, humanen System bestätigt werden. Durch welchen Mechanismus die Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität des dreigliedrigen Enzymsystems zustande kommt, ist jedoch unklar. Stearyl-CoA ist ein Substrat der SCD. Dieses Enzym ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und katalysiert dort die Synthese von einfach ungesättigten Fettsäuren aus Acyl-CoA. Hierbei arbeitet das Enzym, ähnlich wie mARC, in einem dreigliedrigen Enzymsystem mit CYB5B und CYB5R. Unter Verbrauch von NADPH und der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser werden Doppelbindungen in Acyl-CoAs eingeführt (Paton *et al.*, 2009). Es wäre folglich denkbar, dass die Inhibition des *N*-reduktiven Systems über Interaktionen mit den in beiden Systemen vertretenen Partnerproteinen CYB5B und CYB5R erfolgt und nicht mit dem mARC-Protein als solches

verknüpft ist. Zur Aufklärung dieser Frage sind weitere Experimente nötig. Acyl-CoAs werden neben ihrer Funktion als Intermediate des Energiestoffwechsels weitere Funktionen als Signalmoleküle in Transport- und Transkriptionsprozessen und in der Apoptose zugeschrieben (Shrago, 2000). Es wäre also ebenfalls denkbar, dass die Inhibition des mARC-haltigen Enzymsystems über Stearyl- bzw. Malonyl-CoA eine regulatorische Wirkung hat. Für Malonyl-CoA ist eine Regulation des Lipidstoffwechsels beschrieben. Malonyl-CoA blockiert dabei die mitochondriale Carnitin-Palmitoyl-Transferase, die für den Import von Fettsäuren ins Mitochondrium und somit deren weiteren Abbau in der  $\beta$ -Oxidation verantwortlich ist. Vereinfacht gesagt begünstigen hohe Konzentrationen an Malonyl-CoA die Synthese von Fettsäuren, geringe Konzentrationen hingegen den katabolen Lipidmetabolismus (Foster, 2012; Paton *et al.*, 2009). Abschließend sollte die Möglichkeit, dass es sich bei Stearyl- bzw. Malonyl-CoA um alternative Substrate des *N*-reduktiven Systems handelt, nicht völlig außer Acht gelassen werden, auch wenn dies unwahrscheinlich erscheint. Da keines der Moleküle ein oxygeniertes Stickstoffatom enthält, was bisher in allen für mARC beschriebenen Substraten der Fall ist, würde hier eine bisher völlig unbekannte Reaktion zu Grunde liegen. Da sich im Laufe dieser Arbeit weitere Hinweise auf die Verknüpfung des mARC-haltigen Enzymsystems mit dem Energie- bzw. Fettstoffwechsel ergeben haben, ist die Interaktion des dreigliedrigen Enzymsystems mit Stearyl- bzw. Malonyl-CoA durchaus interessant. Da allerdings die genaue endogene Funktion von mARC weiterhin unklar ist, sind auch Effekte einer möglichen Inhibition weiterhin unklar.

## 6.5 Zusammenfassung

In den in diesem Kapitel beschriebenen Studien konnte zum einen gezeigt werden, dass das Vorkommen und die Aktivität des mARC-Proteins im Laufe der Differenzierung und Reifung von Adipozyten aus 3T3-L1-Vorläuferzellen und hMSCs zunimmt. Dies weist auf die Notwendigkeit des Enzyms in reifen Adipozyten hin und ist somit ein weiterer

Hinweis auf die Verknüpfung des mARC-haltigen Enzymsystems mit dem Lipidstoffwechsel. Des Weiteren ließ sich die Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität des mARC-haltigen Enzymsystems durch Stearyl- bzw. Malonyl-CoA bestätigen. Gründe und Folgen dieser Interaktion des Enzymsystems mit diesen Intermediaten des Lipidstoffwechsels verbleiben unklar, dennoch ist auch dies ein weiterer Hinweis zur Verknüpfung mit dem Energie- bzw. Lipidstoffwechsel.

## 7 Schlussfolgerung und Zusammenfassung

Die Mitochondrien, der Ort an dem das mARC-Protein lokalisiert ist, können als Zentrum des Energiestoffwechsels betrachtet werden (Patti *et al.*, 2010). Eine Verknüpfung des mARC-Enzymsystems mit dem Energiestoffwechsel ist folglich denkbar und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht, um weitere Erkenntnisse zur möglichen endogenen Funktion des mARC-Proteins zu erlangen.

Es konnte gezeigt werden, dass mARC durch Glukose in Zellkulturen induziert wird (Kapitel 3). Auch das diabetische STZ-Mausmodell zeichnete sich neben erhöhten Plasmaglukosewerten bei *Diabetes mellitus* durch ein vermehrtes Vorkommen von mARC2 sowie erhöhte *N*-reduktive Aktivität aus (Kapitel 3). Mäuse, die mit HFD gefüttert wurden, zeigten ebenfalls erhöhte Plasmaglukosewerte (Hennig *et al.*, 2014) sowie vermehrtes Vorkommen von mARC2 und vermehrte *N*-reduktive Aktivität (Kapitel 5). Folglich ist es denkbar, dass mARC sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Glukose induziert wird. Eine Verbindung mit dem Fettstoffwechsel ist ebenso plausibel. Erhöhte Plasmaglukosewerte sind eine Voraussetzung zur Bildung von Speicherfetten (Berg *et al.*, 2002). Die mit HFD gefütterten Mäuse bildeten bis zu einem Alter von 19 Wochen vermehrt Speicherfette, dies war durch Gewichtszunahme zu erkennen. Ältere (40 Wochen), mit HFD gefütterte Mäuse, die keiner Gewichtszunahme mehr unterlagen, zeigten hingegen kein vermehrtes Vorkommen an mARC2 und lediglich geringfügig erhöhte *N*-reduktive Aktivität (Kapitel 5). Es wäre also denkbar, dass das mARC-Protein an Vorkommen und Aktivität zunimmt, wenn die Bildung von Speicherfetten stattfindet. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit außerdem gezeigt werden konnte, dass das mARC Protein durch Nahrungsaufnahme reguliert wird und Nahrungskarenz in verminderter Proteinmenge und Aktivität des *N*-reduktiven Systems resultiert (Kapitel 5), steht im Einklang mit dieser Hypothese: Nahrungskarenz stellt den Organismus auf den

Verbrauch und nicht auf die Synthese von Energiespeichern wie Fetten oder Glykogen ein (Berg *et al.*, 2002). Für eine Beteiligung von mARC am Fettstoffwechsel sprechen auch die Ergebnisse anderer Gruppen. Teslovich *et al.* beschrieben 2011 einen *SNP* im Bereich des mARC1 Locus, der mit veränderten Blutlipidprofilen einhergeht und Aslibekyan *et al.* zeigten für denselben *SNP* ein verändertes Ansprechen auf den Lipidsenker Fenofibrat (Aslibekyan *et al.*, 2012). Die von Islinger und Wiese beschriebene Lokalisation des mARC-Proteins in Peroxisomen (Islinger *et al.*, 2007; Wiese *et al.*, 2007) könnte ebenfalls auf eine Beteiligung des Proteins am Fettstoffwechsel hindeuten, da das Peroxisom der Ort ist, an dem sowohl verzweigte als auch sehr langkettige Fettsäuren metabolisiert werden. Mitochondrien und Peroxisomen ergänzen hierbei ihre Stoffwechsellätigkeiten (Le Borgne, 2012). Allerdings ist die Funktion von mARC in Peroxisomen bisher ebenfalls nicht aufgeklärt. Für mARC1 ist ferner eine hohe Expression in humanen Adipozyten beschrieben (Su *et al.*, 2004) und neben der *N*-reduktiven Aktivität der humanen Leber wurde auch Aktivität im humanen Fettgewebe detektiert (Andersson *et al.*, 2005). Dem eigenen Arbeitskreis gelang es allerdings bisher nicht, im Rahmen von Studien zur Gewebeverteilung von mARC in porcinen Geweben, Mitochondrien aus dem Fettgewebe zu reinigen (Krischkowski, Dissertation in Vorbereitung), um Informationen über das Vorkommen der beiden mARC-Proteine und deren Aktivität zu gewinnen. Die Reinigung von Mitochondrien aus diesem Gewebe ist schwierig und gelingt selten. Gelingt sie allerdings, ist mit hohen Ausbeuten zu rechnen (Neve, 20. Juli 2012, persönliches Gespräch mit Etienne Neve im Rahmen des 12<sup>th</sup> European ISSX and 19<sup>th</sup> MDO Meeting, Noordwijk an Zee, die Niederlande, 2012). Eigene Studien zeigten die Zunahme von mARC2 und *N*-reduktiver Aktivität durch adipogene Differenzierung von 3T3-L1-Zellen (Kapitel 6) und bestätigten so die bereits von Newton *et al.* und Neve *et al.* veröffentlichten Ergebnisse (Neve *et al.*, 2012; Newton *et al.*, 2011). Neve *et al.* konnten ferner zeigen, dass der Knockdown von mARC2 in 3T3-L1-Zellen zu verminderter Lipogenese in diesen Zellen führt (Neve *et al.*, 2012), dies deutet somit auf eine

Beteiligung des mARC-Proteins an der Lipogenese hin. Die im Rahmen des International Mouse Phenotyping Consortium erstellte mARC2-Knockout-Maus weist unter anderem einen verminderten Körperfettanteil sowie eine erhöhte fettfreie Körpermasse auf (Brown *et al.*, 2012), dies könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine Beteiligung des mARC-Proteins an der Lipogenese sein.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass der Cystein-Donor NAC in Zellkulturen von HMCL, HEK-293 und 3T3-L1 in der Lage ist, das Vorkommen von mARC bzw. die *N*-reduktive Aktivität zu reduzieren (Kapitel 3 und 6). Der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings bisher nicht aufgeklärt. Interessanterweise fanden Lin *et al.*, dass die Gabe von NAC bei Mäusen, die mit fetthaltiger Diät gefüttert werden, die Zunahme an Körperfett reduziert. Dies geht mit einer verminderten Expression von Enzymen des anabolen Fettstoffwechsels sowie der verminderten Expression von *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) des Typ 2 und 1c und erhöhten GSH-Spiegeln einher (Lin *et al.*, 2008). Die Transkriptionsfaktoren der SREBP-Familie regulieren Gene des Fett- und Cholesterolfstoffwechsels (Reed *et al.*, 2008). Es wäre also denkbar, dass die Suppression der SREBPs durch NAC auch in Zellkulturen zur verminderten Aktivität der Enzyme des Fettstoffwechsels und mARC führt. Eine Regulation von mARC durch die Familie der SREBPs scheint durchaus plausibel. Reed *et al.* konnten bereits zeigen, dass einer der Bestandteile des *N*-reduktiven Systems, CYB5B, über SREBP reguliert wird. Ferner wurde bereits bewiesen, dass SREBP in Mäusen durch HFD herauf- und durch Nahrungskarenz herabreguliert wird (Ide *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2012). Das Vorkommen und die Aktivität des mARC-Proteins würden somit der Tendenz von Expression und dem Vorkommen von SREBP folgen. Eigene Daten in Kooperation mit Dr. Mikula in Warschau zeigen ebenfalls eine verminderte Expression von SREBP1 durch Nahrungskarenz bei Mäusen. Weitere Studien zur Regulation von mARC durch SREBP sind Gegenstand eigener derzeitiger Forschung.

Ein weiterer möglicher Zusammenhang von mARC-Protein und Fett- bzw. Energiestoffwechsel ist eine regulatorischen Funktion über das Signalmolekül NO. Kotthaus *et al.* konnten 2011 zeigen, dass mARC in der Lage ist, das Intermediat der L-Arginin-abhängigen NO-Synthese,  $N^{\omega}$ -hydroxy-L-arginin, zu reduzieren und somit in die Bildung von NO durch die Enzyme der NO-Synthasen (NOS) einzugreifen (Kotthaus *et al.*, 2011). NO reguliert eine Vielzahl der metabolischen Vorgänge des Energiestoffwechsels, z.B. fördert es die Lipolyse und Fettsäureoxidation sowie die Glukoseoxidation. Lipogenese und Glykogensynthese hingegen werden durch NO gehemmt (Jobgen *et al.*, 2006). Durch die Reduktion von  $N^{\omega}$ -hydroxy-arginin durch mARC wird folglich die Synthese von NO durch die cytoplasmatisch lokalisierten NOS-Enzyme (eNOS und iNOS) zurückgedrängt und somit eine Stoffwechsellage, die die Synthese von Energieträgern begünstigt, gefördert.

Die im Rahmen diese Arbeit gefundenen Erkenntnisse weisen gemeinsam mit den Ergebnissen anderer Gruppen auf eine Verknüpfung des mARC-Proteins mit dem Energie- und Fettstoffwechsel hin. Die genau Funktion, die endogenen Substrate sowie mögliche Regulationen sind bisher nicht aufgeklärt und bedürfen weiterer Forschung.

## 8 Materialien und Geräte

### 8.1 Verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril (HPLC grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acrylamind (Rotiphorese <sup>®</sup> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniak	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ammoniumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DTT	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
MES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol (HPLC grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver (Blotting grade)	Merck KGaA, Darmstadt
NADH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumoctylsulfonat	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween <sup>®</sup> 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt

## 8.2 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Cary 50 Scan UV-visible Spectrophotometer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Cawomat 2000 IR	Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen
Digital Thermostatic Shaker DTS-4 (Tischinkubator)	Elmi Ltd., Riga, Lettland
Diverse Glasgeräte und Flaschen mit Schraubdeckel	Schott AG, Mainz
Eppendorf <i>Multipette plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf <i>Referenz</i> Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf <i>Research pro</i> Mehrkanalpipetten (50-1200 µl, 20-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
GFL 1033 Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

## Materialien und Geräte

Hämocytometer	Menzel GmbH Co KG, Braunschweig
Heraeus B5060 EK/CO <sub>2</sub> Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Hettich Mikrozentrifuge 200	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Kirchlengern
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E Rotor JA10	Beckman Coulter, Krefeld
IKA VF2 Schüttler	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
IKA Vibrax VXR basic Schüttler	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Integra Pipettboy <sup>®</sup>	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools, Schorndorf
Laminar Air HB2448 Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Millipore Schlauchpumpe für Organperfusion Model XX8200230	Millipore GmbH, Schwalbach
Mini-Protecan <sup>®</sup> Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Herkules, USA
Mister Frosty <sup>™</sup> Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Olympus CK2 Inversmikroskop	Olympus, Hamburg
Peq Power Supply 300	PEQLAB Ltd., Sarisbury Green, UK
pH Messgerät inoLab <sup>®</sup> pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Potter S Homogenisator mit Teflonpistil (2 ml)	Sartorius AG, Göttingen
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Waage Sartorius CP 225D	Sartorius AG, Göttingen
Waage Sartorius L2200P	Sartorius AG, Göttingen
Zirbus Dampfsterilisator LTA 32/35	Zirbus technology GmbH, Bad Grund

### 8.3 Für die Kultivierung von Zellen und sonstige Versuche verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgegenstand	Hersteller
12-Well-Zellkulturplatten mit Deckel, Polystyrol Art. Nr. 665180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen, Polystyrol Art. Nr. 831.810.002	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
6-Well-Zellkulturplatten mit Deckel, Polystyrol Art. Nr. 662160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen, Polystyrol Art. Nr. 831.813.002	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
96-Well Microtiterplatten, Polystyrol Flat Bottom Art. Nr. 655101	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Abdeckfolie für 96-Well-Platten Art. Nr. 9409386	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Combitips plus Biopur 10 ml Art. Nr. 928 36 46 CDC 450	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips plus Biopur 5 ml Art. Nr. 928 36 45 CDC 450	Eppendorf AG, Hamburg
Filterspitzen gestopft 10 µl Art. Nr. 70.1114.210	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

## Materialien und Geräte

Filterspitzen gestopft 1000 µl Art. Nr. 70.762.211	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filterspitzen gestopft 200 µl Art. Nr. 70.760.211	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Injekt <sup>®</sup> Einwegspritzen 100 ml Art. Nr. 4606055V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Injekt <sup>®</sup> Einwegspritzen 5ml Art. Nr. 4606051V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Multiflex <sup>®</sup> -Pipettenspitzen 1-200 µl Art. Nr. Y419.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Parafilm <sup>®</sup> M Art. Nr. 701650	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Pasteurpipetten aus Glas	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl,	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plastibrand <sup>®</sup> UV-Küvetten micro Art. Nr. 759230	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten 10 ml Art. Nr. 861.254.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten 2 ml Art. Nr. 861.252.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten 25 ml Art. Nr. 861.685.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Serologische Pipetten 5 ml Art. Nr. 861.253.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterifix <sup>®</sup> Injektionsfilter Art. Nr. 4099206	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zellschaber mit 2-Positionsklinge, Gummi Art. Nr. 83.1832	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugen-Tubes konisch 15 ml Art. Nr. 62.554.512	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugen-Tubes konisch 50 ml Art. Nr. 62.547.254	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

#### **8.4 Für die Kultivierung von Zellen verwendete Medien und Reagenzien**

<b>Medium/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM 4,5 g/l Glukose Mit Natriumpyruvat, Phenolrot und stabilem Glutamin Art. Nr. E15-843	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMEM 1,0 g/l Glukose Mit Natriumpyruvat, Phenolrot und stabilem Glutamin Art. Nr. E15-806	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

## Materialien und Geräte

<p>DMEM ohne Glukose ohne Natriumpyruvat, ohne stabiles Glutamin mit Phenolrot Art. Nr. E15-079</p>	<p>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</p>
<p>DMEM low glucose Art. Nr. D5546</p>	<p>Gibco by life technologies™, Carlsbad, USA</p>
<p>Dulbecco's PBS 1 x ohne Calcium und Magnesium Art. Nr. H15-002</p>	<p>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</p>
<p>FBS Fetal Bovine Serum (FCS) Art. Nr. 10270</p>	<p>Gibco by life technologies™, Carlsbad, USA</p>
<p>Fetal Bovine Serum (FCS) Standard Quality Art. Nr. A15-101</p>	<p>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</p>
<p>Fungizone® Amphotericin B 250 µg/ml Art. Nr. 15290-018</p>	<p>Gibco by life technologies™, Carlsbad, USA</p>
<p>Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)10 x Art. Nr. H1641</p>	<p>Sigma-Aldrich, Steinheim</p>
<p>HEPES 1 M Art. Nr. 15630</p>	<p>Gibco by life technologies™, Carlsbad, USA</p>
<p>Insulin-Transferrin-Selenium-A 100 x Art. Nr. 51300-044</p>	<p>Gibco by life technologies™, Carlsbad, USA</p>
<p>L-Glutamin 200 mM Art. Nr. nM11-004</p>	<p>PAA Laboratories, Pasching, Österreich</p>

Penicillin/Streptomycin 100 x Art. Nr. P11-010	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Sodium Pyruvate 100 mM Art. Nr. 11360	Gibco by life technologies™, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA 1 x, UV-radiated Art. Nr. L11-004	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

## 8.5 Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Actin-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. A2066	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-Calnexin-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. AP03028SU-N	Acris Antibodies, Herford
anti-CYB5B-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. HPA007893	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-CYB5R-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. HPA001566	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-GAPDH-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. ab9483	Abcam, Cambridge, UK
anti-HistoneH3-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. ab1791	Abcam, Cambridge, UK
anti-Kaninchen-IgG-Antikörper Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt Wirt: Ziege Art. Nr. 111-035-003	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

## Materialien und Geräte

---

anti-mARC1-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. AP9754c	Abgent, San Diego, USA
anti-mARC2-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. HPA015085	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-PCK1-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. ab28455	Abcam, Cambridge, UK
anti-SOD2-Antikörper Wirt: Kaninchen Art. Nr. HPA001814	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-VDAC2-Antikörper Wirt: Ziege Art. Nr. AP16225PU-N	Acris Antibodies, Herford
anti-Ziege-IgG-Antikörper Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt Wirt: Esel Art. Nr. 705-035-003	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

## Literaturverzeichnis

Alberts, B **(2011)**: Molekularbiologie der Zelle. 5. vollst. überarb. Aufl. *Wiley-VCH*, Weinheim; 114-134.

Andersson, S; Hofmann, Y; Nordling, A; Li, X-q; Nivelius, S; Andersson, T B; Ingelman-Sundberg, M; Johansson, I **(2005)**: Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of N-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug Metab. Dispos.* 33 (4), 570–578.

Aslibekyan, S; Goodarzi, M O; Frazier-Wood, A C; Yan, X; Irvin, M R; Kim, E; Tiwari, H K; Guo, X; Straka, R J; Taylor, K D; Tsai, M Y; Hopkins, P N; Korenman, S G; Borecki, I B; Chen, Y-D I; Ordovas, J M; Rotter, J I; Arnett, D K **(2012)**: Variants identified in a GWAS meta-analysis for blood lipids are associated with the lipid response to fenofibrate. *PLoS ONE* 7 (10), e48663.

Bajt, M L; Knight, T R; Lemasters, J J; Jaeschke, H **(2004)**: Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. *Toxicol. Sci.* 80 (2), 343–349.

Berg, J M; Tymoczko, J L; Stryer, L **(2002)**: Biochemistry. 5th ed. *W.H. Freeman*, New York, Section 30.3, Food Intake and Starvation Induce Metabolic Changes. Verfügbar bei: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22414/>.

Berg, J M; Tymoczko, J L; Stryer, L; Gatto, G J **(2013)**: Biochemie. 7. Aufl. *Springer Spektrum*, Heidelberg, 736-737.

Boland, M L; Chourasia, A H; Macleod, K F **(2013)**: Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Front Oncol* DOI: 10.3389/fonc.2013.00292.

Brown, S D M; Moore, M W **(2012)**: The International Mouse Phenotyping Consortium: past and future perspectives on mouse phenotyping. *Mamm. Genome* 23 (9-10), 632–640.

Brownlee, M **(2005)**: The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54 (6), 1615–1625.

Calzadilla, P; Sapochnik, D; Cosentino, S; Diz, V; Dicelio, L; Calvo, J C; Guerra, L N **(2011)**: N-Acetylcysteine Reduces Markers of Differentiation in 3T3-L1 Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (10), 6936–6951.

Catherwood, M A; Powell, L A; Anderson, P; McMaster, D; Sharpe, P C; Trimble, E R **(2002)**: Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int.* 61 (2), 599–608.

Chen, X; Li, X; Wang, P; Liu, Y; Zhang, Z; Zhao, G; Xu, H; Zhu, J; Qin, X; Chen, S; Hu, L; Kong, X **(2010)**: Novel association strategy with copy number variation for identifying new risk Loci of human diseases. *PLoS ONE* 5 (8), e12185.

Clement, B; Mau, S; Deters, S; Havemeyer, A **(2005)**: Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the N-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([[1-[(2s)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyloxy]-acetic acid). *Drug Metab. Dispos.* 33 (11), 1740–1747.

Criddle, D N; Gillies, S; Baumgartner-Wilson, H K; Jaffar, M; Chinje, E C; Passmore, S; Chvanov, M; Barrow, S; Gerasimenko, O V; Tepikin, A V; Sutton, R; Petersen, O H **(2006)**: Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 281 (52), 40485–40492.

Da Cruz, S; Xenarios, I; Langridge, J; Vilbois, F; Parone, P A; Martinou, J-C **(2003)**: Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 278 (42), 41566–41571.

Dambrova, M; Uhlén, S; Welch, C J; Wikberg, J E **(1998)**: Identification of an N-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur. J. Biochem.* 257 (1), 178–184.

Dröge, W **(2002)**: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82 (1), 47–95.

Eastbrook, R W; Werringloer, J **(1978)**: The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol.* 52, 212–220.

Foster, D W **(2012)**: Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J. Clin. Invest.* 122 (6), 1958–1959.

Froriep, D **(2013)**: Reduktion N-oxygenerter Verbindungen durch die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC). Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Pharmazeutisches Institut.

Froriep, D; Clement, B; Bittner, F; Mendel, R R; Reichmann, D; Schmalix, W; Havemeyer, A **(2013)**: Activation of the anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica* 43 (9), 780–784.

Green, H; Kehinde, O **(1975)**: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5 (1), 19–27.

Gruenewald, S; Wahl, B; Bittner, F; Hungeling, H; Kanzow, S; Kotthaus, J; Schwering, U; Mendel, R R; Clement, B **(2008)**: The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *J. Med. Chem.* 51 (24), 8173–8177.

Havemeyer, A; Bittner, F; Wollers, S; Mendel, R; Kunze, T; Clement, B **(2006)**: Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J. Biol. Chem.* 281 (46), 34796–34802.

Havemeyer, A; Grünewald, S; Wahl, B; Bittner, F; Mendel, R; Erdélyi, P; Fischer, J; Clement, B **(2010)**: Reduction of N-hydroxy-sulfonamides, including N-hydroxy-valdecoxib, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metab. Dispos.* 38 (11), 1917–1921.

Havemeyer, A; Lang, J; Clement, B **(2011)**: The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab. Rev.* 43 (4), 524–539.

Hennig E. E.; Mikula M.; Goryca K.; Paziewska A.; Ledwon J.; Nesteruk M.; Woszczynski M.; Walewska-Zielecka B.; Pysniak K.; Ostrwoski J **(2014)**: Extracellular matrix and cytochrome P450 gene expression can distinguish steatohepatitis from steatosis in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. DOI noch nicht verfügbar

Hermes-Lima, M; Willmore, W G; Storey, K B **(1995)**: Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19 (3), 271–280.

Hille, R; Nishino, T; Bittner, F **(2011)**: Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord. Chem. Rev.* 255 (9-10), 1179–1205.

Hunt, J V; Dean, R T; Wolff, S P **(1988)**: Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J.* 256 (1), 205–212.

Ide, T; Shimano, H; Yahagi, N; Matsuzaka, T; Nakakuki, M; Yamamoto, T; Nakagawa, Y; Takahashi, A; Suzuki, H; Sone, H; Toyoshima, H; Fukamizu, A; Yamada, N **(2004)**: SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat. Cell Biol.* 6 (4), 351–357.

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. *J. Biol. Chem.* 282 (32), 23055–23069.

Jakobs, H; Frieriep, D; Havemeyer, A; Mendel, R; Bittner, F; Clement, B **(2014)**: The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): Involvement in metabolic reduction of N-oxides, oximes and N-hydroxy-amidinohydrazones. *ChemMedChem*. DOI: 10.1002/cmdc.201402127.

Janderová, L; McNeil, M; Murrell, A N; Mynatt, R L; Smith, S R **(2003)**: Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes. Res.* 11 (1), 65–74.

Jensen, T; Kiersgaard, M; Sorensen, D; Mikkelsen, L **(2013)**: Fasting of mice: a review. *Laboratory Animals* 47 (4), 225–240.

Jiang, Z Y; Hunt, J V; Wolff, S P **(1992)**: Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202 (2), 384–389.

Jobgen, W S; Fried, S K; Fu, W J; Meininger, C J; Wu, G **(2006)**: Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* 17 (9), 571–588.

Jung, C H; Ahn, J; Jeon, T-I; Kim, T W; Ha, T Y **(2012)**: Syzygium aromaticum ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice through downregulation of adipogenic and lipogenic gene expression. *Exp. Ther. Med.* 4 (3), 409–414.

Kadlubar, F F; Ziegler, D M **(1974)**: Properties of a NADH-dependent N-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 162 (1), 83–92.

Kennedy, A J; Ellacott, Kate L J; King, V L; Hasty, A H **(2010)**: Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 3 (3-4), 156–166.

King, A J F; Fernandes, J R; Hollister-Lock, J; Nienaber, C E; Bonner-Weir, S; Weir, G C **(2007)**: Normal relationship of beta- and non-beta-cells not needed for successful islet transplantation. *Diabetes* 56 (9), 2312–2318.

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. *J. Biol. Chem.* 287 (51), 42795–42803.

Kotthaus, J; Wahl, B; Havemeyer, A; Kotthaus, J; Schade, D; Garbe-Schönberg, D; Mendel, R; Bittner, F; Clement, B **(2011)**: Reduction of N( $\omega$ )-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem. J.* 433 (2), 383–391.

Krompholz, N; Krischkowski, C; Reichmann, D; Garbe-Schönberg, D; Mendel, R-R; Bittner, F; Clement, B; Havemeyer, A **(2012)**: The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. *Chem. Res. Toxicol.* 25 (11), 2443–2450.

Kumar, S; Sitasawad, S L **(2009)**: N-acetylcysteine prevents glucose/glucose oxidase-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in H9c2 cells. *Life Sci.* 84 (11-12), 328–336.

Laemmli, U K **(1970)**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685.

Lattin, J E; Schroder, K; Su, A I; Walker, J R; Zhang, J; Wiltshire, T; Saijo, K; Glass, C K; Hume, D A; Kellie, S; Sweet, M J **(2008)**: Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome Res* DOI: 10.1186/1745-7580-4-5.

Le Borgne, F **(2012)**: Interaction between peroxisomes and mitochondria in fatty acid metabolism. *OJMIP* DOI: 10.4236/ojmip.2012.21005.

Lin, C C; Yin, M C **(2008)**: Effects of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 99 (1), 37–43.

Löffler, G; Schölmerich, J **(2008)**: Basiswissen Biochemie. Mit Pathobiochemie 7., komplett überarb. Aufl. *Springer (Springer-Lehrbuch)*, Heidelberg, 57-117.

Malhotra, P; Boddy, C S; Soni, V; Saksena, S; Dudeja, P K; Gill, R K; Alrefai, W A **(2013)**: D-Glucose modulates intestinal Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) gene expression via transcriptional regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304 (2), G203-10.

Malik, A N; Rossios, C; Al-Kafaji, G; Shah, A; Page, R A **(2007)**: Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 (1), 237–244.

Mendel, R R; Bittner, F **(2006)**: Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (7), 621–635.

Meugnier, E; Rome, S; Vidal, H **(2007)**: Regulation of gene expression by glucose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10 (4), 518–522.

Mikula, M; Rubel, T; Karczmarski, J; Goryca, K; Dadlez, M; Ostrowski, J **(2010)**: Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Funct. Integr. Genomics* 11 (2), 215–225.

Mutschler, E. **(2001)**: Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. 8., völlig neu bearb. und erw. Aufl. *Wiss. Verl.-Ges.*, Stuttgart, 105-110.

Nesteruk, M; Hennig, E E; Mikula, M; Karczmarski, J; Dzwonek, A; Goryca, K; Rubel, T; Paziewska, A; Woszczynski, M; Ledwon, J; Dabrowska, M; Dadlez, M; Ostrowski, J **(2013)**: Mitochondrial-related proteomic changes during obesity and fasting in mice are greater in the liver than skeletal muscles. *Funct. Integr. Genomics*. DOI: 10.1007/s10142-013-0342-3.

Neve, E P A **(2012)**: mARC in human adipose tissue. Persönliches Gespräch mit Heyka Jakobs. 12<sup>th</sup> European ISSX and 19<sup>th</sup> MDO Meeting, Noordwijk an Zee, Niederlande, 20. Juli 2012. Niederschrift/Kopie.

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. *J. Biol. Chem.* 287 (9), 6307–6317.

Neve, E P A; Nordling, A; Johansson I; Ingelman-Sundberg; M **(2008)**: Metabolism of drugs and other xenobiotics by enzyme systems present in the mitochondrial outer

membrane. Abstract zum Poster. 15<sup>th</sup> North American Regional ISSX Meeting, San Diego, USA, 12. - 16. Oktober 2008. Ausdruck

Newton, B **(2012)**: mARC1 in 3T3-L1 after Differentiation and enlargement/ Re. J. Proteome Res 10 (10), S. 4692–4702 2011. Email an Heyka Jakobs. Texas/ Kiel, 01.11 2012. Ausdruck.

Newton, B W; Cologna, S M; Moya, C; Russell, D H; Russell, W K; Jayaraman, A **(2011)**: Proteomic analysis of 3T3-L1 adipocyte mitochondria during differentiation and enlargement. *J. Proteome Res.* 10 (10), 4692–4702.

Nombela-Arrieta, C; Silberstein, L E **(2011)**: The identity and properties of mesenchymal stem cells. Poster, *Nature Publishing Group*, New York, online verfügbar <http://www.nature.com/nrm/posters/mscs/index.html>.

Panchal, S K; Brown, L **(2011)**: Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* DOI: 10.1155/2011/351982.

Paton, C M; Ntambi, J M **(2009)**: Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297 (1), E28-37.

Patti, M E; Corvera, S **(2010)**: The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 31 (3), 364–395.

Plitzko, B; Ott, G; Reichmann, D; Henderson, C J; Wolf, C R; Mendel, R; Bittner, F; Clement, B; Havemeyer, A **(2013)**: The involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2 and mitochondrial cytochrome b5 in N-reductive metabolism in human cells. *J. Biol. Chem.* 288 (28), 20228–20237.

Raab, R M; Bullen, J; Kelleher, J; Mantzoros, C; Stephanopoulos, G **(2005)**: Regulation of mouse hepatic genes in response to diet induced obesity, insulin resistance and fasting induced weight reduction. *Nutr Metab (Lond)* DOI: 10.1186/1743-7075-2-15.

Reed, B D; Charos, A E; Szekely, A M; Weissman, S M; Snyder, M **(2008)**: Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes. *PLoS Genet.* 4 (7), e1000133.

Sandbaumhüter, F **(2012)**: Untersuchungen zur Umsetzung von Wasserstoffperoxid, Nitrat und Methämoglobin durch mARC. Diplomarbeit. Christina-Albrechts-Universität, Kiel. Pharmazeutisches Institut.

Santos-Silva, T **(2013)**: Bacterial Monomeric aldehyde oxidase. Tagungsbeitrag. 2013 Molybdenum and Tungsten Enzymes Conference, Sintra, Portugal, 18. Juli 2013. Niederschrift.

Schwering, U **(2010)**: Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Pharmazeutisches Institut.

Sethe, S; Scutt, A; Stolzing, A **(2006)**: Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5 (1), 91–116.

Shrago, E **(2000)**: Long-chain acyl-CoA as a multi-effector ligand in cellular metabolism. *J. Nutr.* 130 (2S Suppl), 290S-293S.

Smith, P K; Krohn, R I; Hermanson, G T; Mallia, A K; Gartner, F H; Provenzano, M D; Fujimoto, E K; Goeke, N M; Olson, B J; Klenk, D C **(1985)**: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1), 76–85.

Sorensen, M; Sanz, A; Gómez, J; Pamplona, R; Portero-Otín, M; Gredilla, R; Barja, G **(2006)**: Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. *Free Radic. Res.* 40 (4), 339–347.

Sparacino-Watkins, C E; Tejero, J; Sun, B; Gauthier, M C; Thomas, J; Ragireddy, V; Merchant, B A; Wang, J; Azarov, I; Basu, P; Gladwin, M T **(2014)**: Nitrite Reductase and Nitric-oxide Synthase Activity of the Mitochondrial Molybdopterin Enzymes mARC1 and mARC2. *J. Biol. Chem.* 289 (15), 10345–10358.

Stewart, V; MacGregor, C H **(1982)**: Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: involvement of chlC, chlE, and chlG loci. *J. Bacteriol.* 151 (2), 788–799.

Stolzing, A **(2012)**: Kultivierung und Eigenschaften von hMSCs. Telefonat mit Heyka Jakobs. Leipzig/Kiel, 10. Okt. 2012. Niederschrift/Ausdruck.

Su, A I; Wiltshire, T; Batalov, S; Lapp, H; Ching, K A; Block, D; Zhang, J; Soden, R; Hayakawa, M; Kreiman, G; Cooke, M P; Walker, J R; Hogenesch, J B **(2004)**: A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (16), 6062–6067.

Teslovich, T M; Musunuru, K; Smith, A V; Edmondson, A C; Stylianou, I M; Koseki, M; Pirruccello, J P; Ripatti, S; Chasman, D I; Willer, C J; Johansen, C T; Fouchier, S W; Isaacs, A; Peloso, G M; Barbalić, M; Ricketts, S L; Bis, J C; Aulchenko, Y S; Thorleifsson, G; Feitosa, M F; Chambers, J; Orho-Melander, M; Melander, O; Johnson, T; Li, X; Guo, X; Li, M; Shin Cho, Y; Jin Go, M; Jin Kim, Y; Lee, J-Y; Park, T; Kim, K; Sim, X; Twee-Hee Ong, R; Croteau-Chonka, D C; Lange, L A; Smith, J D; Song, K; Hua Zhao, J; Yuan, X; Luan, J; Lamina, C; Ziegler, A; Zhang, W; Zee, R Y L; Wright, A F; Witteman, J C M; Wilson, J F; Willemsen, G; Wichmann, H-E; Whitfield, J B; Waterworth, D M; Wareham, N J; Waeber, G; Vollenweider, P; Voight, B F; Vitart, V; Uitterlinden, A G; Uda, M; Tuomilehto, J; Thompson, J R; Tanaka, T; Surakka, I; Stringham, H M; Spector, T D; Soranzo, N; Smit, J H; Sinisalo, J; Silander, K; Sijbrands, E J G; Scuteri, A; Scott, J; Schlessinger, D; Sanna, S; Salomaa, V; Saharinen, J; Sabatti, C; Ruukonen, A; Rudan, I; Rose, L M; Roberts, R; Rieder, M; Psaty, B M; Pramstaller, P P; Pichler, I; Perola, M; Penninx, B W J H; Pedersen, N L; Pattaro, C; Parker, A N; Pare, G; Oostra, B A; O'Donnell, C J; Nieminen, M S; Nickerson, D A; Montgomery, G W; Meitinger, T; McPherson, R; McCarthy, M I; McArdle, W; Masson, D;

Martin, N G; Marroni, F; Mangino, M; Magnusson, P K E; Lucas, G; Luben, R; Loos, R J F; Lokki, M-L; Lettre, G; Langenberg, C; Launer, L J; Lakatta, E G; Laaksonen, R; Kyvik, K O; Kronenberg, F; König, I R; Khaw, K-T; Kaprio, J; Kaplan, L M; Johansson, A; Jarvelin, M-R; Janssens, A C J W; Ingelsson, E; Igl, W; Kees Hovingh, G; Hottenga, J-J; Hofman, A; Hicks, A A; Hengstenberg, C; Heid, I M; Hayward, C; Havulinna, A S; Hastie, N D; Harris, T B; Haritunians, T; Hall, A S; Gyllensten, U; Guiducci, C; Groop, L C; Gonzalez, E; Gieger, C; Freimer, N B; Ferrucci, L; Erdmann, J; Elliott, P; Ejebe, K G; Döring, A; Dominiczak, A F; Demissie, S; Deloukas, P; Geus, E J C de; Faire, U de; Crawford, G; Collins, F S; Chen, Y-D I; Caulfield, M J; Campbell, H; Burt, N P; Bonnycastle, L L; Boomsma, D I; Boekholdt, S M; Bergman, R N; Barroso, I; Bandinelli, S; Ballantyne, C M; Assimes, T L; Quertermous, T; Altshuler, D; Seielstad, M; Wong, T Y; Tai, E-S; Feranil, A B; Kuzawa, C W; Adair, L S; Taylor, H A; Borecki, I B; Gabriel, S B; Wilson, J G; Holm, H; Thorsteinsdottir, U; Gudnason, V; Krauss, R M; Mohlke, K L; Ordovas, J M; Munroe, P B; Kooner, J S; Tall, A R; Hegele, R A; Kastelein, J J P; Schadt, E E; Rotter, J I; Boerwinkle, E; Strachan, D P; Mooser, V; Stefansson, K; Reilly, M P; Samani, N J; Schunkert, H; Cupples, L A; Sandhu, M S; Ridker, P M; Rader, D J; van Duijn, C M; Peltonen, L; Abecasis, G R; Boehnke, M; Kathiresan, S **(2010)**: Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466 (7307), 707–713.

Thews, G; Mutschler, E; Vaupel, P **(1999)**: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 135 Tabellen. 5., völlig neu bearb. und erw. Aufl. *Wiss. Verl.-Ges.*, Stuttgart, 335-336.

Todaro, G J; Green, H **(1963)**: Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17, 299–313.

Väänänen, H K **(2005)**: Mesenchymal stem cells. *Ann. Med.* 37 (7), 469–479.

Vaulont, S; Vasseur-Cognet, M; Kahn, A **(2000)**: Glucose regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275 (41), 31555–31558.

Wahl, B; Reichmann, D; Niks, D; Krompholz, N; Havemeyer, A; Clement, B; Messerschmidt, T; Rothkegel, M; Biester, H; Hille, R; Mendel, R R; Bittner, F **(2010)**: Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 285 (48), 37847–37859.

Wheeler, D C; Chana, R S; Topley, N; Petersen, M M; Davies, M; Williams, J D **(1994)**: Oxidation of low density lipoprotein by mesangial cells may promote glomerular injury. *Kidney Int.* 45 (6), 1628–1636.

Whitby, L G **(1953)**: A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* 54 (3), 437–442.

Wiese, S; Gronemeyer, T; Ofman, R; Kunze, M; Grou, C P; Almeida, J A; Eisenacher, M; Stephan, C; Hayen, H; Schollenberger, L; Korosec, T; Waterham, H R; Schliebs, W; Erdmann, R; Berger, J; Meyer, H E; Just, W; Azevedo, J E; Wanders, Ronald J A; Warscheid, B **(2007)**: Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Mol. Cell Proteomics* 6 (12), 2045–2057.

## Erklärung zu § 8 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Arbeit wurde, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die Arbeit ist unter Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis der deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

**Jakobs H., Mikula M., Havemeyer A., Strzalkowska A., Borowa-Chmielak M., Dzwonek A., Gajewska M., Hennig E., Ostrowski J., Clement B. (2014)**

The *N*-reductive system composed of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b5 (CYB5B) and cytochrome b5 reductase (CYB5R) is regulated by fasting and high-fat-diet in mice.

*PLOS ONE* (2014) 9 (8) e105371

**Jakobs H., Froriep D., Havemeyer A., Mendel R., Bittner F., Clement B. (2014)**

The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): Involvement in metabolic reduction of *N*-oxides, oximes and *N*-hydroxy-amidinohydrazones

*ChemMedChem* (2014) DOI: 10.1002/cmdc.201402127

**Jakobs H., Reichmann D., Bittner F., Mendel R., Clement B., Havemeyer A. (2011)**

Reduction of guanoxabenz by the mARC-containing enzyme system

Posterbeitrag, GDCh Jahrestagung, Saarbrücken

**Jakobs H., Reichmann D., Bittner F., Mendel R., Clement B., Havemeyer A. (2012)**

The molybdenum enzyme mARC: *N*-reductive activity in different cell lines

Posterbeitrag, 12<sup>th</sup> European ISSX and 19<sup>th</sup> MDO Meeting, Noordwijk an Zee,

Niederlande

**Jakobs H., Reichmann D., Bittner F., Mendel R., Clement B., Havemeyer A. (2012)**

The fourth molybdenum enzyme mARC: Expression and *N*-reductive activity in different cell lines

Posterbeitrag, DPhG Jahrestagung, Greifswald

**Jakobs H., Froriep D., Havemeyer A., Krischkowski C., Krompholz N., Plitzko B., Treuer E., Clement, B. (2012)**

mARC: A newly discovered human enzyme and its application in drug development

Posterbeitrag, Life Science in Kiel, Kiel

**Jakobs H., Mikula M., Havemeyer A., Ostrowski J., Clement B. (2013)**

The mARC-containing enzyme system: Influence of food intake

Posterbeitrag, 2013 Molybdenum & Tungsten Enzymes Conference, Sintra, Portugal

**Jakobs H., Mikula M., Havemeyer A., Ostrowski J., Clement B. (2014)**

The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is regulated during fasting in mice

Vortrag, DPhG International PhD students meeting 2014, Wuppertal

Kiel, im August 2014

Heyka Jakobs

## Danksagung

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

### **Prof. Dr. Bernd Clement**

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die Freiheit bei der Gestaltung sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

Prof. Dr. Thomas Kunze danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und für zahlreiche hilfreiche Ratschläge.

Dr. Antje Havemeyer danke ich für die unermüdliche Betreuung und für hilfreiche Anregungen und Ratschläge vor allem in allen mARC-Fragen.

Mein ganz besonderer Dank geht nach Warschau. Ich danke sehr herzlich Dr. Michal Mikula für die Kooperation bei Tierversuchen und qRT-PCR, die zahlreichen Diskussionen, Anregungen und Gespräche im Rahmen unserer gemeinsamen Arbeit sowie die Unterstützung im Rahmen unserer gemeinsamen Publikation. Ferner danke ich Dr. Marta Gajewska und ihrem Team für die Arbeit im Rahmen der Tierversuche und Artur Dzwonek für die Arbeit mit HepG2-Zellen. Prof. Dr. Ewa Hennig danke ich für die Bereitstellung muriner Gewebeproben. Ebenso möchte ich Prof. Dr. Jerzy Ostrowski danken, der diese Kooperation ermöglicht hat.

Ich danke Dr. Afshan Malik und Saman Mirazei in London für die Kooperation bei dem STZ-Mausmodell und der qRT-PCR sowie für die Bereitstellung von HMCL-Zellen.

## Danksagung

---

Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf-Reiner Mendel in Braunschweig für das zur Verfügung stellen von rekombinant hergestellten Proteinen.

Meiner Kollegin Carmen Krischkowski möchte ich für die Bereitstellung porciner subzellulärer Fraktionen danken.

Dr. Tamar Straube und Prof. Dr. Ralf Jacob aus Marburg danke ich für die Bereitstellung von RC 124-Zellen.

Dr. Janin Andres von der Charité Berlin danke ich für das zur Verfügung stellen von 3T3-L1-Zellen.

Dr. Dennis Schade danke ich für die Vermittlung des Kontaktes zu Dr. Alexandra Stolzing in Leipzig, welcher ich für die Bereitstellung von hMSCs danke.

Ich bedanke mich bei Sven Wichmann für die technische Unterstützung im Bereich der HPLC-Analytik und bei Petra Köster für die technische Unterstützung in allen wissenschaftlichen Lebenslagen.

Ich möchte Dr. Björn Cohrs, Dr. Julia von Bülow, Laura Schwarz und Swetlana Gabel für die unkomplizierte Zusammenarbeit in der Lehre danken.

Ich danke meinen Kollegen Dr. Nina Krompholz, Dr. Danilo Froiep, Dr. Karin Altmann, Eva Bauch, Dr. Sinja Bock, Dr. Ellen Mak, Dr. Julia von Bülow, Dr. Lukas Riebling, Tamara Steinhauer und Helene Geese für die nette Zusammenarbeit, für gute Ratschläge und für nette Pausen. Helene danke ich außerdem für die tolle Bürogemeinschaft.

Dr. Karin Altmann und Eva Bauch danke ich außerdem für das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke meiner Familie und vor allem meinem Mann Sören, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Heyka Hellena Jakobs

Geboren am 04. November 1984 in Emden

Staatsangehörigkeit deutsch

### Wissenschaftlicher Werdegang

- Oktober 2010 – August 2014      Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement  
Thema „Studien zur Verknüpfung der mitochondrialen Amidoxim reduzierenden Komponente (mARC) mit dem Energiestoffwechsel“
- Juli 2010      Abschluss des dritten Teils der Pharmazeutischen Prüfung  
Erlangung der Approbation als Apothekerin
- Januar 2010 – Juni 2010      2. Halbjahr des praktischen Jahres in der Kastanienapotheke, Kiel
- Juli 2009 – Dezember 2009      1. Halbjahr des praktischen Jahres bei AstraZeneca AB, Mölndal/ Schweden.  
Anfertigung einer Diplomarbeit
- Mai 2009      Abschluss des zweiten Teils der Pharmazeutischen Prüfung
- August 2006      Abschluss des ersten Teils der Pharmazeutischen Prüfung
- Oktober 2004 – Mai 2009      Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Juni 2004      Abitur am Johannes-Althusius-Gymnasium, Emden  
Verleihung des Dr. Habbena-Preises

## Kurzfassung

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte in Säugern vorkommende Molybdoenzym (Havemeyer *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2010). Das Protein ist in der Lage als Bestandteil eines drei-Komponenten Enzymsystems mit mitochondrialem Cytochrom  $b_5$  und NADH Cytochrom  $b_5$ -Reduktase *N*-oxygenierte Verbindungen zu reduzieren (Havemeyer *et al.* 2011; Kotthaus *et al.* 2011; Plitzko *et al.*, 2013). Seine Beteiligung am *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus gilt als gesichert (Havemeyer *et al.* 2011; Froriep *et al.* 2013; Jakobs *et al.* 2014). Dennoch ist wenig über die endogene Funktion des Enzyms bekannt. Neben der für Arzneistoff-metabolisierende Enzyme typischen Funktion der Detoxifizierung von z.B. *N*-hydroxylierten Basenanaloga (Krompholz *et al.*, 2012) wird eine Beteiligung am L-Arginin abhängigen NO Metabolismus sowie der Reduktion von Nitrit zu NO diskutiert (Kotthaus *et al.*, 2011; Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Ferner konnten Veränderungen des Enzymsystems im Zusammenhang mit Colon-Karzinomen (Mikula *et al.*, 2011) sowie Diabetes mellitus (Malik *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010) gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über eine mögliche endogene Funktion des Enzyms zu erlangen.

Zu diesem Zwecke wurden *in vitro* Studien an rekombinant hergestellten Proteinen, Zellkulturstudien in humanen und murinen Zelllinien sowie *in vivo* Studien in Mäusen durchgeführt. Neben der Expression auf mRNA-Ebene wurden mittels Western Blot Proteinvorkommen sowie mit Hilfe eines Biotransformationsassay Enzymaktivitäten untersucht. In Studien mit Zellkulturen ließ sich die Induzierbarkeit des mARC-Proteins durch Glukose auf Protein- und Aktivitätsebene nachweisen. Eine Induktion durch oxidativen Stress konnte hingegen nicht gezeigt werden, auch wenn die Zugabe von *N*-Acetylcystein in Kulturmedien die Induktion durch Glukose zu antagonisieren vermochte. Im Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 1 induziert durch Streptozocin-Injektion konnte ein Zusammenhang von gesteigertem Vorkommen und gesteigerter Aktivität von mARC2 in Lebern und Nieren diabetischer Tiere festgestellt werden. Außerdem führte mehrstündiger Nahrungsentzug bei gesunden Mäusen zur Herabregulation des Enzymsystems mit vermindertem Proteinvorkommen sowie verminderter Aktivität. Die Fütterung mit hochfetthaltiger Diät führte hingegen zur Steigerung von Vorkommen und Aktivität des Enzymsystems. Im Rahmen der *in vivo* Studien zeigte sich, dass mRNA- und Proteinmengen für mARC nicht in allen Fällen korrelieren und gegebenenfalls sogar gegenläufige Tendenzen zeigen. Für genetische Mausmodelle metabolischer Störungen konnten hingegen keine Zusammenhänge mit dem mARC-haltigen Enzymsystem festgestellt werden. Des Weiteren konnte eine Zunahme der mARC-Proteine in murinen und humanen Vorläuferzellen,

die zu Adipozyten differenziert wurden, nachgewiesen werden. *In vitro* führte die Zugabe von Acyl-CoAs zur Hemmung der *N*-reduktiven Aktivität des mARC-haltigen Enzymsystems.

Die gefundenen Ergebnisse weisen auf eine Verknüpfung des mARC-haltigen Enzymsystems mit dem Energiestoffwechsel hin. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ergeben dies. So führen bestimmte genetische Varianten im mARC-Protein zu veränderten Blutlipidprofilen sowie zu einem veränderten Ansprechen auf Fenofibrat (Teslovich *et al.*; 2010, Aslibekyan *et al.*, 2012). Ein knock-down des Proteins in Adipozyten führt zu verminderter Lipogenese (Neve *et al.*, 2012). Außerdem weisen homozygote mARC2-knockout-Mäuse einen reduzierten Körperfettanteil im Vergleich zu Wildtyptieren auf (Brown *et al.*, 2012). Folglich ist anzunehmen, dass die endogene Funktion des mARC-haltigen Enzymsystems im Bereich des Fettstoffwechsels zu suchen ist. Dennoch sind weitere Studien zur Regulation, den möglichen endogenen Substraten sowie beteiligten Stoffwechselwegen nötig. Aufgrund der mangelnden Korrelation von mRNA und Proteinmengen von mARC sollten weitere Studien immer auf der Basis von Proteindaten beurteilt werden.

## Abstract

The mitochondrial amidoxime reducing component mARC is the fourth mammalian molybdenum enzyme (Havemeyer *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2010). The protein is capable of reducing *N*-oxygenated structures acting as part of a three component enzyme system together with mitochondrial cytochrome b<sub>5</sub> and NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase (Havemeyer *et al.*, 2011; Kotthaus *et al.*, 2011; Plitzko *et al.*, 2013). It is well accepted to be involved in *N*-reductive drug metabolism (Havemeyer *et al.*, 2011; Froriep *et al.*, 2013; Jakobs *et al.*, 2014). However, its endogenous function is not yet fully understood. Involvement in detoxification, as common for drug metabolizing enzymes, was discussed, since the enzyme system reduces *N*-hydroxylated base analogues (Krompholz *et al.*, 2012). Further, involvement in L-arginine dependent NO-metabolism and the reduction of nitrite to NO were demonstrated (Kotthaus *et al.*, 2011; Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Moreover, expression changes with colon cancer (Mikula *et al.*, 2011) and *diabetes mellitus* were proven (Malik *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010).

This study was conducted to gain more information about the endogenous function of the mARC protein.

We applied *in vitro* studies with recombinant expressed proteins, cell cultures and *in vivo* mice experiments. Besides mRNA expression studies, protein abundances were measured by Western Blot and biotransformation assays to study marker activity were carried out. Cell culture studies revealed the induction of the mARC-system by glucose on protein and activity level. In contrast, the system was not induced by oxidative stress, although addition of *N*-acetylcystein to cell culture media reversed the induction by glucose. An *in vivo* mouse model for *diabetes mellitus* type 1, induced by injection of streptozocin, showed increased protein and activity levels for mARC2 in livers and kidneys of diabetic animals. Furthermore, food deprivation in healthy mice down-regulated the enzyme system with decreased protein and activity levels. In contrast, high fat diet increased protein and activity levels of mARC. In *in vivo* studies mARC mRNA and protein abundance did not correlate or showed even opposite tendencies. No relation between the enzyme system and genetical mouse models of metabolic disease could be detected. Increased protein and activity levels could be demonstrated when human and murine precursor cells were differentiated to adipocytes. Besides this, acyl-CoAs were capable of inhibiting activity of recombinant proteins of the *N*-reductive system *in vitro*.

The data reveals that the enzyme system is connected with energy metabolism. Studies of other groups support this hypothesis as well. Genetic variation of the protein result in altered blood lipid profiles and altered response to fenofibrat (Teslovich *et al.*; 2010; Aslibekyan *et al.*, 2012). Knock-down of the protein in adipocytes causes decreased lipogenesis (Neve *et al.*, 2012) and

knockout mice homozygote for mARC2 posses decreased body fat amount relative to wild type mice (Brown *et al.*, 2012). Thus the endogenous function of the mARC containing enzyme system is likely connected to lipid metabolism. Yet studies about regulation, possible endogenous substrates and pathways involved are necessary. Further studies must be based on protein data due to scarce correlation of mARC mRNA and protein abundance.