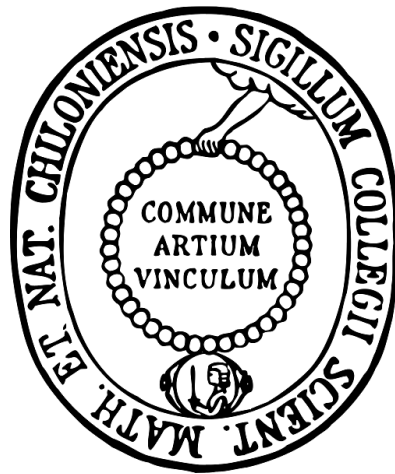


**mARC-Expression und *N*-reduktive Aktivität in  
hepatischen und extrahepatischen porcinen und  
humanen Geweben und Studien zur  
submitochondrialen Lokalisation von mARC**



**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Carmen Krischkowski**

Kiel 2014

Referent: Prof. Dr. Bernd Clement

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2014

Zum Druck genehmigt: 11.11.2014

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl  
(Dekan)

*Meiner Familie*



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

VII

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Molybdoenzyme.....	1
1.1.1	Vorkommen und Eigenschaften von Molybdoenzymen.....	1
1.1.2	Einteilung molybdänhaltiger Enzyme in Familien.....	4
1.2	Biotransformation.....	5
1.3	Reduktion <i>N</i> -hydroxylierter Verbindungen.....	6
1.3.1	Prodrug-Prinzip.....	8
1.3.2	mARC-abhängiges <i>N</i> -reduktives Enzymsystem.....	9
1.3.2.1	mARC.....	12
1.3.2.2	Cytochrom <i>b</i> <sub>5</sub> .....	14
1.3.2.3	NADH-Cytochrom <i>b</i> <sub>5</sub> Reduktase.....	14
1.4	Thema und Zielsetzung der Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>mARC-Expression und <i>N</i>-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen Mitochondrien und Gewebehomogenaten .....</b>	<b>17</b>
2.1	EINLEITUNG.....	17
2.1.1	Bedeutung und Expression arzneistoffmetabolisierender Enzyme in extrahepatischen Geweben.....	17
2.1.2	THEMA UND ZIELSETZUNG.....	20

2.2	METHODEN.....	21
2.2.1	Materialien und Geräte .....	21
2.2.2	Proteinquellen .....	21
2.2.2.1	Aufarbeitung porciner Gewebehomogenate .....	21
2.2.2.2	Gewinnung der mitochondrialen Fraktionen.....	21
2.2.2.3	Rekombinante Enzymquellen.....	22
2.2.3	Charakterisierung der porcinen Enzymquellen.....	22
2.2.3.1	Proteingehaltsbestimmung .....	22
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	22
2.2.3.3	Westernblot.....	23
2.2.3.4	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität .....	23
2.2.3.4.1	<i>In vitro</i> Inkubationsansatz .....	23
2.2.3.4.2	Substratabhängigkeit.....	24
2.2.3.5	HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamidin .....	24
2.2.3.6	Bestimmung des Molybdängehalts.....	25
2.2.3.7	Citratsynthase-Aktivitätsbestimmung.....	25
2.3	ERGEBNISSE .....	26
2.3.1	mARC-Expression und <i>N</i> -reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen Mitochondrien .....	26
2.3.2	mARC-Expression und <i>N</i> -reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen Gewebehomogenaten .....	30
2.3.2.1	Korrelation der mARC-Expression mit der <i>N</i> -reduktiven Aktivität in den porcinen Gewebehomogenaten.....	30
2.3.2.2	Identifizierung mitochondrienreicher Gewebe.....	33
2.3.2.3	Molybdängehalt .....	35

2.4	DISKUSSION .....	36
2.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	41
<b>3</b>	<b>mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in humanen und porcinen Lebersubfraktionen und submitochondriale Lokalisation von mARC .....</b>	<b>43</b>
3.1	EINLEITUNG .....	43
3.1.1	Aufbau und Funktion von Mitochondrien.....	43
3.1.2	Proteintransport in Mitochondrien.....	44
3.1.3	Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 .....	48
3.1.4	THEMA UND ZIELSETZUNG.....	50
3.2	METHODEN.....	51
3.2.1	Materialien und Geräte .....	51
3.2.2	Proteinquellen .....	51
3.2.2.1	Gewinnung der hepatischen Subfraktionen .....	51
3.2.2.2	Gewinnung der submitochondrialen Fraktionen .....	52
3.2.2.2.1	Isolierung des mitochondrialen Membranpellets und der löslichen mitochondrialen Fraktion.....	52
3.2.2.2.2	Isolierung der äußeren mitochondrialen Membranvesikel (OMV).....	52
3.2.2.2.3	Isolierung der inneren mitochondrialen Membran (IMM) und des mitochondrialen Intermembranraums (IMS).....	52
3.2.2.2.4	Isolierung der mitochondrialen Matrix .....	53
3.2.2.3	Rekombinante Enzymquellen.....	53
3.2.3	Charakterisierung der hepatischen Enzymquellen .....	54

3.2.3.1	Proteingehaltsbestimmung .....	54
3.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	54
3.2.3.3	Coomassiefärbung .....	54
3.2.3.4	Westernblot.....	54
3.2.3.5	Quantitative Westernblotanalyse .....	54
3.2.3.6	Blocking-Experiment .....	55
3.2.3.7	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität .....	55
3.2.3.7.1	<i>In vitro</i> Inkubationsansatz für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin	55
3.2.3.7.2	Substratabhängigkeit.....	55
3.2.3.8	Untersuchung des Einflusses von Digitonin auf die <i>N</i> -reduktive Aktivität .....	56
3.2.3.9	HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamidin .....	56
3.2.3.10	<i>In vitro</i> Inkubationsansatz für die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin zu Sulfamethoxazol .....	56
3.2.3.11	HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Sulfamethoxazol .....	57
3.2.3.12	Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung .....	58
3.2.3.13	Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung.....	58
3.2.3.14	Citratsynthase-Aktivitätsbestimmung.....	59
3.2.3.15	Sulfitoxidase-Aktivitätsbestimmung .....	59
3.3	ERGEBNISSE .....	60
3.3.1	mARC-Expression und <i>N</i> -reduktive Aktivität in humanen und porcinen subzellulären hepatischen Fraktionen .....	60
3.3.1.1	Lokalisation von mARC und der <i>N</i> -reduktiven Aktivität in humanen und porcinen Lebermitochondrien.....	60
3.3.1.2	Studien zur Lokalisation von mARC und der <i>N</i> -reduktiven Aktivität in der äußeren Membran humaner und porciner Lebermitochondrien .....	63



3.3.1.3	Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression in porcinen und humanen hepatischen Präparationen .....	65
3.3.1.3.1	Reinheitsprüfung der rekombinanten mARC-Proteine mittels SDS-PAGE .....	65
3.3.1.3.2	Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression in porcinen und humanen Leberpräparationen mittels quantitativer Westernblotanalyse.....	66
3.3.2	Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 in porcinen Lebermitochondrien .....	67
3.3.2.1	Charakterisierung der mitochondrialen Membranfraktion und der löslichen mitochondrialen Fraktion hinsichtlich der Lokalisation von mARC1 und mARC2	67
3.3.2.2	Charakterisierung mitochondrialer Subfraktionen hinsichtlich der Lokalisation von mARC1 und mARC2 .....	70
3.3.2.2.1	Einfluss von Digitonin auf die <i>N</i> -reduktive Aktivität .....	70
3.3.2.2.2	Analyse mitochondrialer Markerenzyme in den porcinen hepatischen mitochondrialen Subfraktionen .....	71
3.3.2.2.3	Westernblotanalyse zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 und Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität .....	75
3.3.2.2.4	Charakterisierung der mitochondrialen Matrix hinsichtlich der Lokalisation von mARC1 .....	78
3.3.2.3	Massenspektrometrische Analyse und Reinigung des in der IMS-Fraktion detektierten mARC1 .....	80
3.4	DISKUSSION .....	80
3.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	88
<b>4</b>	<b>mARC-Expression und <i>N</i>-reduktive Aktivität im humanen Vollblut und Blutfraktionen.....</b>	<b>90</b>
4.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....	90

4.2	METHODEN.....	92
4.2.1	Materialien und Geräte .....	92
4.2.2	Gewinnung von Blutzellfraktionen und Plasma aus humanem Vollblut.....	92
4.2.2.1	Isolierung von Plasma, Erythrozyten und Monozyten .....	92
4.2.2.2	Isolierung von Granulozyten aus humanem Vollblut.....	93
4.2.3	Charakterisierung des humanen Vollbluts und der Blutfraktionen .....	94
4.2.3.1	Vitalitätsbestimmung .....	94
4.2.3.2	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität .....	94
4.2.3.2.1	<i>In vitro</i> Inkubationsansatz .....	94
4.2.3.2.2	Zeitabhängigkeit .....	95
4.2.3.3	HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamidin .....	95
4.2.3.4	Proteingehaltsbestimmung.....	95
4.2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	95
4.2.3.6	Westernblot.....	95
4.2.3.7	Blocking-Experiment .....	96
4.3	ERGEBNISSE .....	96
4.3.1	mARC1- und mARC2-Expression im humanen Vollblut und Blutfraktionen.....	96
4.3.2	<i>N</i> -reduktive Aktivität im humanen Vollblut und in den Blutzellfraktionen .....	97
4.4	DISKUSSION .....	98
4.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	101
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>

6.1	mARC-Expression und <i>N</i> -reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen Geweben .....	108
6.1.1	mARC-Expression.....	108
6.1.2	VDAC-Expression .....	108
6.1.3	Westernblotanalyse Cytochrom $b_5$ und Cytochrom $b_5$ Reduktase .....	109
6.1.4	Substratabhängigkeiten der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin .....	110
6.2	mARC-Expression und <i>N</i> -reduktive Aktivität in humanen und porcinen Lebersubfraktionen und submitochondriale Lokalisation von mARC.....	113
6.2.1	Enzymkinetische Parameter der humanen Lebersubfraktionen .....	113
6.3	mRNA-Expressionsdaten .....	114
<b>7</b>	<b>Materialien und Geräte.....</b>	<b>120</b>
7.1	Substanzen und sonstige Materialien .....	120
7.2	Geräte .....	123
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
	Erklärung zu §8 der Promotionsordnung .....	143
	Danksagung .....	145
	Lebenslauf .....	147
	Kurzfassung .....	149
	Abstract .....	151

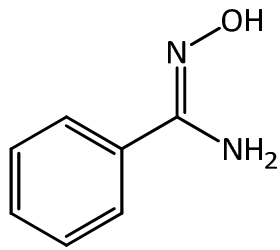
## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BCA	Bicinchoninsäure
BIR-1	isländischer Basalt
BHVO-2	hawaiianischer Basalt
ca.	circa
COX IV	<i>cytochrome c oxidase subunit IV</i> (Cytochrom c Oxidase Untereinheit IV)
CYB5R3	Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase 3
Cyt b <sub>5</sub>	Cytochrom b <sub>5</sub>
Cyt b <sub>5</sub> Red	Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase
CYP	Cytochrom P450
Dim.	Dimerisierungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSOR	Dimethylsulfoxidreduktase
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced</i> Chemielumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm (mg = Milligramm)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden ( <i>hours</i> )
HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>

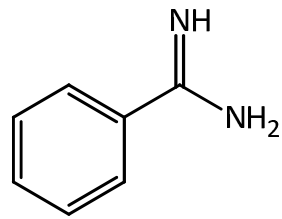
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HeLa	Henrietta Lacks (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms)
HEP-G2	<i>human hepatocellular carcinoma</i> (menschliche Epithelzellen eines Leberzellkarzinoms)
Hsp	Hitzeschockprotein
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma)
IMM	innere mitochondriale Membran
IMS	<i>intermembrane space</i> (mitochondrialer Intermembranraum)
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LRP	leukozytenreiches Plasma
mARC	<i>mitochondrial Amidoxime Reducing Component</i>
M	molar (mol/L; m = milli, $\mu$ = micro)
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mo	Molybdän
mmol	Millimol
Moco	Molybdäncofaktor
MOSC	<i>Moco sulfurase C-terminal domain</i>
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
ND	nicht detektierbar
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid

OMV	<i>outer mitochondrial membrane vesicles</i> (äußere mitochondriale Membranvesikel)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (mit -1 multiplizierter dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
ppb	<i>parts per billion</i>
pmol	Picomol
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SMX	Sulfamethoxazol
SOD2	Superoxiddismutase 2
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline TWEEN 20</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNB	5-Thiobis-2-Nitrobenzoesäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
Vers.	Version

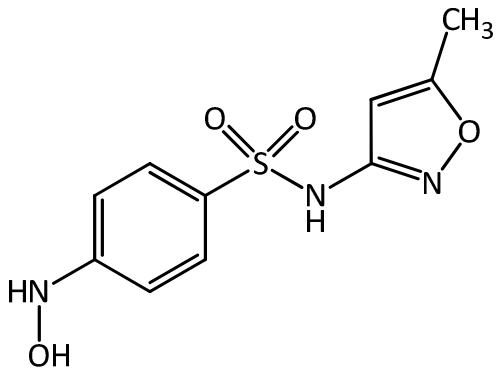
## Strukturformelverzeichnis



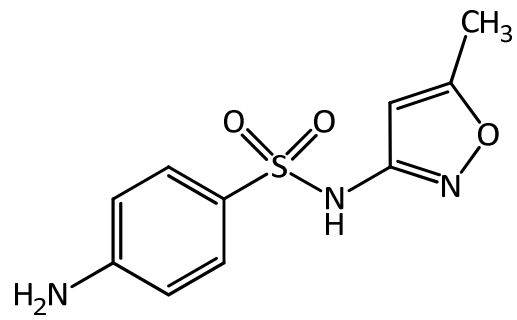
Benzamidoxim



Benzamidin



Sulfamethoxazolhydroxylamin



Sulfamethoxazol





# 1 Einleitung

---

## 1.1 Molybdoenzyme

### 1.1.1 Vorkommen und Eigenschaften von Molybdoenzymen

Molybdoenzyme sind an vielen essentiellen Redoxreaktionen des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelstoffwechsels beteiligt (Hille, 1996). Der Großteil der über 50 bekannten Molybdoenzyme wurde in Prokaryoten identifiziert. Eukaryoten hingegen weisen nur eine geringe Anzahl an Molybdoenzymen auf. Dabei konnten in allen bisher untersuchten Eukaryoten die Sulfitoxidase, die Aldehydoxidase, die Xanthinoxidoreduktase und die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) identifiziert werden. In autothrophen Organismen ist zusätzlich die Nitratreduktase zu finden. Zwei weitere eukaryotische Molybdoenzyme sind die Pyridoxaloxidase und die Nikotinathydrolase, welche lediglich in *Drosophila melanogaster* und *Aspergillus nidulans* vorhanden sind (Mendel und Kruse, 2012).

Molybdoenzyme werden aufgrund der Struktur ihres Molybdäncofaktors in drei Subfamilien unterteilt: Dimethylsulfoxidreduktase-Familie, Sulfitoxidase-Familie und Xanthinoxidase-Familie.

Die zur Sulfitoxidase-Familie gehörende Nitratreduktase katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und von Nitrit zu Stickstoffmonoxid (NO). Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit stellt den ersten Schritt der Nitratassimilation dar. Die Nitratreduktase ist im Cytosol lokalisiert und besteht aus drei Domänen mit jeweils unterschiedlichen prosthetischen Gruppen (Mendel und Bittner, 2006). Am N-terminalen Ende befindet sich eine Moco-bindende Domäne, gefolgt von einer Häm-bindenden Cytochrom b<sub>5</sub> Domäne und einer FAD-bindenden Domäne am C-terminalen Ende (Abb. 1.1.1). Die Nitratreduktaseaktivität ist abhängig von den Elektronendonatoren NADH oder NADPH (Mendel und Kruse, 2012).

Die Sulfitoxidase ist das namensgebende Enzym für die Sulfitoxidase-Familie. In Eukaryoten haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Formen entwickelt. Die tierische

Sulfitoxidase ist im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Sulfitdetoxifizierung und somit beim Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren (Mendel und Bittner, 2006). Im Gegensatz zur tierischen ist die pflanzliche Sulfitoxidase ein peroxisomales Protein (Nowak *et al.*, 2004). Die tierische Sulfitoxidase besteht aus einer N-terminalen Häm-bindenden Cytochrom  $b_5$  Domäne und einer C-terminalen Domäne, welche den Moco bindet und für die Dimerisierung verantwortlich ist (Abb. 1.1.1) (Kisker *et al.*, 1997).

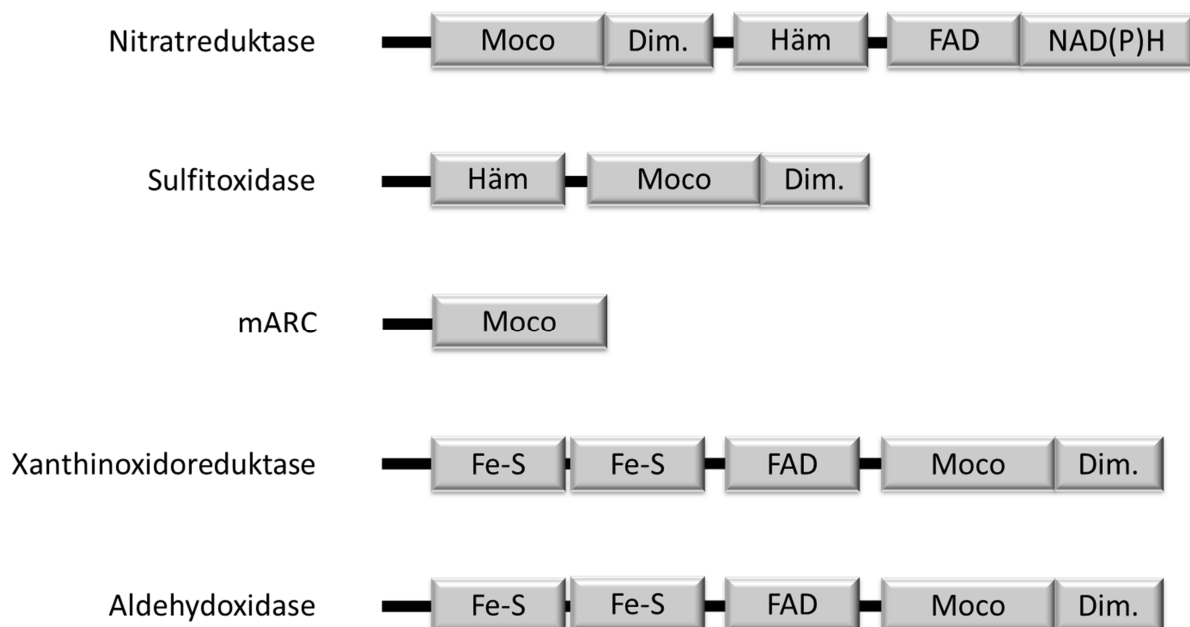
Die Xanthinoxidoreduktase ist das namensgebende Enzym der Xanthinoxidase-Familie und stellt das Schlüsselenzym im Purinabbau dar. Sie oxidiert Hypoxanthin zu Xanthin und anschließend zu Harnsäure. Die Xanthinoxidoreduktase ist ein Homodimer, wobei sich jedes Monomer aus drei Domänen zusammensetzt. Die N-terminale Domäne bindet zwei [Fe-S]-Cluster, es folgt eine FAD-bindende Domäne und eine am C-terminalen Ende befindliche Domäne, welche für die Bindung des Moco und für die Dimerisierung erforderlich ist (Abb. 1.1.1) (Mendel und Bittner, 2006). Die Xanthinoxidoreduktase kann in zwei verschiedenen Formen vorliegen. Zum einen als Xanthindehydrogenase und zum anderen als Xanthinoxidase. Bei der Xanthindehydrogenase erfolgt der Elektronentransport vom FADH zum  $NAD^+$  oder zum molekularen Sauerstoff. Die Xanthinoxidase hingegen kann ausschließlich molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzen (Mendel und Bittner, 2006). Die subzelluläre Lokalisation der Xanthinoxidoreduktase ist noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden eine cytosolische und eine peroxisomale Lokalisation (Jarasch *et al.*, 1981; Angermüller *et al.*, 1987).

Die Aldehydoxidase ist ein cytoplasmatisches Enzym, welches zur Xanthinoxidase-Familie gehört und die Oxidation zahlreicher aromatischer und nicht-aromatischer Heterocyclen und Aldehyden zu Carbonsäuren katalysiert. Sie weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zur Xanthinoxidoreduktase auf, besitzt dieselben prosthetischen Gruppen und liegt ebenfalls als Homodimer vor (Mendel und Bittner, 2006). Es ist bekannt, dass die Aldehydoxidase in Säugern eine Rolle im Arznei- und Fremdstoffmetabolismus spielt (Kitamura *et al.*, 2006; Pryde *et al.*, 2010). Die physiologische Funktion ist, im Gegensatz zur pflanzlichen Aldehydoxidase, welche an der Synthese von Phytohormonen beteiligt ist, noch nicht aufgeklärt (Mendel und Kruse, 2012). Es wird postuliert, dass die tierische Aldehydoxidase

bei der Umwandlung von Retinaldehyd zu Retinsäure, welche ein aktiver Metabolit des Vitamin A ist, eine Rolle spielt. Des Weiteren wird vermutet, dass die Aldehydoxidase am Metabolismus von Neurotransmittern beteiligt ist (Garattini *et al.*, 2008).

Das mARC-Enzym ist neben der Sulfitoxidase, der Xanthinoxidoreduktase und der Aldehydoxidase das vierte in Säugetieren bekannte Molybdänenzym. mARC wurde 2006 aus der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien gereinigt und identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006). mARC ist das kleinste bekannte Molybdoenzym und bindet den Moco als einzige prosthetische Gruppe (Abb. 1.1.1). Während das in *E. coli* Stämmen exprimierte humane Protein als Monomer vorliegt, wurde im eukaryotischen System eine dimere Form isoliert (Wahl *et al.*, 2010; Reichmann, 2013).

In Verbindung mit den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase ist mARC in der Lage *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren. Die Zusammensetzung des mARC-haltigen Dreikomponentensystems ähnelt der Domänenstruktur der Nitratreduktase. Eine Sequenzähnlichkeit zwischen der *N*-terminalen Moco-bindenden Domäne der Nitratreduktase und mARC besteht jedoch nicht (Havemeyer *et al.*, 2011).



**Abb. 1.1.1 Domänenstruktur der eukaryotischen Molybdoenzyme (nach Mendel und Kruse, 2012)**

### 1.1.2 Einteilung molybdänhaltiger Enzyme in Familien

Das Spurenelement Molybdän ist für nahezu alle Organismen essentiell. Die Molybdänaufnahme erfolgt in Form von Molybdat. Das Metall selbst ist biologisch inaktiv, ausgenommen es wird durch einen speziellen Cofaktor (Molybdäncofaktor) komplexiert. Aufgrund der Struktur des Molybdäncofaktors werden molybdänhaltige Enzyme in drei Subfamilien unterteilt: die Sulfitoxidase-Familie, die Xanthinoxidase-Familie und die Dimethylsulfoxidreduktase-Familie (Mendel und Kruse, 2012).

Der Molybdäncofaktor besteht aus einem Pterin-Grundgerüst mit einem C6-substituierten Pyranoring, einer terminalen Phosphatgruppe und einer Endithiolat-Gruppe (Wahl *et al.*, 2010). Die Endithiolat-Gruppe ist essentiell, um das Metall zu koordinieren und somit die biologisch aktive Form des Molybdäncofaktors darzustellen (Hille, 1996; Mendel und Kruse, 2012). Während die Dimethylsulfoxidreduktase-Familie (DMSOR-Familie) ausschließlich in Prokaryoten zu finden ist, kommen die Sulfitoxidase-Familie und Xanthinoxidase-Familie auch in Eukaryoten vor. Die Sulfitoxidase-Familie und Xanthinoxidase-Familie unterscheiden sich durch die Bindung des dritten Schwefel-Liganden (Schwarz *et al.*, 2009).

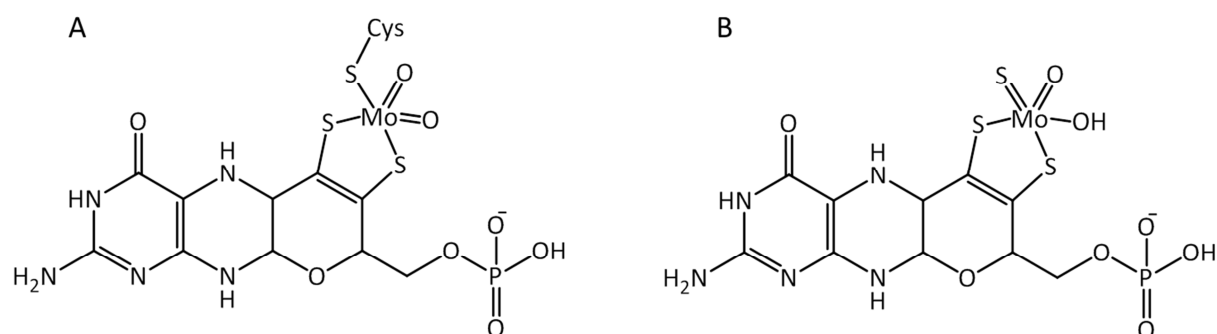
Bei der Sulfitoxidase-Familie, zu der die Sulfitoxidase und die Nitratreduktase gehören, handelt es sich um Dioxomolybdoenzyme. Das Molybdän wird neben dem proteineigenen Schwefel durch zwei Sauerstoffatome komplexiert (Abb. 1.1.2). Die Aktivierung erfolgt durch Einbau des Molybdäncofaktors in das Protein (Mendel und Bittner, 2006).

Im Gegensatz dazu weisen die zur Xanthinoxidase-Familie gehörenden Monooxomolybdoenzyme keine proteinabhängige Koordination des Molybdäns im Molybdäncofaktor auf (Mendel und Kruse, 2012). Das Molybdän wird neben der Endithiolat-Gruppe durch zwei Sauerstoffatome und einem sogenannten terminalen Schwefelatom gebunden (Abb. 1.1.2). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass das Schwefelatom, welches benötigt wird, um enzymatische Aktivität zu erlangen, durch Cyanidbehandlung freigesetzt werden kann. Diese Reaktion ist reversibel und das Enzym kann unter reduzierenden Bedingungen durch eine Sulfidbehandlung wieder in seine enzymatisch aktive Form überführt werden (Massey und Edmondson, 1970). *In vivo* wird dieser terminale Schwefel, vor Einbau des Molybdäncofaktors in das Apoprotein, durch eine separate enzymatische Reaktion herbeigeführt. Diese Reaktion, welche zur Aktivierung des Molybdäncofaktors führt,

wird durch die Moco-Sulfurase katalysiert (Mendel und Bittner, 2006). Die bedeutendsten Enzyme der Xanthinoxidase-Familie sind die Xanthinoxidoreduktase und die Aldehydoxidase.

Das mARC-Enzym ist das jüngst identifizierte eukaryotische Molybdoenzym und gehört zur Sulfitoxidase-Familie (Mendel und Leimkühler, 2014). Ein Austausch des MOSC-typischen konservierten Cysteins gegen Serin hatte den Verlust der N-reduktiven Aktivität zur Folge. Die Elektronenspinresonanz-Spektren der humanen mARC-Proteine waren den für die Sulfitoxidase-Familie typischen Spektren ähnlich. Die Mutation des Cysteins in den mARC-Enzymen störte dieses Spektrum signifikant (Bittner, 2013).

Im Gegensatz zur Sulfitoxidase- und zur Xanthinoxidase-Familie koordinieren die Molybdoenzyme der DMSOR-Familie das Molybdän durch zwei Pteringerüste, von denen jedes ein Guanosinmonophosphat gebunden hat. Zusammen formen sie einen bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Cofaktor (Schwarz *et al.*, 2009).



**Abb. 1.1.2 Struktur des Molybdäncofaktors der Sulfitoxidase-Familie (A) und der Xanthinoxidase-Familie (B) (nach Schwarz *et al.*, 2009)**

## 1.2 Biotransformation

Biotransformation umfasst die Umwandlung von körperfremden Stoffen (Xenobiotika). Diese Umwandlungsprozesse erfolgen vor allem in der Leber, aber auch in extrahepatischen Organen wie Darm, Niere, Gehirn, Lunge, Milz, Haut und Blut (Mutschler *et al.*, 2008).

Die Biotransformationsreaktionen werden in zwei Phasen unterteilt (Phase I und Phase II).

In Phase I wird der Arzneistoff hydrophilisiert, um dessen Ausscheidung über die Niere oder Galle zu erleichtern. Dies erfolgt durch oxidative, reduktive oder hydrolytische Veränderung

des Moleküls (Steinilber *et al.*, 2010). An den Oxidationsreaktionen haben die Cytochrom P450 Enzyme, welche Monooxygenase Eigenschaften besitzen, den größten Anteil. Dabei laufen vor allem Hydroxylierungsreaktionen und oxidative Desalkylierungen am Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoffatom ab (Guengerich, 2001). Ebenfalls oxidierende Enzyme des Phase I Metabolismus sind flavinhaltige Monooxygenasen, die Xanthinoxidoreduktase, Monoaminoxidasen, Alkoholdehydrogenasen und Aldehyddehydrogenasen (Beedham, 1997; Testai, 2001).

Als Phase II Reaktionen werden Konjugationen bezeichnet, welche meist durch Transferasen katalysiert werden (Steinilber *et al.*, 2010). Dabei werden häufig an Hydroxy- oder Aminogruppen, welche im Pharmakonmolekül bereits vorhanden waren oder durch die Phase I Reaktionen eingefügt wurden, mit hydrophilen körpereigenen Substanzen gekoppelt, um die Wasserlöslichkeit und somit die Elimination zu erhöhen (Testai, 2001; Steinilber *et al.*, 2010). Zu den wichtigsten Reaktionen der Phase II zählen die Konjugationen mit aktivierter Glucuronsäure, aktiviertem Sulfat, Glutathion, Aminosäuren, aktivierter Essigsäure und S-Adenosylmethionin (Testai, 2001; Mutschler *et al.*, 2008).

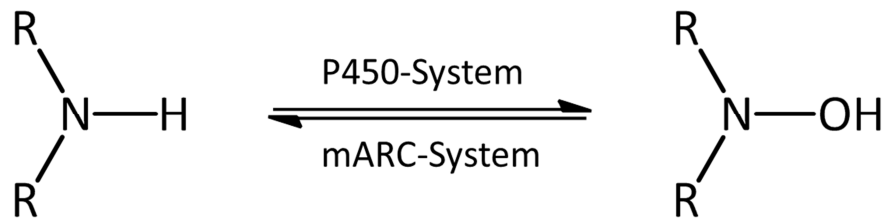
Neben Entgiftungsreaktionen, welche als Bioinaktivierung bezeichnet werden, können auch Bioaktivierungen von Arzneistoffen (Prodrugs) stattfinden. Von Biotoxifizierung spricht man, wenn der entstandene aktive Metabolit toxischer ist als die Ausgangssubstanz (Mutschler *et al.*, 2008).

### 1.3 Reduktion N-hydroxylierter Verbindungen

Die Reduktion N-hydroxylierter Verbindungen ist von großer pharmakokinetischer und toxikologischer Bedeutung. Die Oxygenierung stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen erfolgt im Körper durch P450-Enzyme und kann zur Bildung N-hydroxylierter Verbindungen führen (Guengerich, 2001). Diese Verbindungen besitzen zum Teil ein genotoxisches Potential, da beispielsweise N-Hydroxyarylamine entstehen können. Diese elektrophilen Metaboliten können direkt mit der zellulären DNA reagieren oder sogar nach Konjugation zu Estern in die reaktiveren Arylnitreniumionen überführt werden, welche in der Lage sind kovalente DNA-Adukte zu bilden (Kadlubar *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 2014). Des Weiteren können im Organismus durch N-Oxygenierung aus den natürlichen Nukleobasen mutagene

*N*-hydroxylierte Basenanaloga entstehen. Die Mutagenität dieser Oxidationsprodukte ist auf die Inkorporation in die DNA zurückzuführen (Freese, 1968; Negishi *et al.*, 1994).

Während die enzymatischen Grundlagen *N*-oxidativer Prozesse weitestgehend verstanden waren, gab es bei den reduktiven Stoffwechselwegen noch viele Unsicherheiten. Kadlubar und Ziegler beschrieben für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ein mikrosomales, während Bernheim ein mitochondriales Enzymsystem beschrieb (Bernheim und Hochstein, 1968; Kadlubar und Ziegler, 1974). Es wurde postuliert, dass sich dieses Enzymsystem aus Cytochrom  $b_5$ , seiner Reduktase und einer unbekanntem dritten Komponente zusammensetzte. Des Weiteren wurde ein mikrosomales System, welches lediglich aus den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase besteht, für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in Betracht gezogen (Kurian *et al.*, 2004; Kurian *et al.*, 2006). Clement *et al.* (1997) vermuteten zunächst, dass es sich bei der fehlenden dritten Komponente um ein mikrosomales CYP-Enzym handelte. In Rekonstitutions-Assays mit rekombinanten Enzymen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Untypischerweise für arzneistoffmetabolisierende Enzyme wurden in Mitochondrien höhere *N*-reduktive Aktivitäten gemessen als in den mikrosomalen Fraktionen (Clement und Lopian, 2003; Andersson *et al.*, 2005). 2006 konnte die dritte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems aus der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien gereinigt und als Molybdoenzym identifiziert werden. Nach ihren Amidoxim reduzierenden Eigenschaften wurde sie als mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) benannt (Havemeyer *et al.*, 2006). Das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem stellt das Gegenstück zum P450-System dar, welches für die *N*-Oxygenierung zahlreicher körpereigener und körperfremder Verbindungen verantwortlich ist (Abb. 1.3.1).



**Abb. 1.3.1** *N*-Oxygenierung durch P450-Enzyme und *N*-Reduktion durch das mARC-haltige Enzymsystem

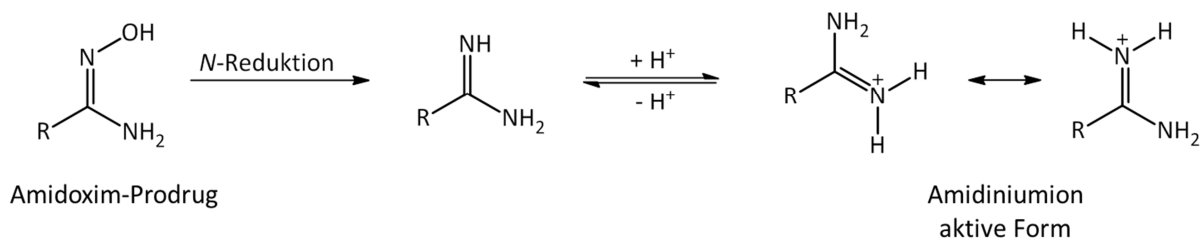
### 1.3.1 Prodrug-Prinzip

Die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ist auch bei der Aktivierung von bestimmten Prodrugs von großer Bedeutung. Prodrugs sind pharmakologisch inaktive Arzneistoffe, die im Organismus in einen oder mehrere aktive Metabolite überführt werden. Die Ziele von Prodrug-Prinzipien können beispielsweise die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit oder der Löslichkeit sein. Des Weiteren ist es möglich einen speziellen Wirkort anzusteuern. Beispiele hierfür sind das Levodopa oder verschiedene Protonenpumpenhemmer wie das Omeprazol (Steinhilber *et al.*, 2010).

Zahlreiche Arzneistoffe besitzen Amidin- und Guanidinstrukturen, da diese in ihrer protonierten Form Wechselwirkungen mit den negativen Carboxylgruppen der Zielstrukturen eingehen. Aufgrund ihrer starken Basizität liegen Amidine und Guanidine unter physiologischen Bedingungen jedoch protoniert vor und können daher im Gastrointestinaltrakt nur unzureichend resorbiert werden. Um die orale Bioverfügbarkeit dieser Arzneistoffe zu erhöhen, wurde im Arbeitskreis die Amidoxim-Prodrug-Strategie entwickelt (Abb. 1.3.2). Dabei wird an den Amidin- und Guanidinstrukturen formal ein Sauerstoffatom eingefügt. Durch die Elektronegativität des Sauerstoffs liegen diese Arzneistoffe aufgrund ihrer herabgesetzten Basizität unter physiologischen Bedingungen nicht länger protoniert vor und weisen somit eine verbesserte Bioverfügbarkeit auf (Clement, 2002). Im Körper erfolgt die Aktivierung dieser *N*-hydroxylierten Prodrugs zu ihren aktiven Metaboliten durch das mARC-abhängige *N*-reduktive Enzymsystem (Grünwald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010, Froriep *et al.*, 2013). Ursprünglich wurde dieses Prodrug-Prinzip für den Wirkstoff Pentamidin entwickelt, welches unter anderem zur Prophylaxe und Therapie von *Pneumocystis* Pneumonie eingesetzt wird (Clement und Raether, 1985; Molavi, 1989). Es folgte die Übertragung auf viele andere Amidine mit antibakterieller und



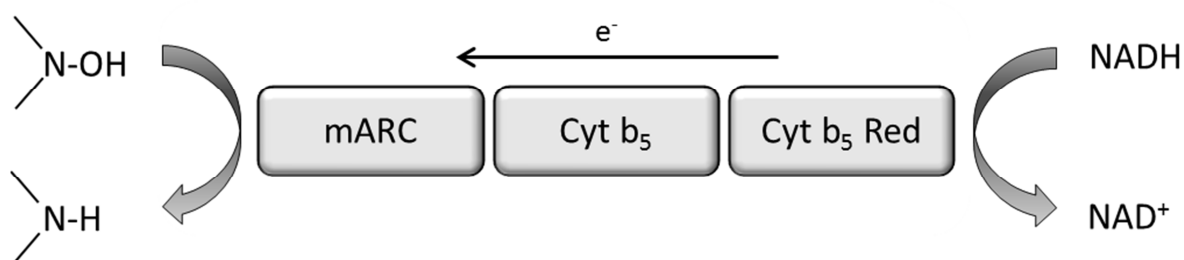
antiparasitärer Wirkung (Hall *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2007). Ein großes Feld der Amidoxim-Produgs nehmen außerdem die antithrombotischen Wirkstoffe ein (Peterlin-Masic *et al.*, 2006).



**Abb. 1.3.2 Prodrug-Prinzip: Aktivierung von Amidoxim-Produgs zu Amidinen durch N-Reduktion**

### 1.3.2 mARC-abhängiges N-reduktives Enzymsystem

Beim mARC-abhängigen N-reduktiven Enzymsystem handelt es sich um ein Dreikomponentensystem, welches sich aus separaten Proteinen zusammensetzt. Neben mARC besteht es aus den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase und ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert (Abb. 1.3.3). Beim Cytochrom  $b_5$  handelt es sich um die mitochondriale Isoform (Cytochrom  $b_5$  B) und nicht um das mikrosomale Cytochrom  $b_5$  A (Pitzko *et al.*, 2013).



**Abb. 1.3.3 mARC-abhängiges N-reduktives Enzymsystem**

Dieses N-reduktive Enzymsystem ist in der Lage, zahlreiche N-oxygenierte Verbindungen wie Amidoxime, Hydroxylamine, Sulfhydroxamsäuren, N-hydroxylierte Guanidine und Amidinohydrazone, Oxime und N-Oxide zu reduzieren (Abb. 1.3.4) (Grünwald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010; Krompholz *et al.*, 2012; Froriep *et al.*, 2013; Jakobs *et al.*, 2014). Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung N-hydroxylierter Prodrugs, bei der

Detoxifizierung mutagener Basenanaloga und weiterer, durch das P450-System im Körper gebildeter *N*-oxygenierter Metabolite. Der Elektronentransport vom Zweielektronendonator NADH auf den Einelektronenakzeptor Cytochrom  $b_5$  wird durch die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase katalysiert. Die Übertragung der Elektronen auf das Substrat und somit die Reduktion der *N*-hydroxylierten Verbindungen erfolgt durch das Molybdoenzym mARC. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Komponenten genauer erläutert.

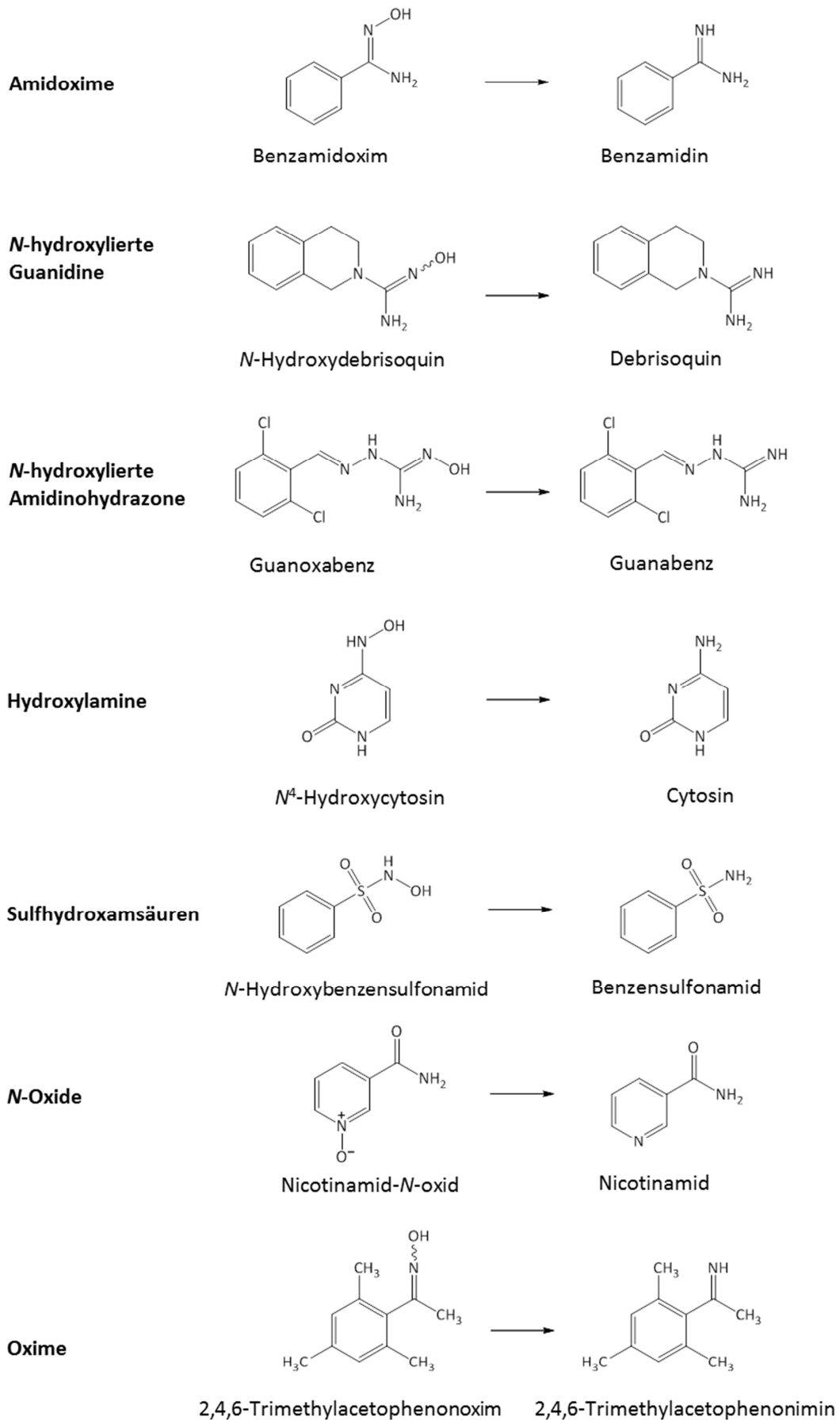


Abb. 1.3.4 N-oxygenierte Substrate des N-reduktiven Enzymsystems

### 1.3.2.1 mARC

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte und jüngst in Säugetieren entdeckte Molybdoenzym. mARC besteht lediglich aus einer Moco-bindenden Domäne und stellt mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa das einfachste und kleinste eukaryotische Molybdoenzym dar. Neueste Untersuchungen ergaben, dass mARC im eukaryotischen System möglicherweise als Dimer vorliegt (Reichmann, 2013; mündliche Mitteilung von F. Bittner, Institut für Pflanzenbiologie, Braunschweig). Alle bisher analysierten Säugetiergenome beinhalten zwei mARC-Gene, welche für die beiden Isoformen mARC1 und mARC2 codieren. Im humanen Genom befinden sich die Gene in einer Tandemorientierung auf Chromosom 1 (1q41) und weisen eine Sequenzidentität von 66 % und eine Sequenzähnlichkeit von 80 % auf (Wahl *et al.*, 2010).

Sowohl mARC1, als auch mARC2 sind in den Mitochondrien lokalisiert. Eine Lokalisation in der äußeren Mitochondrienmembran konnte bisher innerhalb einer Spezies immer nur für eines der beiden mARC-Enzyme gezeigt werden (Havemeyer *et al.*, 2006; Kotthaus *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2012). Für mARC2 ist außerdem in Ratten eine Colokalisation in Peroxisomen beschrieben (Wiese *et al.*, 2007; Islinger *et al.*, 2007; Gabel, 2011).

Das humane mARC1 besteht aus 337 Aminosäuren und das humane mARC2 aus 335 Aminosäuren (Havemeyer *et al.*, 2011). Sie weisen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein N-terminales mitochondriales Targeting-Signal, eine  $\beta$ -barrel Domäne und eine MOSC-Domäne in der Nähe des C-Terminus auf. Die MOSC-Domäne zeichnet sich durch ein hoch konserviertes Cystein aus (Anantharaman und Aravind, 2002). Während in Prokaryoten zahlreiche MOSC-Proteine beschrieben sind, wurden in Eukaryoten bisher nur drei Proteine gefunden, welche die MOSC-Domäne enthalten (Anantharaman und Aravind, 2002). Zu den eukaryotischen MOSC-Proteinen gehören mARC1, mARC2 und die Moco-Sulfurase. Der Namensgeber dieser neuen MOSC-Domänen-Superfamilie ist die C-terminale Domäne der Moco-Sulfurase, welche den Molybdäncofaktor binden kann. Die physiologische Funktion der Moco-Sulfurase besteht in der terminalen Sulfurierung und damit Aktivierung des Molybdäncofaktors, der zur Xanthinoxidase-Familie gehörenden Enzyme (Mendel und Kruse, 2012).

Bezüglich der mARC-Enzyme besteht kein Zweifel, dass mARC in Verbindung mit Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase an der Reduktion N-hydroxylierter Prodrugs

beteiligt ist. Die physiologische Funktion von mARC ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, auch wenn es bereits zahlreiche Hinweise gibt. Es konnte gezeigt werden, dass beide mARC-Proteine an der Detoxifizierung mutagener *N*-hydroxylierter Nukleinbasen und Nucleoside beteiligt sind (Wahl *et al.*, 2010; Krompholz *et al.*, 2012). Eine mögliche physiologische Funktion von mARC könnte somit darin bestehen, die Ansammlung mutagener Substanzen in Geweben zu verhindern. Die Herunterregulierung von mARC2 in Darmtumoren humaner Gewebe stand mit dieser Vermutung im Einklang (Mikula *et al.*, 2010). Neben den mutagenen Basenanaloga ist das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem auch an der Detoxifizierung weiterer Hydroxylamine beteiligt. Ein Beispiel ist der im Körper gebildete *N*-hydroxylierte Metabolit von Sulfamethoxazol (Ott *et al.*, 2014).

Eine weitere mögliche physiologische Funktion von mARC stellt die Beteiligung am *NO*-Stoffwechsel dar. In *in vitro* Rekonstitutions-Assays mit rekombinanten Enzymen und anhand mitochondrialer Fraktionen konnte gezeigt werden, dass das mARC-abhängige *N*-reduktive Enzymsystem in der Lage war den *NO*-Mediator *N*<sup>4</sup>-hydroxy-L-Arginin zu Arginin zu reduzieren (Kotthaus *et al.*, 2011). Weitere Studien hinsichtlich des *NO*-Stoffwechsels konnten eine Beteiligung des *N*-reduktiven Enzymsystems an der anaeroben Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid belegen (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014).

Des Weiteren wird postuliert, dass eine mögliche Verbindung zwischen mARC2 und *Diabetes mellitus* existiert. In diabetischen Tiermodellstudien konnte in renalen Zellen eine Hochregulation von mARC2 unter Glukosebehandlung beobachtet werden (Malik *et al.*, 2007). In Betracht gezogen wird außerdem die Beteiligung von mARC an der Lipidsynthese. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von mARC2 eine Verminderung der Lipidsynthese zur Folge hatte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung von murinen Präadipozyten zu ausgereiften Adipozyten die Expression von mARC2 und die *N*-reduktive Aktivität steigen (Neve *et al.*, 2012). Auch in den Arbeiten von Jakobs *et al.* (2014) konnte ein Bezug zwischen mARC und dem Fettstoffwechsel nachgewiesen werden.

In der MGD (Mouse Genome Informatics)-Datenbank wird über eine homozygote mARC2-Knockout-Maus berichtet, welche lebensfähig war und verschiedene Veränderungen im Phänotyp aufwies. Die männlichen Mäuse zeigten einen gesteigerten Anteil fettfreier Körpermasse und einen erniedrigten Körperfettanteil. Des Weiteren waren sie zunehmend schreckhafter. Bei den weiblichen Mäusen wurde eine erhöhte

Leukozytenzahl und erhöhte zirkulierende Blutglukose beobachtet (Mouse Genome Database (MGD) Project, 2014).

### 1.3.2.2 Cytochrom $b_5$

Cytochrom  $b_5$  gehört zur Familie der Hämproteine. Es handelt sich um ein amphiphiles Protein, welches einen hydrophoben Membrananker am C-terminalen Ende und eine aktive, zum Cytosol gerichtete N-terminale Domäne aufweist (Borgese *et al.*, 1993a). Es existieren zwei membrangebundene Isoformen, welche die Produkte unterschiedlicher Gene sind. Zum einen Cytochrom  $b_5$  A, welches im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und zum anderen Cytochrom  $b_5$  B, welches ausschließlich in der äußeren mitochondrialen Membran vorkommt. Neben den membrangebundenen Formen existiert ebenfalls eine lösliche Form des Cytochrom  $b_5$ , welche durch dasselbe Gen wie die mikrosomale Isoform codiert und vermutlich durch alternatives Splicing generiert wird. Diese lösliche Form des Cytochrom  $b_5$  ist im Cytosol von Erythrozyten lokalisiert (Borgese *et al.*, 1993a).

In neuesten Studien konnte durch einen siRNA vermittelten Knockdown in humanen Zelllinien gezeigt werden, dass nur das mitochondriale und nicht das mikrosomale Cytochrom  $b_5$  an der Reduktion N-hydroxylierter Verbindungen beteiligt ist (Neve *et al.*, 2012; Plitzko *et al.*, 2013).

### 1.3.2.3 NADH-Cytochrom $b_5$ Reduktase

Die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase (CYB5R3) ist eine zur Familie der Flavoenzyme gehörende Oxidoreduktase und bindet FAD als Cofaktor. Sie katalysiert den Elektronentransfer vom Zweielektronendonator NADH zum Einelektronenakzeptor Cytochrom  $b_5$  (Kimura *et al.*, 2003). Das Gen für die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase (CYB5R3) ist auf Chromosom 22 lokalisiert und codiert für zwei Isoformen. Bei Isoform 1 handelt es sich um eine membrangebundene Form der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase, welche in der äußeren mitochondrialen Membran, im endoplasmatischen Retikulum und in weiteren Plasmamembranen zu finden ist. Die katalytisch aktive Domäne befindet sich am C-terminalen Ende und ist zur cytosolischen Seite orientiert. Isoform 2 stellt eine lösliche Form der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase dar, welche im Cytosol der Erythrozyten lokalisiert ist und zusammen mit Cytochrom  $b_5$  an der Reduktion von Methämoglobin beteiligt ist

(Borgese *et al.*, 1993a, 1993b). Im Gegensatz zur löslichen Form besitzt die membrangebundene Form einen kurzen Myristylanker am *N*-terminalen Ende. Abgesehen davon sind die beiden Formen identisch (Borgese and Longhi, 1990).

## 1.4 Thema und Zielsetzung der Arbeit

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte in Säugetieren bekannte Molybdoenzym, welches 2006 aus der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien gereinigt und identifiziert wurde (Havemeyer *et al.*, 2006). Zusammen mit den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase ist es an der Reduktion zahlreicher *N*-oxygenierter Verbindungen beteiligt. Gezeigt werden konnte die *N*-Reduktion bereits für Amidoxime, Hydroxylamine, Sulhydroxamsäuren, *N*-hydroxylierte Guanidine und Amidinohydrazone, Oxime und *N*-Oxide. Während die physiologische Funktion von mARC noch weitestgehend unbekannt ist, konnte die Beteiligung an der Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs und somit am Arzneistoffmetabolismus eindeutig gezeigt werden (Grünwald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010; Froriep *et al.*, 2013; Jakobs *et al.*, 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels Westernblotanalyse, anhand porciner hepatischer und extrahepatischer Gewebekomponenten und mitochondrialer Fraktionen, ein Expressionsprofil für mARC1 und mARC2 auf Proteinebene erstellt und mit den, in den Datenbanken vorhanden mRNA-Daten verglichen werden. Des Weiteren sollte durch Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität anhand des Markersubstrats Benzamidoxim, die Bedeutung des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems für den extrahepatischen Arzneistoffmetabolismus dargelegt werden. Außerdem sollte bestimmt werden, ob die Benzamidoximreduktaseaktivität in allen charakterisierten Geweben mit der mARC1- und mARC2-Expression korreliert oder ob es ein Gewebe gibt in dem mARC eventuell eine andere gewebespezifische Aufgabe besitzt. Die Gewebeverteilung der mARC-Proteine kann möglicherweise einen wichtigen Hinweis auf die physiologische Funktion geben.

mARC2 konnte 2006 aus der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien gereinigt werden (Havemeyer *et al.*, 2006). Im Folgenden beschäftigten sich verschiedene

Arbeitskreise mit der submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 (Neve *et al.*, 2012; Klein *et al.*, 2012). In diesen Studien wurden beide mARC-Proteine lediglich in der äußeren Mitochondrienmembran und in keiner anderen untersuchten Subfraktion gefunden. Da Cruz *et al.* (2003) hingegen meinen beide, damals noch uncharakterisierten mARC-Proteine in der inneren Mitochondrienmembran gefunden zu haben.

In den genannten Lokalisationsstudien, welche an unterschiedlichen Spezies durchgeführt wurden, wurde weitestgehend lediglich eine mARC-Isoform betrachtet. In dieser Arbeit sollte die submitochondriale Lokalisation von mARC1 und mARC2 innerhalb einer Spezies untersucht werden. Dazu sollten die mitochondriale Matrix, der mitochondriale Intermembranraum und die innere und äußere Mitochondrienmembran aus porcinen Lebermitochondrien isoliert und mittels geeigneter Markerenzyme auf Identität und Reinheit geprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zusätzlich Studien bezüglich der *N*-reduktiven Aktivität und der mARC-Expression an humanen Präparationen durchgeführt werden. Zum einen sollten humane Lebersubfraktionen und zum anderen humanes Vollblut und die daraus isolierten Blutfraktionen charakterisiert werden. Ziel war es zu ermitteln, ob es denkbar ist, dass bereits im Blut die Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs stattfindet. Neben dem Modellsubstrat Benzamidoxim sollte ebenfalls die Umsetzung von Sulfamethoxazolhydroxylamin zu Sulfamethoxazol durch humane Leberpräparationen untersucht werden.

Da speziesabhängig möglicherweise jeweils eine mARC-Isoform dominant zu sein schien, sollten die auf humaner Ebene ermittelten Daten mit den auf prociner Ebene erhaltenen Ergebnissen verglichen werden.



## 2 mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen Mitochondrien und Gewebekomponenten

---

### 2.1 Einleitung

#### 2.1.1 Bedeutung und Expression arzneistoffmetabolisierender Enzyme in extrahepatischen Geweben

Die Leber ist für den Metabolismus von Fremd- und Arzneistoffen, welche nach Absorption im Gastrointestinaltrakt in den Körper gelangen, der wichtigste Ort, da ein Großteil der arzneistoffmetabolisierenden Enzyme dort exprimiert wird. Arzneistoffmetabolisierende Enzyme, welche in der Leber vorkommen sind auch in extrahepatischen Organen und Geweben vertreten. Deren Expression variiert von Organ zu Organ, abhängig von der Arzneimittelaufnahme, den Essgewohnheiten und von Umwelteinflüssen. Es gibt einige Beispiele bei denen arzneistoffmetabolisierende Enzyme, aufgrund von Lebensgewohnheiten, in extrahepatischen Organen höher exprimiert werden als in der Leber (Jhajra *et al.*, 2011).

In der Lunge sind arzneistoffmetabolisierende Enzyme verantwortlich für den Metabolismus von Arzneistoffen und Umweltschadstoffen wie organische Lösungsmittel, welche in der Atemluft vorhanden sind (Bernauer *et al.*, 2006). Auch wenn diese Enzyme relativ gering exprimiert sind, schützen sie das Gehirn vor inhalierten Fremdstoffen (Ling *et al.*, 2004). Neben den inhalierten Fremdstoffen besitzen Arzneistoffe, welche parenteral verabreicht werden, das Potential in der Lunge zu akkumulieren, da der kardiale Ausstoß das pulmonale System erreicht bevor die Leber passiert wird. Beispielsweise werden die Cytochrom P450-Enzyme CYP1A1, CYP1B1 und CYP3A5 im Lungensystem im höheren Ausmaß exprimiert als in der Leber (Zhang *et al.*, 2006).

Im Gehirn sind CYP-Enzyme ungleichmäßig auf verschiedene Zellen und Regionen verteilt. Beispielsweise ist der CYP-Gehalt in mitochondrialen Fraktionen von Gehirnzellen neunmal höher als in den mikrosomalen Fraktionen (Gherzi-Egea *et al.*, 1993). Im Gehirn werden

zentralwirkende Arzneistoffe wie Analgetika, Betablocker, tricyclische Antidepressiva und Monoaminoxidaseinhibitoren metabolisiert (Dutheil *et al.*, 2008).

In der Haut sind die arzneistoffmetabolisierenden Enzyme unter anderem in Keratinozyten, Monozyten, Lymphozyten und Fibroblasten lokalisiert. CYP-Enzyme sollen die Haut vor Allergenen, Umweltgiften, Karzinogenen und Inhaltsstoffen von Pflegeprodukten schützen (Jhajra *et al.*, 2011).

In der Niere sind die arzneistoffmetabolisierenden Enzyme neben dem Nierenmark auch in der Nierenrinde lokalisiert. Im Gegensatz zur Leber finden in der Niere weniger Phase I Reaktionen statt. Eine wichtige Rolle spielen hier die Konjugationsreaktionen, wie beispielsweise Glucuronidierungen, da sie die Elimination von Arzneistoffen verbessern (Kroemer und Klotz, 1992). Die UDP-Glucuronosyltransferase ist im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und ist an der Detoxifizierung von Xenobiotika und körpereigenen Stoffen beteiligt. Ein Großteil der eingesetzten Arzneistoffe (40 - 70 %) werden glucuronidiert, dadurch entstehen hydrophilere Produkte mit geringerer pharmakologischer Aktivität (Lyubimov, 2012). Die Glucuronsäure wird beispielsweise auf Hydroxyl-, Carboxyl- und Aminogruppen übertragen (Kroemer und Klotz, 1992). Extrahepatisch sind die höchsten Aktivitäten der UDP-Glucuronosyltransferase in der Niere, dem Gastrointestinaltrakt und der Lunge vorhanden (Pacifici *et al.*, 1988a).

Die Glutathion S-Transferase ist für die Detoxifizierung elektrophiler Verbindungen verantwortlich und ist in der Biotransformation ein wichtiges Phase II Enzym (De Waziers *et al.*, 1990; Vincenzini *et al.*, 1991). Glutathion S-Transferasen sind in allen Geweben weitverbreitet. Neben der Leber, weisen die Niere, die Lunge und der Gastrointestinaltrakt die höchsten Aktivitäten auf (Pacifici *et al.*, 1988a).

Die Epoxidhydrolasen sind Phase I Enzyme, welche die Hydrolyse von Epoxiden katalysieren und dadurch eine protektive Wirkung haben (Jhajra *et al.*, 2011). Da Epoxide ein Ergebnis der oxidativen Cytochrom P450 Reaktionen sind, welche mit großem Anteil in der Leber vorkommen, werden auch die Epoxidhydrolasen im Vergleich zu anderen Geweben hier am stärksten exprimiert (Pacifici und Rane, 1982; Pacifici *et al.*, 1988b; Pacifici *et al.*, 1988a; Pacifici *et al.*, 1989; De Waziers *et al.*, 1990). Epoxidhydrolasen sind ebenfalls in den bronchialen Epithelzellen der Lunge lokalisiert und besitzen hier eine Schutzfunktion vor Lungenkrebs, indem sie karzinogene polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, welche

im Körper zu Epoxiden oxidiert werden, hydrolysieren (Willey *et al.*, 1997). Epoxidhydrolasen wurden auch in der Epidermis, der Dermis, den Epithelzellen und den Fibroblasten der Haut gefunden. In der Niere hingegen konnten nur geringe Anteile detektiert werden (De Waziers *et al.*, 1990).

Arzneistoffmetabolisierende Enzyme werden hauptsächlich in der Leber exprimiert, dennoch kann ihre Rolle in extrahepatischen Organen, wie dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge, den Nieren, dem Gehirn, dem Herzen und der Haut, nicht vernachlässigt werden. Generell ist die Expression von arzneistoffmetabolisierenden Enzymen in den extrahepatischen Organen geringer, dennoch gibt es Enzyme wie CYP1A1, CYP1B1 und CYP3A5, welche extrahepatisch stärker vertreten sind als in hepatischen Geweben (Jhajra *et al.*, 2011). Die Aktivität und extrahepatische Expression wird oft durch Gabe mehrerer Arzneistoffe, welche zu Arzneistoffinteraktionen führen, verändert. Bei Erkrankungen wie Leberzirrhose sind die extrahepatischen Gewebe in der Lage den verminderten Xenobiotikametabolismus der Leber bis zu einem gewissen Grad zu kompensieren (Krishna und Klotz, 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass das mARC-abhängige N-reduktive Enzymsystem an der Aktivierung N-hydroxylierter Prodrugs beteiligt ist und somit auch eine Rolle im Arzneistoffmetabolismus spielt (Grünwald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010; Jakobs *et al.*, 2014). Clement *et al.* (2005) demonstrierten, dass die N-Reduktion neben der Leber auch in extrahepatischen Geweben von Bedeutung ist. Die höchsten Umsetzungsraten wurden in der Niere ermittelt. Des Weiteren besagen die mRNA-Expressionsdaten für die beiden mARC-Proteine, dass nicht nur in der Leber, sondern auch in extrahepatischen Geweben hohe mRNA-Level für mARC1 und mARC2 zu finden sind (siehe Anhang Kap. 6.3). Für das mARC-haltige Enzymsystem werden neben seiner Beteiligung am Arzneistoffmetabolismus auch wichtige physiologische Funktionen postuliert (Kap. 1.3.2.1).

Obwohl in der Vergangenheit viel hinsichtlich der Erforschung arzneistoffmetabolisierender Enzyme und ihrer Aufgabe in extrahepatischen Organen erreicht wurde, gibt es noch viele ungeklärte Aspekte. Der gesamte Beitrag extrahepatischer arzneistoffmetabolisierender Enzyme zur Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, welche nicht paraneural gegeben werden, und Arzneistoffinteraktionen und die damit verbundene Organtoxizität sind noch nicht vollständig geklärt (Jhajra *et al.*, 2011).

### 2.1.2 Thema und Zielsetzung

In vorangegangenen Studien konnte die Beteiligung des in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten mARC-haltigen Dreikomponentenenzymystems an der Reduktion zahlreicher *N*-hydroxylierter Prodrugs und mutagener Basen gezeigt werden (Grünewald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010; Krompholz *et al.*, 2012). Für diese *in vitro* Biotransformationsstudien wurden hauptsächlich porcine hepatische und extrahepatische Mitochondrienfraktionen und rekombinante Enzyme eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es für die in diesen *in vitro* Biotransformationsstudien genutzten Mitochondrien ein Expressionsprofil für mARC1 und mARC2 unter Verwendung spezifischer Antikörper zu erstellen. Die anhand des Modellsubstrats Benzamidoxim in den Mitochondrien ermittelten *N*-reduktiven Aktivitäten sollten anschließend mit der mARC1- und mARC2-Expression verglichen werden. Dadurch sollte gezeigt werden, ob die Expression ein oder beider mARC-Enzyme mit der *N*-reduktiven Aktivität korrelierte.

Obwohl die mARC-abhängige Reduktaseaktivität nur in Mitochondrien lokalisiert ist, gibt es Hinweise, dass mARC neben der mitochondrialen auch eine peroxisomale Lokalisation aufweist (Wiese *et al.*, 2007; Islinger *et al.*, 2007; Gabel, 2011). Aufgrund dessen, und weil die gewonnenen Mitochondrienfraktionen durch die verschiedenen strukturellen Eigenschaften der Gewebe unterschiedlich rein waren, sollten zusätzlich Gewebehomogenate hinsichtlich ihrer mARC-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität charakterisiert werden. Nach den von Clement *et al.* (2005) durchgeführten Studien zum extrahepatischen *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus, sollte die Bedeutung der mARC-abhängigen *N*-Reduktion in extrahepatischen Geweben und Organen weiter unterstrichen werden. Es sollte untersucht werden, ob die Expression ein oder beider mARC-Proteine in allen untersuchten Gewebehomogenaten mit der *N*-reduktiven Aktivität korrelierte und in welchem Gewebe mARC außer der *N*-Reduktion möglicherweise eine andere gewebespezifische Aufgabe besitzt. Des Weiteren könnte die Gewebeverteilung der mARC-Proteine eventuell einen wichtigen Hinweis auf die physiologische Funktion geben. Die auf Proteinebene ermittelten Expressionsdaten sollten außerdem mit den mRNA-Daten verglichen werden.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Materialien und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Kap. 7 aufgelistet.

Das Benzamidoxim wurde aus Hydroxylamin und Benzonitril synthetisiert und in üblicherweise charakterisiert (Krüger, 1885).

### 2.2.2 Proteinquellen

#### 2.2.2.1 Aufarbeitung porciner Gewebehomogenate

Die porcinen Organe und Gewebe zur Gewinnung der Homogenate wurden aus einer ortsnahen Großschlachtereier (Großschlachtereier Thomsen, Kellinghusen) bezogen. Es wurden zwei Chargen der Gewebehomogenate gewonnen. In jeder Charge wurden mindestens drei der jeweiligen Gewebe gepoolt, welche von mindestens drei verschiedenen Schweinen stammten. Bei den Schweinen handelte es sich um weibliche oder männliche kastrierte Tiere. Alle Arbeitsschritte zur Aufarbeitung der Gewebehomogenate erfolgten bei 4 °C. Zunächst wurden die Gewebe, wenn möglich mit Standardpuffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) perfundiert, um einen Großteil des Blutes zu entfernen. Anschließend wurden sie drei- bis fünfmal durch den Fleischwolf gegeben und in Standardpuffer suspendiert. Der erhaltene Gewebebrei wurde zusätzlich mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Abschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 g um Bindegewebsstücke abzutrennen.

#### 2.2.2.2 Gewinnung der mitochondrialen Fraktionen

Die zur Gewinnung der Mitochondrien verwendeten Organe und Gewebe stammten aus einer ortsnahen Schlachtereier (Großschlachtereier Thomsen, Kellinghusen; Schlachtereier Neidhardt, Holtsee). Es wurden mindestens drei der jeweiligen Gewebe gepoolt, welche von mindestens drei verschiedenen Schweinen stammten. Bei den Schweinen handelte es sich um weibliche oder männliche kastrierte Tiere. Die Isolierung erfolgte nach einer im Arbeitskreis gut etablierten Methode mittels Differential- und Dichtegradientenzentrifugation (Clement *et al.*, 2005; Havemeyer *et al.*, 2006).

### 2.2.2.3 Rekombinante Enzymquellen

In dieser Arbeit wurden die folgenden rekombinanten Proteine verwendet: humanes mARC1 (NP\_073583), humanes mARC2 (NP\_060386), humanes mitochondriales Cytochrom  $b_5$  (NP\_085056) und die humane NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase (NP\_000389). Diese Proteine wurden uns vom Arbeitskreis Mendel der Technische Universität Braunschweig zur Verfügung gestellt. Die Klonierung, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte wie bei Wahl *et al.* (2010) beschrieben. Die rekombinante Herstellung der mARC-Proteine erfolgte im *E. coli* Stamm TP1000 und die von Cytochrom  $b_5$  und der humanen NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase im *E. coli* Stamm DL 41. Die rekombinanten mARC-Proteine und die Cytochrom  $b_5$  Reduktase waren N-terminal verkürzt. Cytochrom  $b_5$  wies eine Verkürzung am C-terminalen Ende auf.

## 2.2.3 Charakterisierung der porcinen Enzymquellen

### 2.2.3.1 Proteingehaltsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteingehälter wurde die BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985), unter Verwendung des BCA Assay Kits von Pierce (Rockford, USA) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit vorheriger Fällung der Proteine, nach Herstellerangaben. Die photometrische Auswertung der Proben wurde bei 562 nm vorgenommen. Anhand einer Sechs-Punkt-Kalibrierung mit dem im Kit enthaltenen Rinderserumalbumin-Standard wurden die Proteinkonzentrationen berechnet.

### 2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach der von Laemmli beschriebenen diskontinuierlichen Methode durchgeführt (Laemmli, 1970).

Die Proteinproben wurden vor Durchführung der SDS-PAGE mit *Aqua bidest* auf einen einheitlichen Proteingehalt verdünnt, 3:1 mit Probenauftragspuffer versetzt, 5 Minuten im siedenden Wasserbad denaturiert und 5 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific (Rockford, USA) verwendet. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde zunächst eine 10 minütige Spannung von 60 V und anschließend eine 60

minütige Spannung von 175 V angelegt. Fortführend erfolgte eine Westernblotanalyse (Kap. 2.2.3.3).

### **2.2.3.3 Westernblot**

Zur Westernblotanalyse wurde das sogenannte Wet-Verfahren eingesetzt. Die Proteine wurden nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel, durch anlegen einer Spannung von 90 V für 2 h, auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Hybond-P, Amersham GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) transferiert. Zum Blocken der Membran wurde eine 5 %ige (m/v) Milchpulverlösung eingesetzt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels Immunodetektion. Die eingesetzten Primärantikörper und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper sind im Kap. 7.1 aufgeführt.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Einsatz eines ECL-Reagenz (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) und anschließender Dokumentation des Chemielumineszenzsignals auf Fotofilm (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Die semiquantitative Auswertung der Fotofilme wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt.

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

Die N-reduktive Aktivität in den porcinen Gewebehomogenaten wurde anhand der Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt.

#### **2.2.3.4.1 *In vitro* Inkubationsansatz**

Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 150 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 0,1 mg Protein, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrats gestartet. Die Reaktion wurde nach 40 Minuten durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Methanol gestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt, anschließend wurde das Protein 5 Minuten bei 11.000 g abzentrifugiert.

Gebildetes Benzamidin wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik (Kap. 2.2.3.5) im Überstand vermessen. Jeder Inkubationsansatz wurde doppelt angesetzt und jeweils zweifach vermessen. Zusätzlich wurden zur Kontrolle zwei Inkubationsansätze ohne Protein zur Überprüfung des nicht-enzymatisch gebildeten Benzamidins vermessen, sowie 5 µM Benzamidinlösung zur Überprüfung der Kalibrierfunktion.

#### 2.2.3.4.2 Substratabhängigkeit

Eine Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch die porcinen Gewebehomogenate wurde nach der in Kap. 2.2.3.4.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Eingesetzt wurden Benzamidoximkonzentrationen von 0,05 - 3 mM. Die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter ( $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte) erfolgte über eine nichtlineare Regressionsanalytik (SigmaPlot 11.0) nach der Funktion  $V = (V_{\max} \times C_{\text{BAO}}) / (K_m + C_{\text{BAO}})$ .

#### 2.2.3.5 HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamidin

Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins erfolgte nach der im Arbeitskreis etablierten Methode von Clement *et al.* (2005). Folgendes System wurde verwendet:

HPLC Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump	
Detektor	Waters 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	Waters Breeze Vers. 3.30	
Stationäre Phase	LiChroCART 250-4, LiChrospher® 60, RP-select B (5 µm)	
Mobile Phase	83 % 10 mM 1-Octylsulfonat (v/v) in <i>Aqua bidest</i> 17 % Acetonitril (v/v)	
Flussrate	1,0 ml / min	
Laufzeit	30 min	
Detektion	UV, 229 nm	
Injektionsvolumen	40 µl	
Retentionszeit	Benzamidoxim	8 ± 1 min
	Benzamidin	24 ± 1 min



Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde vor Gebrauch durch einen Satorius® Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Die gesamte mobile Phase wurde vor Verwendung 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung wurde Benzamidin in verschiedenen Konzentrationen (0,05 - 500 µM) in der mobilen Phase gelöst und mit der beschriebenen HPLC-Methode analysiert. Es wurden Doppelansätze pipettiert, welche zweimal vermessen wurden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,5 µM Benzamidin.

#### **2.2.3.6 Bestimmung des Molybdängehalts**

Die Bestimmung des Molybdängehalts erfolgte mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) und wurde am Geologischen Institut der CAU Kiel durchgeführt. Die Homogenatproben wurden mit Lagerpuffer (25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 % (m/v) Glycerol, pH 7,4) auf einen bestimmten Proteingehalt (3 - 77 mg/ml) verdünnt, wobei von jeder Probe drei unterschiedliche Verdünnungen einfach vermessen wurden. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte wie bei Kotthaus *et al.* (2011) beschrieben. Für die Kalibrierung der Methode wurde eine 5 und 50 ppb haltige Molybdänlösung eingesetzt. Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,5 ng/ml Molybdän. Als Kontrolle wurde Gesteinsreferenzmaterial (BIR-1 und BHVO-2) mit bekanntem Molybdängehalt vermessen.

#### **2.2.3.7 Citratsynthase-Aktivitätsbestimmung**

Die Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch in Anlehnung an die von Srere (1969) beschriebene Methode. Der Enzymassay mit einem Gesamtvolumen von 1000 µl setzte sich folgendermaßen zusammen: 125 µg porcines Gewebehomogenat, 0,1 mM Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), 0,1 mM 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), 0,25 % (m/v) Triton X-100 und 0,5 mM Oxalacetat in *Aqua bidest.* Die Reagenzien wurden stets frisch in den folgenden Lösungen und Puffern gelöst: Acetyl-CoA in *Aqua bidest*, Oxalacetat in 0,1 M Triethanolamin-HCl Puffer (0,1 M EDTA, pH 8,0), DTNB in 1 M Tris-HCl Puffer (pH 8,1). Die Proteine wurden mit 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,0) auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt.

Nach fünfminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrats gestartet und die Absorptionzunahme bei 412 nm über eine Messzeit von 1 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur verfolgt. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Reaktionsansätze vermessen.

Die Citratsynthase katalysiert die Reaktion von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und Coenzym A, welches irreversibel mit DTNB zu 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) reagiert.

Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde der molare Absorptionskoeffizient  $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  des gebildeten TNB verwendet (Srere, 1969)

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen Mitochondrien

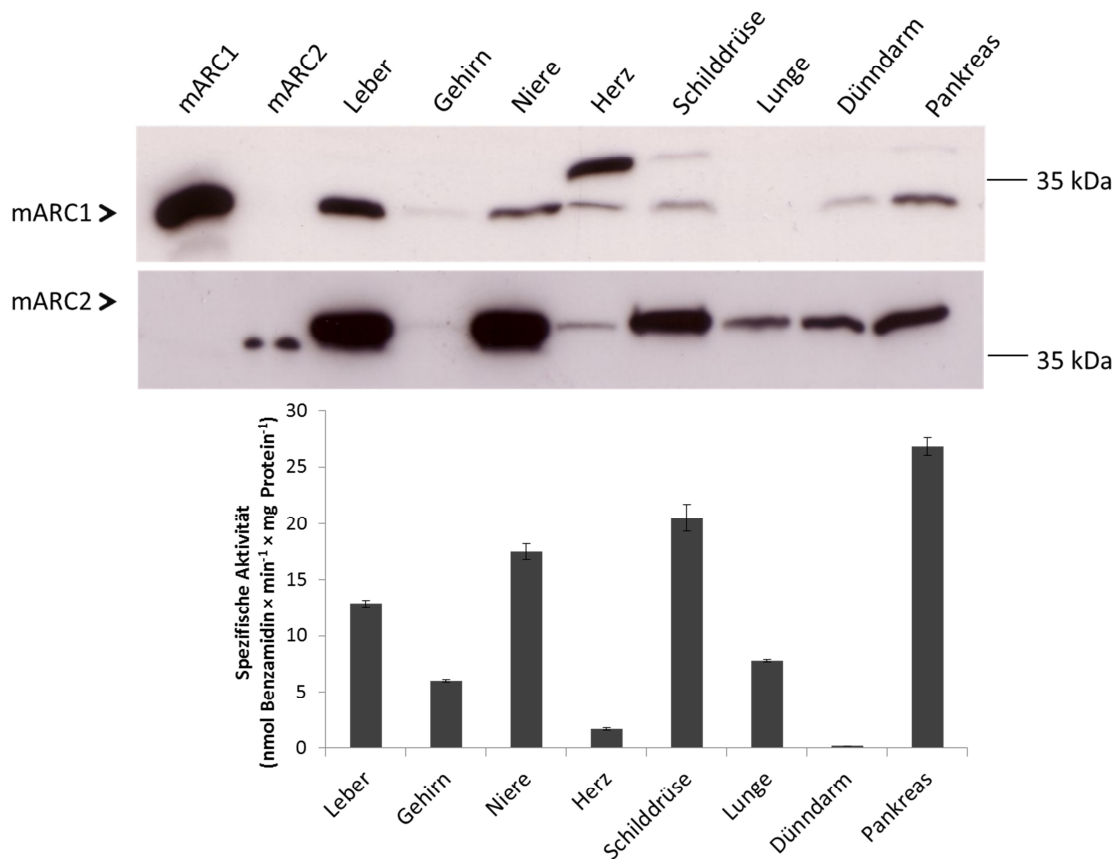
Die Gewinnung der mitochondrialen Fraktionen erfolgte aus den jeweiligen Gewebehomogenaten nach der in Kap. 2.2.2.2 angegebenen Methode.

Die mARC1- und mARC2-Expression wurde mittels Westernblotanalyse charakterisiert (Abb. 2.3.1). Um die Spezifität der gegen humanes mARC1 und mARC2 gerichteten Antikörper zu überprüfen, wurden rekombinantes humanes mARC1 und mARC2 in gleichen Mengen aufgetragen. Der mARC1-Antikörper erkannte nur das rekombinante humane mARC1 und nicht das zur Kontrolle aufgetragene rekombinante mARC2. Der mARC2-Antikörper erkannte dementsprechend ausschließlich das rekombinante humane mARC2.

mARC1 konnte am stärksten in den Mitochondrienfraktionen von Herz und Leber detektiert werden. Die höchste mARC2-Expression wurde in den mitochondrialen Fraktionen von Leber, Niere, Schilddrüse und Pankreas ermittelt. Die mARC2-Expression korrelierte deutlich mit der mARC vermittelten Reduktaseaktivität, denn die höchsten Umsatzraten wurden in den Leber-, Nieren-, Schilddrüsen- und Pankreasmitochondrien gemessen (Abb. 2.3.1). In allen untersuchten mitochondrialen Fraktionen konnten, mit Ausnahme der Lunge, beide mARC-Enzyme detektiert werden. In der Lunge wurde ausschließlich mARC2 nachgewiesen. Dennoch waren deutliche Umsatzraten zu messen. Im Vergleich dazu wurde im Herzen die höchste mARC1-Expression, bei lediglich geringer Expression von mARC2, detektiert. Die im Herzen ermittelte Benzamidoximreduktaseaktivität fiel vergleichsweise gering aus.

Demzufolge scheint die *N*-reduktive Aktivität in den porcinen Mitochondrien vor allem durch mARC2 bedingt zu sein. Trotzdem beide mARC-Proteine in der Lage sind, *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren (Plitzko *et al.*, 2013), liegt die Vermutung nahe, dass mARC1 in den charakterisierten porcinen Mitochondrienfraktionen eher eine untergeordnete Rolle spielt. Betrachtete man die Westernblotsignale des rekombinanten mARC1 und mARC2 im Vergleich zu den in den Mitochondrien detektierten Signalen, wurde deutlich, dass mARC2 auf porciner Ebene die vorherrschende Isoform ist und stärker exprimiert wird als mARC1.

Die in Abb. 2.3.1 dargestellten Umsetzungsraten von Benzamidoxim zu Benzamidin, wurden aus der Arbeit von Krischkowski (2010) herangezogen, um die Korrelation zwischen der mARC-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität in den mitochondrialen Fraktionen aufzuzeigen.



**Abb. 2.3.1 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin und Westernblotanalyse zur Expression von mARC1 und mARC2 in porcinen Mitochondrienfraktionen**

Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 20 µg porcines Protein für die Analyse von mARC1 und 15 µg porcines Protein für die Analyse von mARC2 aufgetragen. Zur Kontrolle wurde des Weiteren 0,05 µg rekombinantes mARC1 und 0,05 µg rekombinantes mARC2 eingesetzt. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Anti-mARC1 (1:1.000) und anti-mARC2 (1:10.000).

Die Inkubation wurde wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 oder 0,1 mg porcines Protein, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden. Die ermittelten Umsetzungsraten stammten aus der Arbeit von Krischkowski (2010).

In Tab. 2.3.1 wurden die Intensitäten der mARC1- und mARC2-Banden aus Abb. 2.3.1 semiquantitativ dargestellt. Wie bereits aus den Westernblots ersichtlich war, gehörten zu den Geweben mit hoher mARC1-Expression das Herz und die Leber. mARC2 wurde am stärksten in der Niere, der Leber, der Schilddrüse und dem Pankreas exprimiert. Die

Auswertung erfolgte wie in Kap. 2.2.3.3 angegeben. mARC1 und mARC2 dürfen aus dieser Darstellungsweise nicht direkt miteinander verglichen werden.

Gewebe	Leber	Gehirn	Niere	Herz	Schilddrüse	Lunge	Dünndarm	Pankreas
<sup>a</sup> mARC1 (%)	100	8	50	111	27	2	12	42
<sup>a</sup> mARC2 (%)	100	12	104	12	58	21	26	44

**Tab. 2.3.1 Semiquantitative Darstellung der mARC1- und mARC2-Expression in den porcinen mitochondrialen Fraktionen**

<sup>a</sup> Die mARC1- bzw. mARC2-Expression in der Leberfraktion wurde auf 100 % festgelegt.

In Tab. 2.3.2 sind die Anreicherungsfaktoren der N-reduktiven Aktivität in den mitochondrialen Fraktionen gegenüber ihren jeweiligen Homogenaten dargestellt. Der größte Anreicherungsfaktor wurde in den Mitochondrienfraktionen von Schilddrüse, Pankreas, Lunge und Gehirn erhalten. Dies deutete darauf hin, dass diese mitochondrialen Fraktionen einen höheren Mitochondrienanteil pro Milligramm Protein und weniger Crosskontaminationen mit anderen Zellorganellen, wie beispielweise Mikrosomen, aufwiesen (Krischkowski, 2010). Die in der Tab. 2.3.2 aufgeführten spezifischen Aktivitäten wurden aus der Arbeit von Krischkowski (2010) herangezogen. Diese Daten wurden hier aufgeführt, um Rückschlüsse auf die Reinheit der, hinsichtlich mARC1 und mARC2 charakterisierten Mitochondrienfraktionen, zu ziehen.

Gewebe	Homogenat		Mitochondrien
	Spezifische Aktivität (nmol × min <sup>-1</sup> × mg <sup>-1</sup> )	Spezifische Aktivität (nmol × min <sup>-1</sup> × mg <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> Anreicherungsfaktor
Leber	4,5 ± 0,1	12,9 ± 0,3	3
Gehirn	0,7 ± 0,1	6,0 ± 0,1	9
Niere	13,7 ± 2,1	17,5 ± 0,7	1
Herz	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	6
Schilddrüse	0,3 ± 0,1	20,5 ± 1,2	68
Lunge	0,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1	11
Dünndarm	-	0,2 ± 0,0	-
Pankreas	1,1 ± 0,1	26,8 ± 0,8	24

**Tab. 2.3.2 Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in den mitochondrialen Fraktionen gegenüber den Homogenaten**

*Die Inkubation wurde wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 oder 0,1 mg porcines Protein, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden. Die ermittelten Umsatzraten stammten aus der Arbeit von Krischkowski (2010).*

<sup>a</sup>Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in den Mitochondrienfraktionen gegenüber dem Homogenat.

## 2.3.2 mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen Gewebehomogenaten

### 2.3.2.1 Korrelation der mARC-Expression mit der N-reduktiven Aktivität in den porcinen Gewebehomogenaten

In Abb. 2.3.2 sind die Ergebnisse der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin und die der Westernblotanalyse zur Expression von mARC1 und mARC2 in den porcinen Gewebehomogenaten dargestellt. Die dargestellten Aktivitäten sind Mittelwerte aus Charge 1 und Charge 2. Die Aufarbeitung der Gewebehomogenate erfolgte wie in Kap.2.2.2.1 beschrieben.

Es handelte sich nicht um dieselben Homogenate aus denen die in Kap. 2.3.1 analysierten Mitochondrien gewonnen wurden.

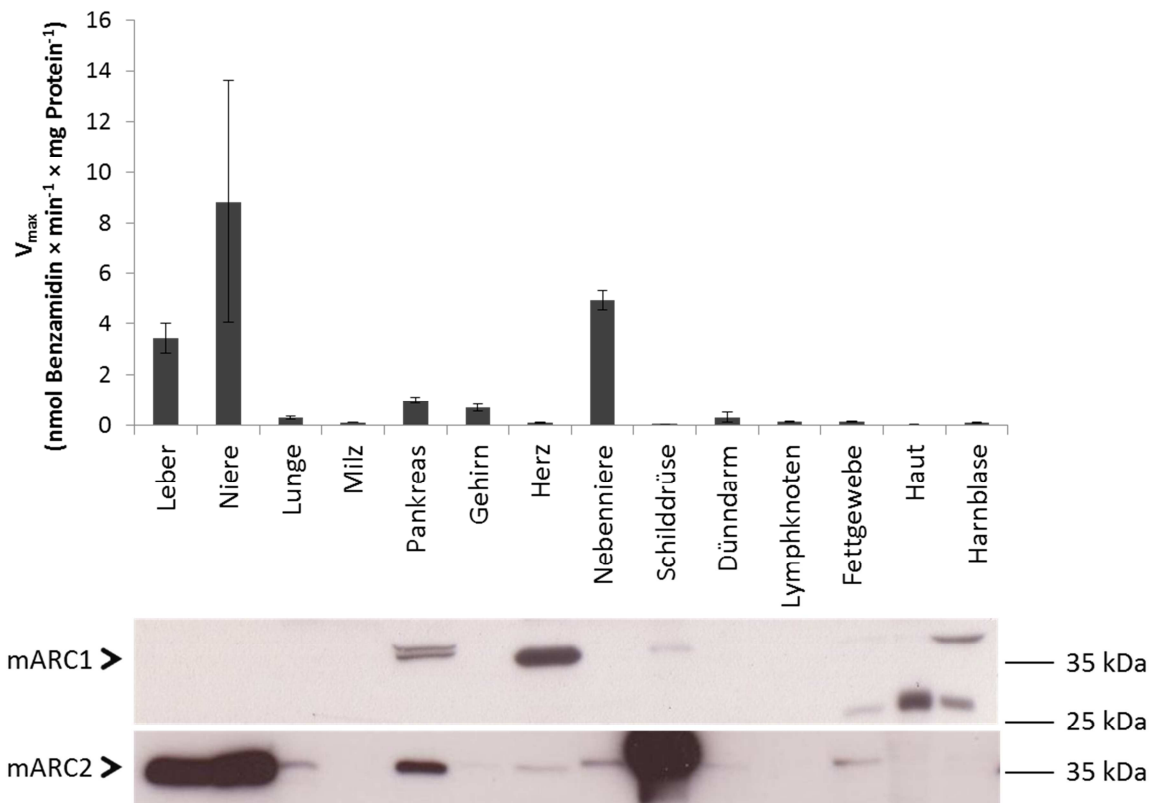
Die mARC-Expression wurde mit spezifischen Antikörpern gegen humanes mARC1 und mARC2 bestimmt. In Abb. 2.3.2 ist beispielhaft die Westernblotanalyse zur mARC-Expression der Charge 1 dargestellt (Westernblotanalyse Charge 2 siehe Anhang Kap. 6.1.1., Abb. 6.1.1). Eine hohe mARC1-Expression war in den Gewebehomogenaten von Pankreas, Herz, Haut und Harnblase zu verzeichnen.

mARC2 war am stärksten in den Gewebehomogenaten von Leber, Niere, Lunge, Schilddrüse und Pankreas exprimiert. Mit Ausnahme der Milz und den Lymphknoten, konnte in allen charakterisierten Gewebehomogenaten stets mindestens eines der beiden mARC-Proteine detektiert werden. Die mARC2-Bande im Gehirn war jedoch nur schwach erkennbar.

Ersichtlich war, dass die mARC2-Expression in den Gewebehomogenaten mit der Reduktaseaktivität korrelierte. In den Geweben mit deutlicher mARC2-Expression, wurden die höchsten Umsetzungsraten bestimmt. Im Schilddrüsenhomogenat wurde ebenfalls eine hohe mARC2-Expression nachgewiesen, bei jedoch geringer *N*-reduktiver Aktivität. Die an der *N*-Reduktion beteiligten Elektronentransportproteine Cytochrom  $b_5$  B und die Cytochrom  $b_5$  Reduktase konnten, im Gegensatz zu den anderen Gewebehomogenaten, hier nicht detektiert werden (Westernblotanalyse siehe Anhang Kap. 6.1.2: Abb. 6.1.3 und Abb. 6.1.4). Dies stimmte mit der niedrigen Reduktaseaktivität überein.

Die hohe mARC1-Expression im Herzhomogenat korrelierte nicht mit der vergleichsweise geringen Reduktaseaktivität. Cytochrom  $b_5$  B und die Cytochrom  $b_5$  Reduktase konnten deutlich detektiert werden.

In den Gewebehomogenaten von Milz und Lymphknoten, in denen kein mARC nachgewiesen werden konnte, wurden dementsprechend geringe *N*-reduktive Aktivitäten gemessen.



**Abb. 2.3.2 Maximale Reaktionsgeschwindigkeiten der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin und Westernblotanalyse zur Expression von mARC1 und mARC2 in den porcinen Gewebehomogenaten**

Die Inkubationen wurden wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,1 mg porcines Protein, 0 – 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 40 Minuten. Die Umsatzraten stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus den in Charge 1 und Charge 2 ermittelten Werten dar. Pro Charge wurden zwei Reaktionsansätze parallel inkubiert, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Westernblotanalyse (Charge 1) wurde wie in Kap. 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 35  $\mu$ g porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primäntikörper eingesetzt: Anti-mARC1 (1:1.000) und anti-mARC2 (1:10.000).

Die durch Bestimmung der Substratabhängigkeiten ermittelten  $K_m$ -Werte sind in Tab. 2.3.3 dargestellt. Die  $K_m$ -Werte der charakterisierten Gewebe lagen in ähnlichen Bereichen, wobei die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin einer Michaelis-Menten-Kinetik folgte. Die Kurvenverläufe sind im Anhang in Kap. 6.1.4 (Abb. 6.1.5 - Abb. 6.1.7) aufgeführt.



Gewebehomogenat	$K_m$ (mM)	Gewebehomogenat	$K_m$ (mM)
Leber	0,19 ± 0,10	Nebenniere	0,99 ± 0,44
Niere	0,67 ± 0,41	Schilddrüse	0,08 ± 0,05
Lunge	0,09 ± 0,01	Dünndarm	0,11 ± 0,00
Milz	0,08 ± 0,02	Lymphknoten	0,07 ± 0,04
Pankreas	0,09 ± 0,03	Fettgewebe	0,19 ± 0,02
Gehirn	0,15 ± 0,02	Haut	0,30 ± 0,25
Herz	0,07 ± 0,00	Harnblase	0,15 ± 0,05

**Tab. 2.3.3  $K_m$ -Werte der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Gewebehomogenate**

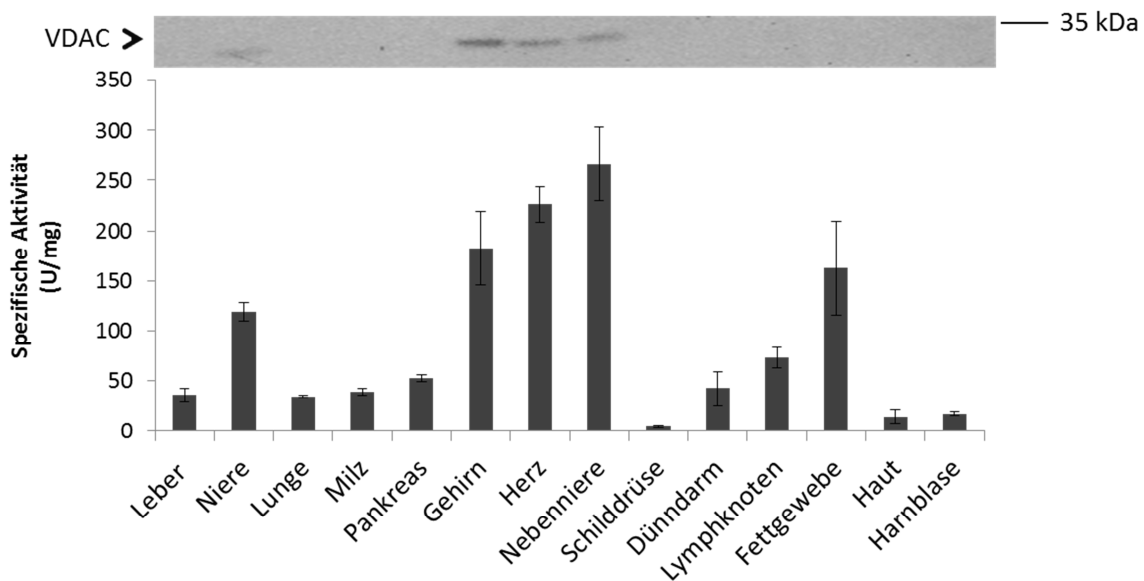
Die Inkubationen wurden wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,1 mg porcines Protein, 0 – 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 40 Minuten. Die Umsetzungsraten stellen Mittelwerte ± Standardabweichung aus den in Charge 1 und Charge 2 ermittelten Werten dar. Pro Charge wurden zwei Reaktionsansätze parallel inkubiert, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

### 2.3.2.2 Identifizierung mitochondrienreicher Gewebe

Um zu ermitteln, welche porcinen Gewebehomogenate reich an Mitochondrien sind, wurden diese hinsichtlich zwei mitochondrialer Markerproteine charakterisiert. Zum einen wurde ein Enzymassay zur Bestimmung der Citratsynthaseaktivität durchgeführt und zum anderen die Expression von VDAC (*Voltage-dependent anion channel*) mittels Westernblotanalyse bestimmt. Die Citratsynthase ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und katalysiert die Reaktion von Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat. VADC formt einen Kanal durch die äußere mitochondriale Membran und ermöglicht die Diffusion kleiner hydrophiler Moleküle (Yamamoto *et al.*, 2006). Des Weiteren ist VDAC an der Freisetzung apoptotischer Faktoren beteiligt und spielt somit eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod (Zalk *et al.*, 2005).

Wie aus Abb. 2.3.3 hervorgeht, wiesen die Homogenate von Niere, Gehirn, Herz und Nebenniere hohe Gehälter und Aktivitäten beider mitochondrialer Markerproteine auf. Im Fettgewebe wurde eine hohe Citratsynthaseaktivität gemessen, der mitochondriale

Ionenkanal VDAC wurde jedoch nicht detektiert. In den Gewebehomogenaten von Schilddrüse, Haut und Harnblase wurde lediglich eine geringe Enzymaktivität ermittelt und VDAC nicht detektiert. Um besonders mitochondrienreiche Organe handelt es sich demnach bei der Niere, dem Gehirn, dem Herzen und der Nebenniere. Die VDAC-Expression in Charge 1 korrelierte mit den in Charge 2 ermittelten Daten. Der entsprechende Westernblot ist im Anhang in Kap. 6.1.2 (Abb. 6.1.2) dargestellt.



**Abb. 2.3.3 VDAC-Expression und Citratsynthaseaktivität in porcinen Gewebehomogenaten**

Die Westernblotanalyse (Charge 1) wurde wie in Kap. 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 35 µg porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurde folgender Primärantikörper eingesetzt: Anti-VDAC (1:1.000).

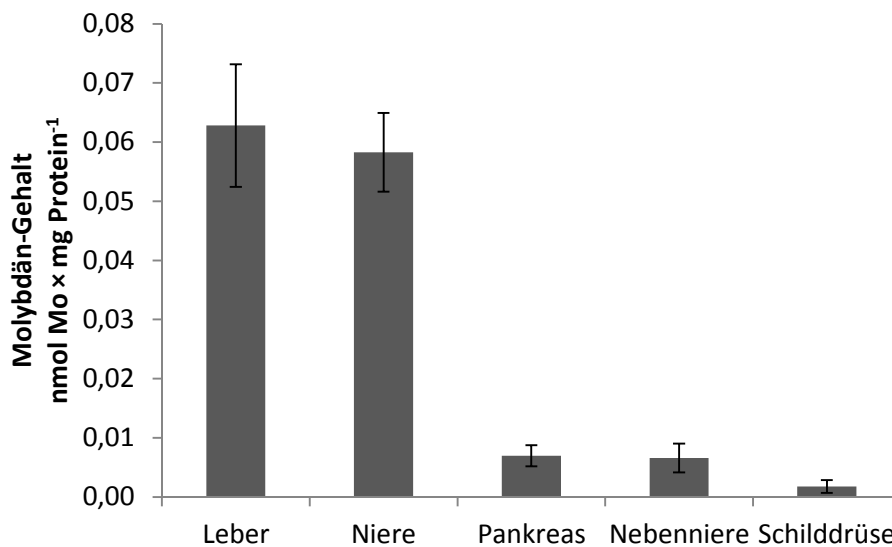
Der Enzymassay wurde wie in Kap. 2.2.3.7 beschrieben durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen: 125 µg porcines Protein, 0,1 mM Acetyl-CoA, 0,1 mM DTNB, 0,25 % (m/v) Triton X-100 und 0,5 mM Oxalacetat in Aqua bidest. Die ermittelten Enzymaktivitäten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus den in Charge 1 und Charge 2 ermittelten Werten. Pro Charge erfolgten drei voneinander unabhängige Einzelmessungen.

Eine Korrelation der in den Gewebehomogenaten ermittelten N-reduktiven Aktivität (Abb. 2.3.2) mit den mitochondrialen Markerenzymen war nur teilweise erkennbar. Das Nieren- und Nebennierenhomogenat wiesen sowohl einen hohen Anteil der mitochondrialen Markerenzyme auf, als auch eine hohe N-reduktive Aktivität. Ebenfalls waren im Herzen und im Gehirn die gewählten Mitochondrienmarker stark vertreten, jedoch wurde nur eine

geringe N-Reduktion detektiert. Zwischen den gewählten mitochondrialen Markerenzymen und der mARC-Expression war ebenfalls keine Korrelation zu verzeichnen. Beispielsweise wurde in der Leber und der Schilddrüse eine vergleichsweise geringe Citratsynthaseaktivität, bei jedoch hoher mARC-Expression nachgewiesen.

### 2.3.2.3 Molybdängehalt

Da es sich bei mARC um ein molybdänhaltiges Enzym handelt wurde mittels ICP-MS-Analyse (Kap. 2.2.3.6) der Molybdängehalt für die porcinen Gewebehomogenate bestimmt, welche eine hohe mARC2-Expression aufwiesen. Im Leber- und Nierenhomogenat konnte der höchste Molybdängehalt gemessen werden. Das Schilddrüsenhomogenat enthielt eine vergleichsweise geringe Menge Molybdän und schien somit kein, für Molybdoenzyme typisches Organ zu sein (Abb. 2.3.4). Zu berücksichtigen war, dass es sich um den Gesamtmolybdängehalt in den untersuchten Homogenatproben handelte und somit auch das Molybdän anderer Molybdoenzyme erfasst wurde.



**Abb. 2.3.4 Molybdängehalt in den porcinen Gewebehomogenaten**

*Die ermittelten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus den in Charge 1 und Charge 2 ermittelten Werten. Pro Charge erfolgten drei voneinander unabhängige Einzelmessungen.*

## 2.4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde auf Proteinebene ein Expressionsprofil für mARC1 und mARC2 in porcinen hepatischen und extrahepatischen mitochondrialen Fraktionen und Gewebehomogenaten ermittelt und mit der Benzamidoxim-Reduktaseaktivität verglichen. Dabei konnte in allen charakterisierten Geweben stets mindestens eines, der in ihrer Sequenz sehr ähnlichen mARC-Enzyme detektiert werden. Auch die anhand des Markersubstrats Benzamidoxim ermittelte *N*-reduktive Aktivität war in allen untersuchten Geweben detektierbar und korrelierte weitestgehend mit der mARC-Expression.

Es wurden die folgenden, im Arbeitskreis für zahlreiche *in vitro* Biotransformationsstudien eingesetzten mitochondrialen Fraktionen (Krischkowski, 2010) hepatischer und extrahepatischer Organe untersucht: Dünndarm, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Niere, Pankreas und Schilddrüse. Die Mitochondrien der Lunge stellten dabei die einzige Fraktion dar, in der mit mARC2 nur eines der beiden mARC-Proteine detektiert wurde. Die höchste mittels Westernblotanalyse ermittelte mARC1-Expression konnte im Herzen und in der Leber nachgewiesen werden. Die höchste mARC2-Expression wurde in der Leber, der Niere, der Schilddrüse und dem Pankreas ermittelt. Die *N*-reduktive Aktivität korrelierte deutlich mit der Expression von mARC2. Die höchsten Umsetzungsraten wurden dementsprechend in der Leber, der Niere, der Schilddrüse und dem Pankreas gemessen. Bezüglich mARC1 korrelierte die vergleichsweise hohe mARC1-Expression im Herzen jedoch nicht mit der nur geringen *N*-reduktiven Aktivität. In vorangegangenen Studien konnte im rekonstituierten Enzymsystem gezeigt werden, dass beide rekombinanten mARC-Proteine in der Lage waren, *N*-hydroxylierte Substrate zu reduzieren (Wahl *et al.*, 2010; Krompholz *et al.*, 2012). Durch einen siRNA vermittelten mARC-Knockdown konnte die Beteiligung beider humanen mARC-Proteine an der *N*-Reduktion, auch auf zellulärer Ebene gezeigt werden (Plitzko *et al.*, 2013). Die Westernblotanalyse in Abb. 2.3.1 ließ in Bezug auf das in gleichen Proteinmengen zur Kontrolle eingesetzte rekombinante mARC1 und mARC2 vermuten, dass mARC2 in den porcinen Präparationen die vorherrschende Isoform war und stärker exprimiert wurde als mARC1. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass im Herzen trotz der höchsten mARC1-Expression die *N*-reduktive Aktivität, in Bezug auf die anderen untersuchten Mitochondrienfraktionen mit hoher mARC2-Expression, gering ausfiel. Die Mengen an

mARC1 waren wahrscheinlich katalytisch nicht hinreichend, um für deutlichere Umsetzungsraten zu sorgen.

Da das mARC-abhängige N-reduktive Enzymsystem in den Mitochondrien lokalisiert ist, war es naheliegend die Studien zur mARC-Expression und der N-reduktiven Aktivität an mitochondrialen Fraktionen durchzuführen. Um Enzymaktivitäten und -expressionen in verschiedenen Geweben zu vergleichen birgt dies jedoch auch Nachteile, denn die isolierte Proteinfraction repräsentiert nie die totale Mitochondrienpopulation des jeweiligen Gewebes (Pecinová *et al.*, 2011). Aufgrund der unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften der Gewebe, gestaltete sich deren Aufarbeitung und die Mitochondrienisolierung unterschiedlich schwierig. Die gewonnenen Fraktionen der einzelnen Gewebe waren ungleichmäßig mit mitochondrialen Protein angereichert und auch die Crosskontamination mit mikrosomalen Protein variierte stark (Krischkowski, 2010). Überdies war zu berücksichtigen, dass für mARC2 eine Colokalisation in Rattenleberperoxisomen nachgewiesen werden konnte (Wiese *et al.*, 2007; Islinger *et al.*, 2007). Es ist nicht auszuschließen, dass mARC2 auch auf porciner Ebene diese Colokalisation aufweist.

Daher wurden ergänzende Studien zur mARC-Expression an porcinen Gewebehomogenaten durchgeführt. Die Anzahl der untersuchten Gewebe wurde ausgedehnt, um einen möglichst umfassenden Überblick bezüglich der Gewebeverteilung zu erhalten.

Die ermittelten Ergebnisse stimmten weitestgehend mit denen der mitochondrialen Fraktionen überein. mARC1 wurde deutlich im Herzhomogenat und im Pankreashomogenat detektiert. Die Gewebehomogenate mit der höchsten mARC2-Expression waren die der Schilddrüse, der Leber und der Niere. Die N-reduktive Aktivität korrelierte deutlich mit der mARC2-Expression. Eine Ausnahme bildete das Schilddrüsenhomogenat, hier wurden die geringsten Umsetzungsraten, bei jedoch hoher mARC2-Expression gemessen.

Die mARC-Proteine sind im Dreikomponentensystem mit den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der NAHD-Cytochrom  $b_5$  Reduktase aktiv und alleine nicht in der Lage N-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren (Grünwald *et al.*, 2008; Krompholz *et al.*, 2012). Im Schilddrüsenhomogenat konnten das mitochondriale Cytochrom  $b_5$  und seine Reduktase mittels Westernblotanalyse nicht detektiert werden, was wiederum mit der nur im geringen Ausmaß vorhandenen N-reduktiven Aktivität korrelierte.

Da das mARC-abhängige *N*-reduktive Enzymsystem eine mitochondriale Lokalisation aufweist, wurden, um mitochondrienreiche Gewebe zu identifizieren, die Aktivität der Citratsynthase und die VDAC-Expression bestimmt. Die ermittelten Ergebnisse demonstrierten, dass die Schilddrüse im Vergleich zu den anderen Homogenaten mit hohem mARC-Anteil, vermutlich arm an Mitochondrien war (Abb. 2.3.3). Bekanntermaßen sind Muskelgewebe, wie beispielsweise der Herzmuskel, reich an Mitochondrien und auch sehr stoffwechselaktive Organe wie Leber, Gehirn und Niere besitzen vergleichsweise viele Mitochondrien (Lombard *et al.*, 2007; Che *et al.*, 2014). Diese Literaturangaben standen im Einklang mit den analysierten Markerproteinen. Im Gegensatz dazu war in den Adipozyten des weißen Fettgewebes, welches in dieser Arbeit analysiert wurde, die Mitochondriendichte gering (Cannon und Nedergaard, 2001). Dies korrelierte mit den Ergebnissen der Westernblotanalyse, denn der mitochondriale Ionenkanal VDAC wurde hier erwartungsgemäß nicht detektiert. Nicht nachvollziehbar war allerdings die hohe Citratsynthaseaktivität in diesem Gewebe. Im Gegensatz zum weißen Fettgewebe sind die Adipozyten des braunen Fettgewebes, welches hauptsächlich bei Neugeborenen und Nagetieren zu finden ist, reich an Mitochondrien. Eine wichtige Aufgabe des braunen Fettgewebes besteht darin die mitochondriale Energie in Wärme umzuwandeln und somit den Organismus vor Hypothermie zu bewahren (Klingenspor, 2003). In den Mitochondrien des weißen Fettgewebes werden nicht nur Enzyme mit anabolischer Funktion exprimiert, sondern auch solche die am Xenobiotikametabolismus beteiligt sind und eine protektive Funktion besitzen. Interessanterweise ergab eine Proteomanalyse, dass mARC1 ausschließlich im weißen und nicht im braunen Fettgewebe vorkommt (Forner *et al.*, 2009). Es ist daher naheliegend, dass mARC1 eine Funktion einnimmt, welche im Vergleich zum braunen Fettgewebe spezifisch für das weiße Fettgewebe ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Fettgewebe und auch im Gewebehomogenat der Haut, welches subkutanes Fettgewebe enthielt, mARC1 detektiert werden. Die *N*-reduktive Aktivität war allerdings vergleichsweise gering. Es ist dennoch denkbar, dass das mARC-abhängige *N*-reduktive Enzymsystem durch seine Fähigkeit *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren eine protektive Funktion im Fettgewebe besitzt. In den Arbeiten von Neve *et al.* (2012) konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung von murinen Präadipozyten zu ausgereiften Adipozyten die Expression von mARC2 und die *N*-reduktive Aktivität steigen.

In den Gewebehomogenaten konnte eine mARC-abhängige *N*-Reduktion nachgewiesen werden, welche beispielsweise im Nieren- und Nebennierenhomogenat mit den hohen Mitochondrienvorkommen korrelierte. Allerdings wiesen ebenfalls mitochondrienreiche Gewebe wie Herz und Gehirn vergleichsweise geringe *N*-reduktive Aktivität und mARC-Expression auf. Das Ausmaß der Expression der mARC-Proteine und die *N*-reduktive Aktivität korrelierten also nur teilweise mit dem Mitochondrienaufkommen in den einzelnen Homogenaten.

Bezüglich der ermittelten Ergebnisse im Schilddrüsenhomogenat kann die Vermutung angestellt werden, dass ein Großteil des mARC2 nicht in Mitochondrien lokalisiert ist. Denkbar wäre beispielsweise, dass mARC hier hauptsächlich eine peroxisomale Lokalisation aufweist, denn in Peroxisomen war die *N*-reduktive Aktivität gegenüber dem Homogenat nicht angereichert (Gabel, 2011). Das Drüsengewebe der Schilddrüse besteht aus Follikeln, welche von einem einschichtigen Epithel umgeben sind. Innerhalb der Follikel befindet sich das Kolloid, welches zur extrazellulären Speicherung von Hormonen dient. Vielleicht ist mARC innerhalb der Schilddrüse in diesem extrazellulären Raum lokalisiert. Betrachtet man das Gesamtbild der Ergebnisse, besitzt mARC in der Schilddrüse möglicherweise eine andere Funktion als die *N*-Reduktion. Die in den Schilddrüsenmitochondrien ermittelte hohe Benzamidoximreduktaseaktivität war offenbar darauf zurückzuführen, dass die gewonnene Fraktion stark mit Mitochondrien angereichert und vergleichsweise rein von Crosskontaminationen, wie mikrosomalen Proteinen war (Krischkowski, 2010).

Das mRNA-Expressionsprofil von humanen mARC1 und mARC2 demonstrierte ebenfalls, dass mARC in vielen Geweben sehr verbreitet ist (Expressionsdaten siehe Anhang Kap. 6.3). Für mARC1 wurde in humanen Geweben die deutlichste Expression in Adipozyten detektiert. Im Gegensatz dazu waren die höchsten Expressionslevel für mARC2 in Leber, Niere und Schilddrüse zu finden. Die in dieser Arbeit auf Proteinebene, anhand porciner Proben ermittelte Gewebeverteilung von mARC1 und mARC2 korrelierte, mit Ausnahme des Fettgewebes, weitestgehend mit den mRNA-Daten. Im Rahmen dieser Arbeit gehörte das Fettgewebe zwar zu den Geweben in denen mARC1 detektiert werden konnte, jedoch war die Expression, im Vergleich zu den anderen Geweben nicht so überlegen wie die mRNA-Daten. Die Aufarbeitung und Charakterisierung des Fettgewebes gestaltete sich aufgrund der strukturellen Eigenschaften äußerst schwierig. Daher wäre es sinnvoller Studien zur mARC-

Expression, im Rahmen der Zellkultur an Adipozyten durchzuführen. Grundsätzlich müssen die mRNA-Level jedoch nicht mit den jeweiligen Proteindaten korrelieren, da viele Faktoren die Regulation der Proteinexpression beeinflussen können (Vogel und Marcotte, 2012).

Clement *et al.* (2005) zeigten bereits, dass auch extrahepatische Gewebe an der Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte anhand von porcinen mitochondrialen Fraktionen und Gewebehomogenaten eine breite Gewebeverteilung von mARC1 und mARC2 demonstriert werden. Die Tatsache, dass in allen untersuchten Gewebehomogenaten *N*-reduktive Aktivität detektiert wurde, unterstreicht die Bedeutung des mARC-abhängigen *N*-reduktiven Enzymsystems für den extrahepatischen Arzneistoffmetabolismus.

Die physiologische Funktion der mARC-Proteine ist hingegen noch unbekannt, allerdings gibt es bereits zahlreiche Hinweise. Es wird postuliert, dass eine mögliche Verbindung zwischen mARC2 und *Diabetes mellitus* existiert (Malik *et al.*, 2007). In Betracht gezogen wird außerdem die Beteiligung von mARC an der Lipidsynthese. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von mARC2 eine Verminderung der Lipidsynthese zur Folge hat (Neve *et al.*, 2012). In den Arbeiten von Jakobs *et al.* (2014) konnte ebenfalls ein Bezug zwischen mARC und dem Fettstoffwechsel nachgewiesen werden. Die mARC-Proteine scheinen demnach in gewisser Hinsicht im Energiestoffwechsel involviert zu sein. Das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem spielt des Weiteren eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung mutagener Basenanaloga und weiterer, durch das P450-System im Körper gebildeter *N*-oxygenierter Metabolite (Krompholz *et al.*, 2012; Ott *et al.*, 2014).

Betrachtet man nun die Gewebeverteilung von mARC, wurden die höchsten Expressionen in stoffwechselaktiven und stoffwechselsteuernden Organen wie Leber, Niere, Schilddrüse und Pankreas ermittelt. Die Niere ist neben der Leber maßgeblich an der Gluconeogenese beteiligt. In diabetischen Tiermodellstudien konnte in renalen Zellen eine Hochregulation von mARC2 unter Glukosebehandlung beobachtet werden (Malik *et al.*, 2007). Diese beiden Organe stellen außerdem wichtige Orte der Entgiftung körpereigener und körperfremder Stoffe dar, dies korrelierte mit den detoxifizierenden Eigenschaften des mARC-Enzymsystems. Die Leber ist neben ihren Syntheseleistungen maßgeblich an der Speicherung von Glucose, Fett und Vitaminen beteiligt und ist unter anderem bedeutend für den Fett- und Energiestoffwechsel. Die Schilddrüse und der Pankreas hingegen gehören zu den



endokrinen Drüsen und steuern durch Freisetzung von Hormonen zahlreiche Stoffwechselvorgänge, unter anderem solche die in der Leber stattfinden.

Insgesamt korrelierte die Gewebeverteilung der mARC-Proteine mit den bisher postulierten möglichen physiologischen Funktionen. Die genauen Aufgaben und regulatorischen Abläufe sind bisher nicht bekannt und sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 2.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Proteinebene anhand hepatischer und extrahepatischer porciner mitochondrialer Fraktionen und porciner Gewebekomplexe unter Verwendung spezifischer Antikörper ein Expressionsprofil für mARC1 und mARC2 erstellt. Die am Modellsubstrat Benzamidoxim ermittelte N-reduktive Aktivität wurde anschließend mit der mARC1- und mARC2-Expression in den einzelnen Geweben verglichen.

In nahezu allen analysierten Gewebepreparationen konnte N-reduktive Aktivität und, mit Ausnahme der Lymphknoten, mindestens eines der beiden mARC-Proteine detektiert werden. Demnach ist es klar, dass das mARC-abhängige N-reduktive Enzymsystem für den extrahepatischen Arzneistoffmetabolismus von sehr großer Bedeutung ist.

In den mitochondrialen Fraktionen und in den Gewebekomplexen wurde die höchste mARC1-Expression im Herzen und im Pankreas ermittelt. Die höchsten Expressionslevel für mARC2 konnten in der Leber, der Niere und der Schilddrüse nachgewiesen werden. Insgesamt stand die Gewebeverteilung der mARC-Proteine mit den bisher postulierten möglichen physiologischen Funktionen im Einklang und korrelierte, mit Ausnahme des Fettgewebes, weitestgehend mit den in Datenbanken aufgeführten mRNA-Daten.

Des Weiteren konnten in den Mitochondrienfraktionen, in denen mARC2 am stärksten exprimiert wurde auch die deutlichsten Umsatzraten ermittelt werden. Die höchsten N-reduktiven Aktivitäten wurden dementsprechend in der Leber, der Niere, der Schilddrüse und dem Pankreas gemessen. In den charakterisierten Gewebekomplexen konnte diesbezüglich, mit Ausnahme der Schilddrüse, die Korrelation zwischen der mARC2-Expression und der N-reduktiven Aktivität bestätigt werden. Eine Korrelation

zwischen den Mitochondrienaufkommen und der mARC-Expression konnte hingegen nicht aufgezeigt werden.

Im Schilddrüsenhomogenat wurde die höchste mARC2-Expression bei jedoch geringer *N*-reduktiver Aktivität detektiert. Die beiden Elektronentransportproteine Cytochrom  $b_5$  und die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase, welche Bestandteile des mARC-abhängigen *N*-reduktiven Dreikomponentenenzymystems sind, konnten mittels Westernblotanalyse nicht detektiert werden. Es ist daher denkbar, dass die Schilddrüse ein Organ ist in dem mARC eine zusätzliche gewebespezifische Funktion zur *N*-Reduktion aufweist.

### **3 mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in humanen und porcinen Lebersubfraktionen und submitochondriale Lokalisation von mARC**

---

#### **3.1 Einleitung**

##### **3.1.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien**

Mitochondrien sind die Organellen der Zellatmung, welche in nahezu allen eukaryotischen Organismen weit verbreitet sind. Bezüglich der Endosymbiontenhypothese stammen Mitochondrien von  $\alpha$ -Proteobakterien ab, welche mit frühen eukaryotischen Zellen eine Endosymbiose eingegangen sind (Dolezal *et al.*, 2006). Sie besitzen ihre eigene DNA und RNA, sowie einen kompletten Translations- und Transkriptionsapparat, was ihnen die Synthese eigener Proteine ermöglicht (Alberts *et al.*, 2005).

Mitochondrien sind von einer äußeren und einer inneren Membran umgeben und werden daher auch als Doppelmembranorganelle bezeichnet. Des Weiteren besitzen sie zwei wässrige Kompartimente. Zum einen den zwischen der inneren und der äußeren Membran befindlichen Intermembranraum, und zum anderen die von der inneren Membran umgebene Matrix. In der Matrix sind zweidrittel der mitochondrialen Proteine lokalisiert. Neben den löslichen Enzymen des Citratcyclus und den Enzymen der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren, enthält sie die mitochondriale ringförmige DNA.

Der Intermembranraum ist bei der Koordination von mitochondrialen Aktivitäten mit anderen zellulären Prozessen von Bedeutung. Dies umfasst den Austausch von Fetten, Proteinen oder Metallionen zwischen der Matrix und dem Cytosol. Des Weiteren werden aus dem Intermembranraum proapoptotische Faktoren entlassen, Proteine abgebaut oder reaktive Sauerstoffspezies, welche durch die Atmungskette gebildet wurden, detoxifiziert (Herrmann und Riemer, 2010).

Bei der äußeren mitochondrialen Membran handelt es sich um eine Lipiddoppelschicht, deren Haupttransportmoleküle die Porine sind. Die Porine ermöglichen das freie Passieren von Molekülen mit einer Masse bis zu 5 - 6 kDa, einschließlich kleiner Proteine (Alberts *et al.*,

2005; Herrmann und Riemer, 2010). Ein anderer Teil der Enzyme der äußeren Membran ist an der Synthese von mitochondrialen Lipiden beteiligt oder bereitet Lipidsubstrate für den Stoffwechsel in der Matrix vor (Alberts *et al.*, 2005). Die innere mitochondriale Membran ist im Gegensatz zur äußeren Membran für Ionen und die meisten kleinen Moleküle undurchlässig und in zahlreiche Cristae gefaltet, wobei zwischen der inneren und äußeren Membran Kontaktstellen existieren (Alberts *et al.*, 2005; Herrmann und Riemer, 2010; Bohnert *et al.*, 2012). In der inneren Membran sind neben den mitochondrialen Cytochrom P450 Enzymen, Ionenkanälen und Carrierproteinen auch die Komplexe der Atmungskette lokalisiert (Da Cruz *et al.*, 2003; Hanukoglu, 2006). Sie nutzen die Energie, welche aus der Oxidation verschiedener Nährstoffmoleküle stammt, um Protonen durch die innere Membran zu pumpen und so ein Membranpotential zu generieren. Dieser Protonengradient treibt beispielsweise die ATP-Synthase an, welche die Bildung des energiereichen ATP aus ADP katalysiert (Schmidt *et al.*, 2010). Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel und werden daher auch als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet.

### 3.1.2 Proteintransport in Mitochondrien

Mitochondrien enthalten nahezu 1000 verschiedene Proteine, von denen nur eine geringe Anzahl vom mitochondrialen Genom codiert und in Mitochondrien synthetisiert wird. 99 % der mitochondrialen Proteine werden vom Zellkern codiert und nach ihrer Translation an cytosolischen Ribosomen posttranslatorisch in die Mitochondrien importiert und eines der mitochondrialen Subkompartimente zugeordnet (Gakh *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2010).

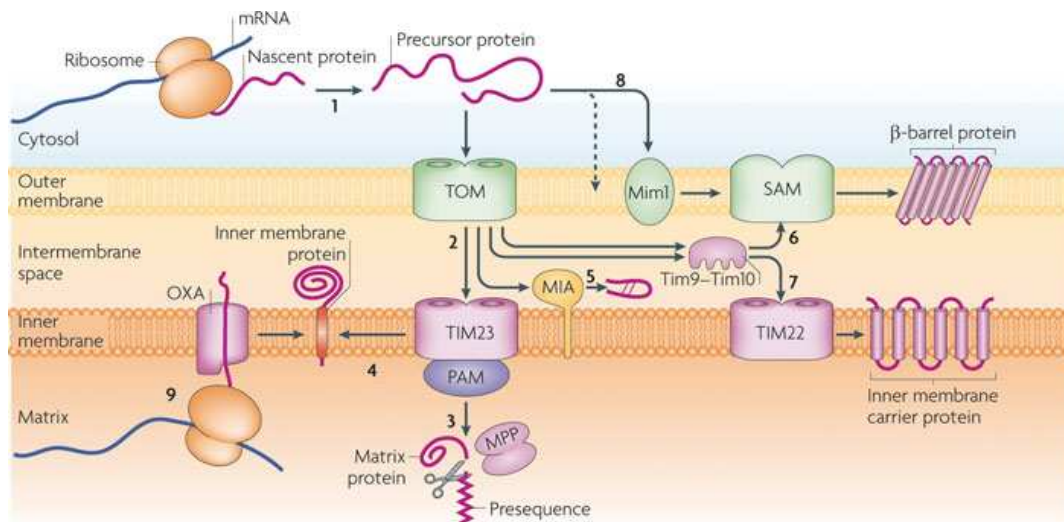
Für den Transport zu den Mitochondrien und für die Zuordnung zu einem mitochondrialen Subkompartiment sind bestimmte mitochondriale Targeting-Signale in Vorstufenproteinen von Bedeutung, welche in zwei Arten unterteilt werden. Zum einen gibt es *N*-terminale Signale (Präsequenzen) und zum anderen die Gruppe der internen Targeting-Signale. Die Präsequenzen bestehen aus 20 - 60 Aminosäuren, welche eine amphiphile  $\alpha$ -Helix bilden. Sie besitzen meist ein positiv geladenes und ein hydrophobes Segment. Die Präsequenzen werden nach Transport der Proteine in die Mitochondrien von Peptidasen abgespalten. Ein Großteil der Proteine mit diesen Präsequenzen sind für die mitochondriale Matrix, aber auch

für den Intermembranraum und die innere Membran bestimmt (Neupert, 1997; Gakh *et al.*, 2002).

Proteine der äußeren Membran, Transporterproteine der inneren Membran, wie auch Proteine des Intermembranraums werden meist ohne abspaltbare Präsequenzen synthetisiert und tragen stattdessen *N*-terminale, *C*-terminale oder interne Signalsequenzen (Neupert, 1997; Gakh *et al.*, 2002). Der Transport von Proteinen mit internen Signalsequenzen durch das Cytosol wird aufgrund der Reichhaltigkeit an hydrophoben Segmenten durch Chaperone unterstützt. Hier spielen insbesondere die Hitzeschockproteine der Klasse Hsp70 und Hsp90, welche an die hydrophoben Bereiche binden und somit das Präprotein vor Aggregation schützen, eine wichtige Rolle (Rehling und Meisinger, 2005). Des Weiteren schützen Chaperone die Präproteine, die im Vergleich zu ihren reifen Proteinen eine geringere Faltung aufweisen, vor Abbau durch zelluläre Proteasen.

Der Import von Präproteinen wird mittels Interaktion der Targeting-Signale mit verschiedenen Rezeptoren der äußeren Membran, welche in einem Multienzymkomplex assoziiert sind und als Translokase der äußeren Membran (TOM-Komplex) bezeichnet werden, initiiert (Abb. 3.1.1). Der TOM-Komplex besitzt zwei Oberflächenrezeptoren TOM20 und TOM70. TOM20 identifiziert die klassischen *N*-terminalen Targeting-Sequenzen, während TOM70 die internen Targeting-Signale erkennt und an Chaperone bindet (Young *et al.*, 2003). Nachdem die Präproteine erkannt worden sind erfolgt die Translokation über die äußere Membran durch eine als GIP (*general import pore*) bezeichnete Pore, welche das Zentrum des TOM-Komplexes bildet und unter anderem aus TOM22 und TOM40 besteht (Pfanner und Geissler, 2001). Die importierten Präproteine werden nun zur Translokase der inneren Membran (TIM) geführt. Alle Proteine mit Präsequenz, zu denen die zahlreichen Matrixproteine gehören, werden zum TIM23-Komplex geleitet, welcher einen Kanal durch die innere Membran formt. Um die Präsequenzproteine in die Matrix zu transportieren, wird das Membranpotential der inneren Membran benötigt (Pfanner und Geissler, 2001). In der Matrix erfolgt die Abspaltung der Präsequenzen durch mitochondriale Peptidasen, außerdem wird das Protein in die richtige Faltung und damit in seine aktive Form gebracht. Die hydrophoben Proteine der inneren Membran, welche interne Präsequenzen tragen, werden über TIM22 in die innere Membran eingebaut (Pfanner und Geissler, 2001).

Die meisten Proteine des Intermembranraums tragen interne Signalsequenzen und besitzen charakteristische Cystein-Muster. Die Vorstufenproteine werden nach ihrem Transport in den Intermembranraum über den TOM-Komplex, durch den MIA-Komplex (*mitochondrial intermembrane space assembly*) an ihren Cysteinresten oxidiert, um anschließend die richtige Faltung zu erhalten (Stojanovski *et al.*, 2008).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

### Abb. 3.1.1 Proteintransport in Mitochondrien und Zuordnung in die mitochondrialen Subkompartimente (Schmidt *et al.*, 2010)

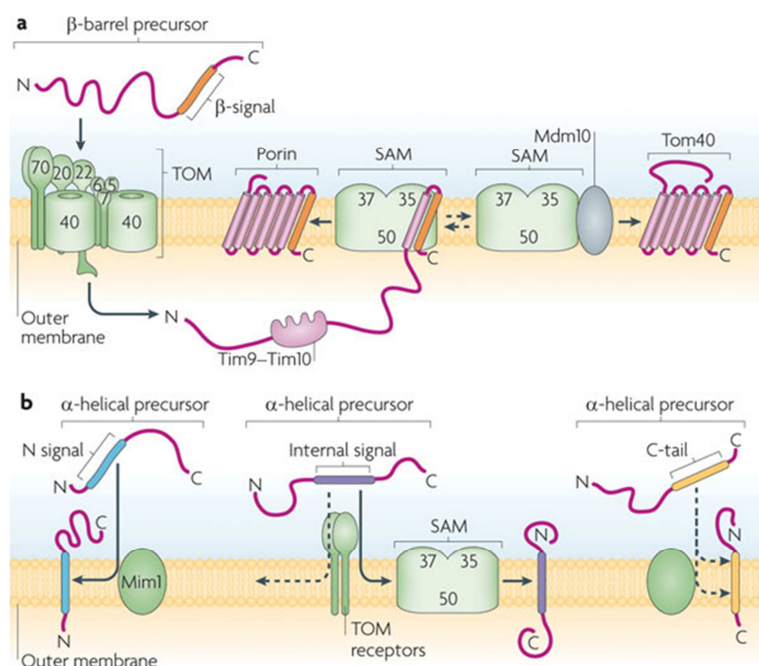
*GIP* = general import pore, *MIA* = mitochondrial intermembrane space assembly, *Mim1* = mitochondrial import 1, *MPP* = mitochondrial processing peptidase, *OXA* = oxidase assembly machinery, *PAM* = presequence translocase-associated motor, *SAM* = sorting and assembly machinery *TIM* = translocase of the inner membrane, *TOM* = translocase of the outer membrane

Die Proteine der äußeren Membran werden als nicht spaltbare Vorstufenproteine mit internen Signalsequenzen synthetisiert. In der äußeren Mitochondrienmembran sind zwei Arten von membranständigen Proteinen zu finden. Dazu gehören zum einen Proteine, die über ein oder mehrere transmembrane  $\alpha$ -helikale Strukturen in der Membran verankert sind, und zum anderen porenformende  $\beta$ -barrel Proteine, die aus multiplen transmembranen  $\beta$ -barrel Strängen bestehen. Bisher wurden  $\beta$ -barrel Membranproteine nur in äußeren Membranen von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien gefunden. Alle anderen Membranen, einschließlich der inneren Mitochondrienmembran, besitzen  $\alpha$ -helikale Membranproteine (Schmidt *et al.*, 2010). Die  $\alpha$ -helikalen Strukturen können sich dabei in der

Mitte des Proteins, am *N*-terminalen (*signal-anchored proteins*) oder *C*-terminalen Ende (*tail-anchored proteins*) befinden.

Proteine der äußeren Membran, welche *N*-terminale  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen enthalten werden auch als Signal-verankerte Proteine bezeichnet, da ihr hydrophobes Segment sowohl eine Membrananker-, als auch eine Targeting-Funktion besitzt. Diese Proteine folgen nicht dem klassischen Weg über den Importkanal TOM, sondern können über MIM1 (*mitochondrial import 1*) in die äußere Mitochondrienmembran eingebaut werden (Schmidt *et al.*, 2010). Ihr Einbau ist bisher jedoch nur teilweise verstanden. Die anderen Precursor können den TOM-Rezeptor, den SAM-Komplex oder andere unbekannte Mechanismen nutzen (Abb. 3.1.2).

Die Vorstufenproteine der  $\beta$ -barrel Membranproteine werden über den TOM-Komplex in den Intermembranraum transportiert und über den TIM9-TIM10-Komplex, welcher als Chaparon fungiert, zum SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) der äußeren Membran geleitet. Der Einbau der Proteine in die äußere Mitochondrienmembran erfolgt von der Seite des Intermembranraums durch den SAM-Komplex (Schmidt *et al.*, 2010).



**Abb. 3.1.2 Proteinzufuhr in die äußere mitochondriale Membran (Schmidt *et al.*, 2010)**

*SAM* = *sorting and assembly machinery* *TIM* = *translocase of the inner membrane*,  
*TOM* = *translocase of the outer membrane*

mARC weist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein *N*-terminales mitochondriales Targeting-Signal auf. Vorhergesagt wird außerdem eine *β-barrel* Domäne und eine C-terminale MOSC-Domäne (Anantharaman und Aravind, 2002).

Kürzlich wurde gezeigt, dass es sich bei mARC1 um ein Signal-verankertes Protein der äußeren Mitochondrienmembran handelt (Klein *et al.*, 2012). Die mitochondriale Lokalisation von mARC1 wird wahrscheinlich durch die ersten 40 *N*-terminalen Aminosäuren gesteuert. Dabei ist die Transmembrandomäne (21 - 40) sowohl für die mitochondriale Zuordnung, als auch für die Verankerung in der Membran verantwortlich. Die ersten Aminosäuren (1 - 20) formen ein schwaches mitochondriales Targeting-Signal, welches möglicherweise lediglich eine unterstützende Wirkung besitzt. Im katalytischen Teil von mARC1 (41 - 337) (Wahl *et al.*, 2010) sind vermutlich keine weiteren mitochondrialen Targeting-Signale enthalten. In der Arbeit von Klein (2012) wird postuliert, dass das mitochondriale Targeting-Signal von mARC1 mit TOM20 und TOM22 interagiert und somit für den ersten Kontakt zuständig ist. Der Einbau in die Membran erfolgt unabhängig vom Membranpotential und wird durch die Transmembrandomäne hervorgerufen, wobei eine externe Zufuhr von ATP erforderlich ist. Der Molybdäncofaktor wird vermutlich nach dem Einbau in die Membran in das Protein integriert. Im Folgenden bildet mARC1 mit Cytochrom *b*<sub>5</sub> und der Reduktase das *N*-reduktive Enzymsystem und ist vermutlich auch Bestandteil von oligomeren Proteinkomplexen, welche größer als 350 kDa sind (Klein *et al.*, 2012).

### 3.1.3 Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2

In der Vergangenheit haben sich verschiedene Arbeitskreise mit der submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 beschäftigt. Havemeyer konnte 2006 mit mARC2, die bis dahin unbekannte dritte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems aus der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien reinigen und mittels Elektrospray MS/MS als viertes in Säugetieren vorkommende Molybdoenzym identifizieren. Alle bisher analysierten Säugetiergenome codieren für zwei mARC-Enzyme (mARC1 und mARC2). Die Lokalisation von mARC2 in der äußeren mitochondrialen Membran konnte in fortführenden Studien anhand Westernblotanalyse bestätigt werden (Kotthaus *et al.*, 2011).

In vorangegangenen Arbeiten von Da Cruz *et al.* (2003) wurde eine Proteomanalyse der inneren mitochondrialen Membran, welche aus Mauslebermitochondrien gereinigt wurde,



durchgeführt. Nach Solubilisierung und Digestion der Proteine der inneren Membran erfolgte eine Kationenaustauschchromatographie. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mittels Elektrospray LC-MS/MS analysiert. Dabei konnten 182 Proteine identifiziert werden, von denen 20 bis dahin uncharakterisiert waren. Unter diesen unbekannt Proteinen befanden sich auch Q9CW42 (mARC1) und Q922Q1 (mARC2). Allerdings wiesen die analysierten inneren Membranfraktionen Crosskontaminationen, unter anderem mit Proteinen der äußeren Membran, auf.

Die von Neve *et al.* (2012) durchgeführten Lokalisationsstudien zu mARC2 erfolgten anhand von Rattenleberpräparationen. Dazu wurden die gereinigte innere und äußere mitochondriale Membranfraktion mittels Westernblotanalyse charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass mARC2 der Ratte nur in der äußeren und nicht in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert war. Die Amidoxim-Reduktaseaktivität war ebenfalls nur in der äußeren Mitochondrienmembran angereichert.

Klein *et al.* (2012) führten Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 an humanen Zelllinien durch. Aus HEP-G2 Zellen wurden dazu eine lösliche Mitochondrienfraktion und eine Fraktion, welche die mitochondrialen Membranen enthielt, gewonnen. Mittels Westernblotanalyse konnte gezeigt werden, dass mARC1 ein membranständiges Protein ist und nicht in der löslichen Mitochondrienfraktion lokalisiert war. Um zu differenzieren ob mARC1 ein Protein der inneren oder äußeren Mitochondrienmembran ist, wurden Mitochondrien aus HeLa-Zellen isoliert. Es folgte eine Proteinasebehandlung von intakten Mitochondrien und welchen, deren äußere Membran durch Einwirkung von hypotonen Medium abgelöst wurde. Mittels Westernblotanalyse konnte gezeigt werden, dass humanes mARC1 ausschließlich in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert war. Außerdem konnte durch ergänzende Experimente mit der Proteinkinase Trypsin gezeigt werden, dass die der Transmembrandomäne vorgelagerten 20 Aminosäuren am N-terminalen Ende von mARC1 zum mitochondrialen Intermembranraum zeigen und die C-terminale Domäne zum Cytosol orientiert war. In der äußeren mitochondrialen Membran ist mARC1 vermutlich Bestandteil von oligomeren Proteinkomplexen, welche größer als 350 kDa sind (Klein *et al.*, 2012).

Obwohl zwei Isoformen von mARC existieren, waren die durchgeführten Studien zur Lokalisation von mARC1 und mARC2 in den jeweiligen Spezies meist nur auf eines der beiden mARC-Proteine bezogen. Es ist denkbar, dass speziesabhängig immer eine Isoform dominant

vertreten ist, welche folglich hauptverantwortlich für den *N*-reduktiven Metabolismus zu sein scheint (Plitzko *et al.*, 2013). In der Maus, der Ratte und den porcinen Präparationen scheint mARC2 die vorherrschende Isoform zu sein. Während es auf humaner Ebene den Anschein macht, dass mARC1 die dominante Form darstellt (mRNA-Expressionsdaten siehe Anhang Kap. 6.3).

Für mARC2 konnte des Weiteren eine duale Lokalisation in der Membran von Rattenleberperoxisomen gezeigt werden (Wiese *et al.*, 2007; Islinger *et al.*, 2007; Gabel, 2011).

### 3.1.4 Thema und Zielsetzung

mARC wurde 2006 aus der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien gereinigt und neben den Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase als dritte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit sollten Mikrosomen, Cytosol und Mitochondrien humaner und porciner Leber hinsichtlich der mARC-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität untersucht und untereinander verglichen werden. Im Folgenden sollte die äußere Membran porciner und humaner Lebermitochondrien isoliert und hinsichtlich der Lokalisation von mARC1 und mARC2 charakterisiert werden. Gezeigt werden sollte außerdem, ob die *N*-reduktive Aktivität speziesunabhängig in der äußeren mitochondrialen Membran angereichert war. Neben dem Modellsubstrat Benzamidoxim sollte getestet werden, ob in humanen Leberpräparationen die Umsetzung von Sulfamethoxazolhydroxylamin zu Sulfamethoxazol katalysiert wird.

Hinsichtlich der submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 gibt es zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Havemeyer konnte anhand porciner Präparationen aufzeigen, dass mARC2 ein Enzym der äußeren mitochondrialen Membran war. Da Cruz *et al.* (2003) detektierten beide mARC-Proteine in der inneren Membran von Mauslebermitochondrien. Im Gegensatz dazu demonstrierten Neve *et al.* (2012), unter Verwendung von Rattenlebermitochondrien, dass mARC2 in der äußeren mitochondrialen Membran, aber nicht in der inneren Membran lokalisiert war. Klein *et al.* (2012) führten Lokalisationsstudien

zu mARC1 an Mitochondrien humaner Zelllinien durch. Betrachtet wurden die löslichen mitochondrialen Subkompartimente und die Mitochondrienmembranen. mARC1 wurde hier ausschließlich in der äußeren mitochondrialen Membran detektiert. In den genannten Lokalisationsstudien, welche an unterschiedlichen Spezies durchgeführt wurden, wurde weitestgehend lediglich eine mARC-Isoform betrachtet. Möglicherweise war speziesabhängig immer nur eines der mARC-Proteine dominant vertreten.

In dieser Arbeit sollte die submitochondriale Lokalisation von mARC1 und mARC2 innerhalb einer Spezies untersucht werden. Dazu sollten die mitochondriale Matrix, der mitochondriale Intermembranraum und die innere und äußere Mitochondrienmembran aus porcinen Lebermitochondrien isoliert und mittels geeigneter Markerenzyme auf Identität und Reinheit geprüft werden. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob die Benzamidoximreduktaseaktivität in den isolierten Subfraktionen mit der Expression von mARC1 und mARC2 korrelierte oder eines der beiden mARC-Proteine unabhängig von den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der Cytochrom  $b_5$  Reduktase in einen weiteren mitochondrialen Subkompartiment lokalisiert war.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Materialien und Geräte**

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Kap. 7 aufgelistet.

Das Benzamidoxim wurde aus Hydroxylamin und Benzonitril synthetisiert und in üblicherweise charakterisiert (Krüger, 1885).

### **3.2.2 Proteinquellen**

#### **3.2.2.1 Gewinnung der hepatischen Subfraktionen**

Die Isolierung von Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol erfolgte nach einer im Arbeitskreis gut etablierten Methode mittels Differential- und Dichtegradientenzentrifugation (Clement *et al.*, 2005; Havemeyer *et al.*, 2006; Krompholz *et al.*, 2012).

Die porcine Leber stammte aus einer ortsnahen Großschlachtereier (Großschlachtereier Thomsen, Kellinghusen). Das humane Lebergewebe stammte aus den Arbeiten von Wundt

(2009). Das Vorgehen wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt.

### **3.2.2.2 Gewinnung der submitochondrialen Fraktionen**

#### **3.2.2.2.1 Isolierung des mitochondrialen Membranpellets und der löslichen mitochondrialen Fraktion**

Die wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben gewonnenen Lebermitochondrien wurden mit 0,1 M Natriumcarbonatlösung (pH 11,5) auf eine Konzentration von 0,3 mg/ml verdünnt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein einstündiger Zentrifugationsschritt bei 100.000 g. Aus dem resultierenden Überstand wurden mittels 10 %iger (m/v) TCA-Lösung die Proteine der löslichen Fraktion gefällt und durch Zentrifugation bei 9.000 g pelletiert. Ebenso wie das 100.000 g Pellet, welches die innere und äußere mitochondriale Membran enthielt, wurde dies in Standardpuffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) resuspendiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

#### **3.2.2.2.2 Isolierung der äußeren mitochondrialen Membranvesikel (OMV)**

Die Gewinnung der äußeren mitochondrialen Membranvesikel aus Lebermitochondrien erfolgte mittels Swell-Disruption-Methode und anschließender Dichtegradientenzentrifugation gemäß Kroon *et al.* (1999) und Havemeyer *et al.* (2006).

#### **3.2.2.2.3 Isolierung der inneren mitochondrialen Membran (IMM) und des mitochondrialen Intermembranraums (IMS)**

Die Isolierung der inneren Membranfraktion und des Intermembranraums erfolgte in Anlehnung an die Methode von Schnaitman und Greenawalt (1968). Die Mitochondrien wurden zunächst mit einer 2 %igen (m/v) Digitoninlösung eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Pro Milligramm Protein wurden 0,12 mg Digitonin eingesetzt. Anschließend wurde die Mitochondriensuspension mit drei Teilen Standardpuffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) verdünnt und 20 Minuten bei 9.500 g zentrifugiert. Das erhaltene Mitoplastenpellet, welches die innere Membran und die mitochondriale Matrix beinhaltet, wurde im Standardpuffer resuspendiert und erneut für 20 Minuten bei 9.500 g

zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das gewonnene Pellet wurde als innere mitochondriale Membranfraktion charakterisiert.

Der 9.500 g Überstand wurde 70 Minuten bei 144.000 g zentrifugiert, um die äußere Membranfraktion abzutrennen. Der daraus resultierende Überstand, welcher den mitochondrialen Intermembranraum enthielt, wurde unter Verwendung von Zentrifugalfiltern (Centricon® Plus-70, Millipore, Darmstadt) einkonzentriert.

#### **3.2.2.2.4 Isolierung der mitochondrialen Matrix**

Die Isolierung der mitochondrialen Matrix erfolgte in Anlehnung an die von Da Cruz *et al.* (2003) beschriebene Methode. Das, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben, gewonnene Lebermitochondrienpellet wurde mit *Aqua bidest* auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und 20 Minuten unter Rühren auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend unter Verwendung eines Potter-Elvehjem-Homogenisators homogenisiert. Im Folgenden, zehninütigen Zentrifugationsschritt bei 12.000 g wurde der Mitoplast sedimentiert. Die Mitoplastenfraktion wurde mit 0,1 M Natriumcarbonatlösung (pH 11,5) auf eine Konzentration von 0,5 mg Protein/ml verdünnt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein einstündiger Zentrifugationsschritt bei 100.000 g. Aus dem resultierenden Überstand wurden mittels 10%iger (m/v) TCA-Lösung die Proteine der mitochondrialen Matrix gefällt und durch Zentrifugation bei 9.000 g pelletiert. Das 9.000 g Pellet wurde in Standardpuffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) resuspendiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

#### **3.2.2.3 Rekombinante Enzymquellen**

In dieser Arbeit wurden die folgenden rekombinanten Proteine verwendet: humanes mARC1 (NP\_073583), humanes mARC2 (NP\_060386), humanes mitochondriales Cytochrom b<sub>5</sub> (NP\_085056) und die humane NADH-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase (NP\_000389). Die Herkunft dieser Proteine ist in Kap. 2.2.2.3 beschrieben.

### 3.2.3 Charakterisierung der hepatischen Enzymquellen

#### 3.2.3.1 Proteingehaltsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteingehälter wurde die BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985), unter Verwendung des BCA Assay Kits von Pierce (Rockford, USA), eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben.

#### 3.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach der im Kap. 2.2.3.2 beschriebenen diskontinuierlichen Methode durchgeführt (Laemmli, 1970).

#### 3.2.3.3 Coomassiefärbung

Zur Bestimmung der Reinheit der Proteinproben wurden diese, nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung auf dem SDS-Gel, mit Coomassie visualisiert (Bradford, 1976). Dies erfolgte ebenfalls für die Proteinproben, welche einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen wurden.

#### 3.2.3.4 Westernblot

Die Westernblotanalyse wurde nach der in Kap. 2.2.3.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die eingesetzten Primärantikörper und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper sind in Kap. 7.1 aufgeführt.

#### 3.2.3.5 Quantitative Westernblotanalyse

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und die anschließende Westernblotanalyse erfolgten wie in Kap. 3.2.3.2 und Kap. 3.2.3.4 beschrieben. Die eingesetzten Primärantikörper und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper sind in Kap. 7.1 aufgeführt.

Die Bestimmung der Intensität der Chemielumineszenzsignale erfolgte mit Hilfe des Lumi-Imager F1™. Zur Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression in porcinen und humanen Gewebehomogenaten wurde eine Kalibriergerade mit rekombinanten mARC1 und

mARC2 erstellt, welche sich auf derselben Membran wie die zu analysierenden Proben befanden. Die Kalibriergerade beinhaltete 3 - 5 Messpunkte unterschiedlicher Konzentrationen. Die linearen Regressionskoeffizienten lagen zwischen 0,8953 und 0,9528. Bei den zur Quantifizierung der mARC-Expression herangezogenen Messwerten handelte es sich um Einfachmesswerte.

### **3.2.3.6 Blocking-Experiment**

Um zu ermitteln ob bestimmte, in der Westernblotanalyse detektierte Banden spezifisch vom verwendeten Primärantikörper erkannt wurden, erfolgte die Durchführung eines Blocking-Experimentes. Die spezifische Bindungsstelle des Antikörpers wurde dazu mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid geblockt, sodass der Antikörper nicht mehr in der Lage war spezifische Banden zu erkennen.

Die Primärantikörperlösung in der gewünschten Verdünnung wurde in zwei gleiche Teile geteilt, wobei der einen Hälfte das Peptid im 100-fachen Überschuss und der Kontrolllösung eine äquivalente Menge an Puffer zugesetzt wurde. Beide Lösungen wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde wie in Kap. 3.2.3.4 beschrieben verfahren.

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

Die N-reduktive Aktivität in den porcinen Gewebekomogenaten wurde anhand der Reduktion des Modellsstrats Benzamidoxim zum korrespondierenden Amidin bestimmt.

#### **3.2.3.7.1 *In vitro* Inkubationsansatz für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin**

Die Durchführung der Inkubation und die Zusammensetzung des *in vitro* Inkubationsansatzes erfolgten wie in Kap. 2.2.3.4.1 beschrieben. Von den porcinen und humanen Präparationen wurden pro Inkubationsansatz 0,05 mg Protein eingesetzt. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik im Überstand vermessen (Kap. 3.2.3.9).

#### **3.2.3.7.2 Substratabhängigkeit**

Eine Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch die humanen Präparationen wurde nach der in Kap. 3.2.3.7.1 beschriebenen Methode

durchgeführt. Eingesetzt wurden Benzamidoximkonzentrationen von 0,05 - 3 mM. Die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter ( $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte) erfolgte über eine nichtlineare Regressionsanalytik (SigmaPlot 11.0) nach der Funktion  $V = (V_{\max} \times C_{\text{BAO}}) / (K_m + C_{\text{BAO}})$ .

### 3.2.3.8 Untersuchung des Einflusses von Digitonin auf die N-reduktive Aktivität

Bei der Gewinnung des mitochondrialen Intermembranraums wurde den Schweinelebermitochondrien Digitonin zugesetzt, um die äußere mitochondriale Membran vom Mitoplasten zu trennen (Kap. 3.2.2.2.3). Um zu prüfen, ob die eingesetzte Digitoninkonzentration einen Einfluss auf die N-reduktive Aktivität hat, wurde der Mitochondriensuspension Digitonin zugesetzt, sodass eine 0,38 %ige (m/v) Digitoninlösung entstand. Dies entsprach der bei der Subfraktionierung eingesetzten Konzentration. Die mit Digitonin versetzten Mitochondrien und ein Kontrollansatz wurden eine Stunde im Kühlkeller unter leichten Schüttelbewegungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der N-reduktiven Aktivität wie in Kap. 3.2.3.7 beschrieben.

### 3.2.3.9 HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamidin

Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins erfolgte nach der im Arbeitskreis etablierten Methode von Clement *et al.* (2005) mit dem in Kap. 2.2.3.5 beschriebenen System.

### 3.2.3.10 *In vitro* Inkubationsansatz für die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin zu Sulfamethoxazol

Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 150 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 0,05 mg humanes Protein, 5 mM Sulfamethoxazolhydroxylamin, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM Ascorbinsäure (pH 6). Das Ansatzvolumen enthielt 6,6 % (m/v) DMSO. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrats gestartet. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Methanol gestoppt. Die Ansätze wurden 5 Minuten geschüttelt, anschließend wurde das Protein 5 Minuten bei 11.000 g



abzentrifugiert. Gebildetes Sulfamethoxazol wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik (Kap. 3.2.3.11) im Überstand vermessen. Jeder Inkubationsansatz wurde doppelt angesetzt und jeweils zweifach vermessen. Zusätzlich wurden zur Kontrolle zwei Inkubationsansätze ohne Protein zur Überprüfung nicht-enzymatisch gebildeten Sulfamethoxazols, sowie 5 µM Sulfamethoxazolösung zur Überprüfung der Kalibrierfunktion vermessen.

### 3.2.3.11 HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Sulfamethoxazol

Die Quantifizierung des gebildeten Sulfamethoxazols erfolgte nach der von Ott (2013) beschriebenen Methode. Folgendes System wurde verwendet:

HPLC Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump	
Detektor	Waters 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector	
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler	
Integrator	Waters Breeze Vers. 3.30	
Stationäre Phase	Waters Symmetry <sup>®</sup> C18, 5 µm, 250 × 4,6 mm, Vorsäule Phenomenex Security Guard Cartridge System C18, 4 × 3,0 mm	
Mobile Phase	Acetonitril / <i>Aqua bidest</i> / Eisessig / Triethylamin (30 : 68,5 : 1 : 0,5 v / v / v / v)	
Flussrate	0,6 ml / min	
Laufzeit	20 min	
Detektion	UV, 254 nm	
Injektionsvolumen	10 µl	
Retentionszeit	Sulfamethoxazolhydroxylamin	9,9 ± 0,3 min
	Sulfamethoxazol	12,3 ± 0,3 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde vor Gebrauch durch einen Satorius<sup>®</sup> Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Die gesamte mobile Phase wurde vor Verwendung 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung wurde Sulfamethoxazol in verschiedenen Konzentrationen (0,05 - 500 µM) in der mobilen Phase gelöst und mit der beschriebenen HPLC-Methode analysiert. Es wurden

Doppelansätze pipettiert, welche zweimal vermessen wurden. Die Richtigkeit im gewählten Konzentrationsbereich von 0,05 - 500  $\mu\text{M}$  Sulfamethoxazol betrug  $103 \pm 9 \%$ . Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,9  $\mu\text{M}$  Sulfamethoxazol, wobei die Richtigkeit 88 % betrug.

### 3.2.3.12 Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Succinat Cytochrom c Reduktase-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch nach der von Sottocasa *et al.* (1967) beschriebenen Methode. Der Enzymassay mit einem Gesamtvolumen von 1 ml setzte sich folgendermaßen zusammen: porcines Protein, 0,3 mM Kaliumcyanid, 0,1 mM Cytochrom c, 3 mM Succinat. Die Reagenzien wurden stets frisch in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) gelöst. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe der Succinatlösung wurde die Absorptionszunahme bei 550 nm über eine Messzeit von einer Minute bei Raumtemperatur verfolgt.

Pro Messung wurden folgende Proteinmengen der porcinen Präparationen eingesetzt: 70  $\mu\text{g}$  Homogenat, 10 - 20  $\mu\text{g}$  Mitochondrien, 20 - 60  $\mu\text{g}$  äußere mitochondriale Membran, 5  $\mu\text{g}$  innere mitochondriale Membran, 100 - 300  $\mu\text{g}$  mitochondrialer Intermembranraum.

Das Messprinzip beruhte auf der enzymatischen Reduktion des zugefügten Cytochrom c. Die spezifische Enzymaktivität wurde unter Verwendung des molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  für das reduzierte Cytochrom c berechnet (Kamin *et al.*, 1965).

### 3.2.3.13 Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch nach der von Sottocasa *et al.* (1967) beschriebenen Methode. Der Enzymassay mit einem Gesamtvolumen von 1 ml setzte sich folgendermaßen zusammen: porcines Protein, 0,3 mM Kaliumcyanid, 0,1 mM Cytochrom c, 1,5  $\mu\text{M}$  Rotenon, 0,1 mM NADH. Vom Rotenon wurde zunächst eine 75  $\mu\text{M}$  Lösung in DMSO hergestellt, welche anschließend mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) 1:50 verdünnt wurde. Alle Reagenzien wurden stets frisch in Kaliumphosphatpuffer gelöst. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe des NADH wurde die Absorptionszunahme bei 550 nm über eine Messzeit von einer Minute bei Raumtemperatur verfolgt.

Pro Messung wurden folgende Proteinmengen der porcinen Präparationen eingesetzt: 5 - 20  $\mu\text{g}$  Homogenat, 5 - 30  $\mu\text{g}$  Mitochondrien, 2 - 5  $\mu\text{g}$  äußere mitochondriale Membran,

10 - 25  $\mu\text{g}$  innere mitochondriale Membran, 100 - 200  $\mu\text{g}$  mitochondrialer Intermembranraum.

Das Messprinzip beruhte auf der enzymatischen Reduktion des zugefügten Cytochrom c. Die spezifische Enzymaktivität wurde unter Verwendung des molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  für das reduzierte Cytochrom c berechnet (Kamin *et al.*, 1965).

#### **3.2.3.14 Citratsynthase-Aktivitätsbestimmung**

Die Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch in Anlehnung an die von Srere (1969) beschriebene Methode. Der Enzymassay wurde wie in Kap. 2.2.3.7 angegeben durchgeführt.

Pro Messung wurden folgende Proteinmengen der porcinen Präparationen eingesetzt: 330  $\mu\text{g}$  Homogenat, 40  $\mu\text{g}$  Mitochondrien, 60  $\mu\text{g}$  äußere mitochondriale Membran, 60  $\mu\text{g}$  innere mitochondriale Membran, 75  $\mu\text{g}$  mitochondrialer Intermembranraum.

#### **3.2.3.15 Sulfitoxidase-Aktivitätsbestimmung**

Die Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch nach der von Cohen *et al.* (1972) beschriebenen Methode. Der Enzymassay mit einem Gesamtvolumen von 1 ml setzte sich folgendermaßen zusammen: porcines Protein, 0,04 mM Cytochrom c, 0,5 mM Kaliumcyanid, 0,1 mM EDTA. Die Reagenzien wurden stets frisch in Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,25 M Saccharose, pH 8,5) gelöst. Nach Starten der Reaktion durch Zugabe von 16  $\mu\text{l}$  einer 25 mM Natriumsulfitlösung wurde die Absorptionzunahme bei 550 nm über eine Messzeit von einer Minute bei Raumtemperatur verfolgt.

Pro Messung wurden folgende Proteinmengen der porcinen Präparationen eingesetzt: 165  $\mu\text{g}$  Homogenat, 40 - 195  $\mu\text{g}$  Mitochondrien, 86  $\mu\text{g}$  äußere mitochondriale Membran, 30 - 75  $\mu\text{g}$  innere mitochondriale Membran, 10 - 50  $\mu\text{g}$  mitochondrialer Intermembranraum.

Die Sulfitoxidase katalysiert die Oxidation von Sulfit, das Cytochrom c dient als Elektronenakzeptor (Cohen und Fridovich, 1971). Die spezifische Enzymaktivität wurde unter Verwendung des molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  für das reduzierte Cytochrom c berechnet (Kamin *et al.*, 1965).

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in humanen und porcinen subzellulären hepatischen Fraktionen

##### 3.3.1.1 Lokalisation von mARC und der N-reduktiven Aktivität in humanen und porcinen Lebermitochondrien

Aus humaner und porciner Leber wurden, wie in Kap. 3.2.2.1 beschrieben, Mikrosomen, Cytosol und Mitochondrien gewonnen. Zur Bestimmung der Identität und Reinheit der subzellulären Leberfraktionen wurde eine Westernblotanalyse entsprechender Markerproteine durchgeführt (Abb. 3.3.1). Als mitochondrialer Marker wurde ein Antikörper gegen VDAC eingesetzt. VDAC formt einen Kanal durch die äußere mitochondriale Membran und ermöglicht die Diffusion kleiner hydrophiler Moleküle (Yamamoto *et al.*, 2006). Des Weiteren ist VDAC an der Freisetzung apoptotischer Faktoren beteiligt und spielt somit eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod (Zalk *et al.*, 2005). Als mikrosomaler Marker wurde ein Antikörper gegen Calnexin eingesetzt, welches ein häufig vorkommendes integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums ist (Vassilakos *et al.*, 1998). Die Cytosolfraktion wurde unter Verwendung eines Antikörpers gegen das cytosolische Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) charakterisiert (Sirover, 1999).

Die Markerproteine waren jeweils in den entsprechenden Subfraktionen angereichert, sodass deren Identität bestätigt werden konnten. Während in den cytosolischen Fraktionen keine Verunreinigungen durch die übrigen Subfraktionen nachgewiesen werden konnten, war zumindestens anhand der humanen Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion ersichtlich, dass es nicht möglich war, absolut reine Subfraktionen zu gewinnen. Die mitochondriale Fraktion wies eine Crosskontamination mit mikrosomalen Protein auf und in der Mikrosomenfraktion wurde der mitochondriale Marker VDAC detektiert (Abb. 3.3.1, A).

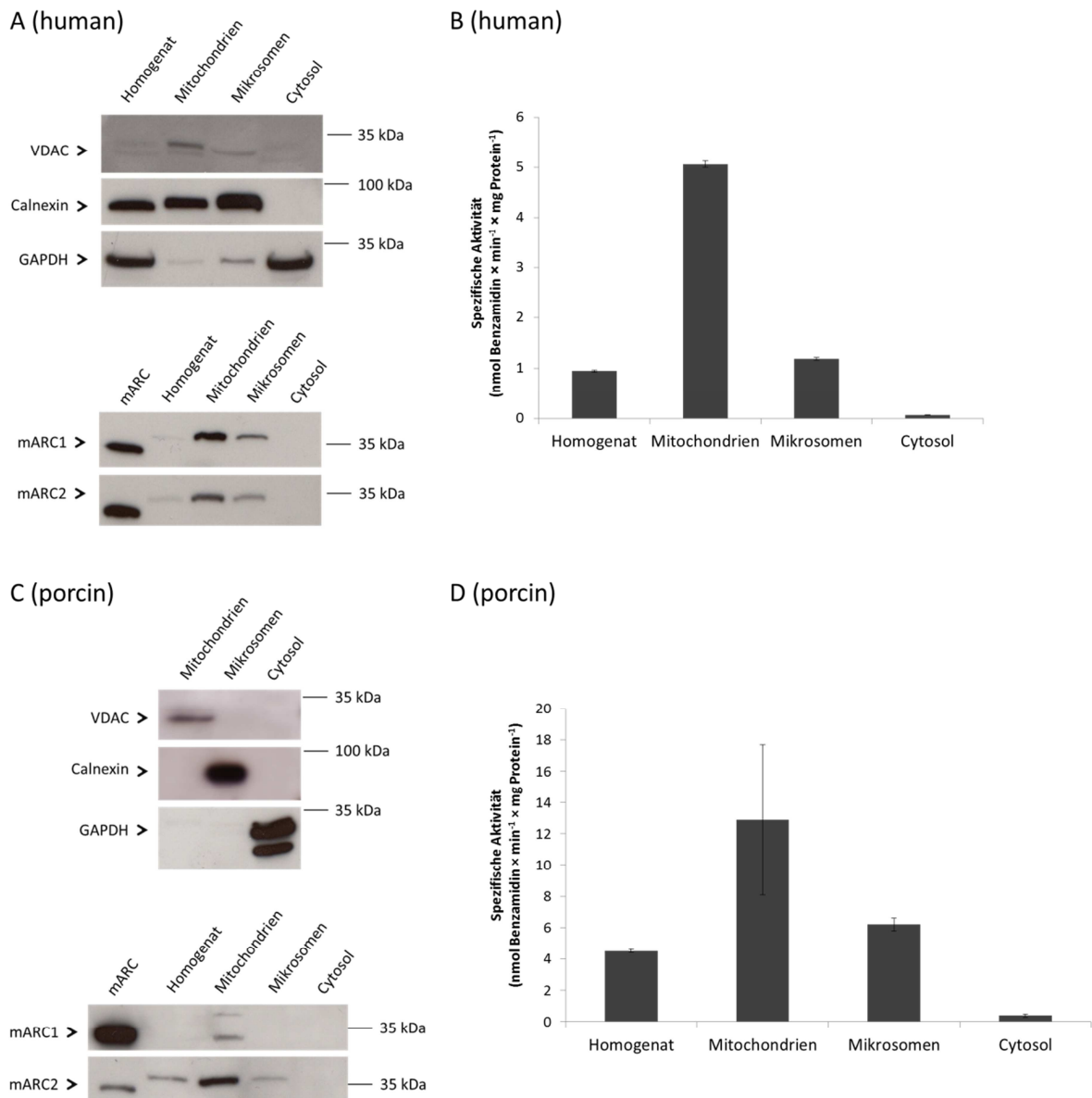
Die Charakterisierung der mARC-Expression in den hepatischen Subfraktionen erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen humanes mARC1 und mARC2. Die Spezifität der Antikörper konnte in Abb. 3.3.2 (C) demonstriert werden. Der mARC1-Antikörper erkannte nur das rekombinante humane mARC1 und nicht das zur Kontrolle aufgetragene

rekombinante mARC2. Der mARC2-Antikörper erkannte dementsprechend ausschließlich das rekombinante humane mARC2.

Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Spezies beide mARC-Proteine in den Mitochondrien lokalisiert waren. Die ebenfalls in der mikrosomalen Fraktion detektierten Banden, deren Intensität deutlich schwächer war als die in den Mitochondrienfraktionen, waren auf eine Crosskontamination mit mitochondrialen Protein zurückzuführen. Eine lösliche Form der mARC-Proteine im Cytosol konnte nicht detektiert werden (Abb. 3.3.1, A und C).

Die anhand des Modellsubstrats Benzamidoxim in den hepatischen Subfraktionen bestimmten *N*-reduktiven Aktivitäten stimmten mit den Ergebnissen der Westernblotanalyse überein (Abb. 3.3.1). In beiden Spezies konnte eine deutliche Anreicherung in den Mitochondrien ermittelt werden. Auch in den mikrosomalen Fraktionen wurde eine leichte Steigerung der *N*-reduktiven Aktivität im Vergleich zu den Homogenaten nachgewiesen, welche allerdings auf eine Crosskontamination mit mitochondrialen Protein zurückzuführen sind. Die *N*-reduktive Aktivität korrelierte sowohl in den humanen, als auch in den porcinen Subfraktionen mit der mARC-Expression. In den cytosolischen Fraktionen wurde demzufolge kaum *N*-Reduktion detektiert.

Die Daten der Westernblotanalyse der porcinen Subfraktionen hinsichtlich VDAC und Calnexin, sowie die spezifischen Aktivitäten wurden aus der Arbeit von Krischkowski (2010) herangezogen.



**Abb. 3.3.1** Westernblotanalyse und N-reduktive Aktivität von subzellulären hepatischen Fraktionen unterschiedlicher Spezies

(A) und (C): Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 20 - 35  $\mu\text{g}$  Protein, 0,03 - 0,05  $\mu\text{g}$  rekombinantes mARC1 bzw. 0,05  $\mu\text{g}$  rekombinantes mARC2 aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Mitochondrialer Marker: Anti-VDAC (1:1.000), mikrosomaler Marker: Anti-Calnexin (1:10.000), cytosolischer Marker: Anti-GAPDH (1:10.000); anti-mARC1 (1:1.000), anti-mARC2 (1:10.000).

(B) und (D): Die Inkubation wurde wie in Kap. 3.2.3.7.1 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg Protein, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden. Folgende Daten

wurden aus Krischkowski (2010) herangezogen: Westernblot (porcin): Calnexin und VDAC; Spezifische Aktivitäten (porcin).

### **3.3.1.2 Studien zur Lokalisation von mARC und der N-reduktiven Aktivität in der äußeren Membran humaner und porciner Lebermitochondrien**

In Abb. 3.3.2 ist die Charakterisierung der äußeren Membran humaner und porciner Lebermitochondrien hinsichtlich der mARC1- und mARC2-Expression, sowie der N-reduktiven Aktivität dargestellt. Die Gewinnung der OMV-Fraktion erfolgte wie in Kap. 3.2.2.2.2 beschrieben.

Sowohl auf humaner, als auch auf porciner Ebene waren mARC1 und mARC2 in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die gegen humanes mARC gerichteten Antikörper in der Lage waren auch porcines mARC1 und mARC2 spezifisch zu erkennen. Angemerkt sei, dass die mARC1-Bande in der porcinen OMV-Fraktion bei einem höheren Molekulargewicht detektiert wurde als das humane mARC1. Interessanterweise wurde außerdem für mARC1 eine Bande in der Mitochondrienfraktion detektiert, welche auf Höhe des N-trunkierten rekombinanten mARC1 lag. In der OMV-Fraktion war diese allerdings nicht mehr zu sehen. Bereits bei der Charakterisierung der porcinen extrahepatischen Mitochondrienfraktionen konnten im Herzen und in der Schilddrüse für mARC1 zwei Banden bei unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert werden (Abb. 2.3.1). Es ist denkbar, dass die höher liegende Bande in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und die untere Bande in einem anderen mitochondrialen Subkompartiment zu finden ist.

In der Arbeit von Klein *et al.* (2012), welche Lokalisationsstudien zu mARC1 an HeLa-Zellen durchgeführt haben, wurde ebenfalls gezeigt, dass humanes mARC1 in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert war.

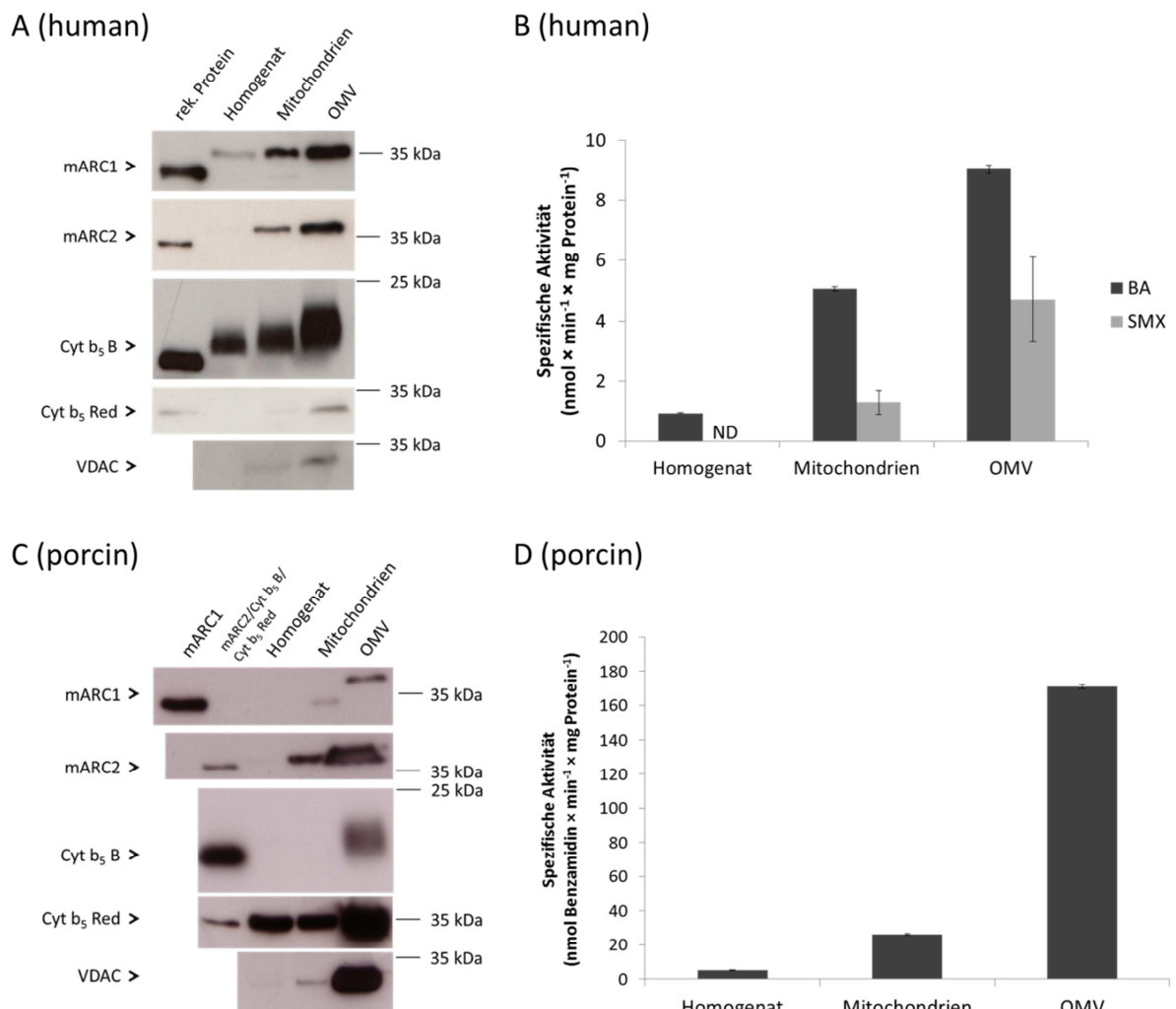
Zur Bestimmung der Identität wurde VDAC als Marker für die äußere mitochondriale Membran herangezogen und war, wie die beiden Elektronentransportproteine Cytochrom  $b_5$  B und die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase, dort deutlich angereichert.

Entsprechend der Lokalisation des mARC-abhängigen Dreikomponentenzystems war die N-reduktive Aktivität in den humanen und den porcinen Leberproben in der OMV-Fraktion angereichert. Die anhand des Modells substrats Benzamidoxim für diese Fraktion

ermittelten Umsetzungsrate waren auf porciner Ebene 18-fach höher als auf humaner Ebene.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Sulfamethoxazolhydroxylamin (SMX-HA) durch die humanen Lebersubfraktionen zu Sulfamethoxazol (SMX) reduziert wurde. Auch hier war eine Anreicherung der Aktivität in der OMV-Fraktion zu detektieren. Im Vergleich zum Modellsubstrat Benzamidoxim waren die Umsetzungsrate für SMX-HA etwas geringer.

Für die humanen Leberpräparationen wurden des Weiteren die enzymkinetischen Parameter der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Diese Daten sind im Anhang aufgeführt (Kap. 6.2.1, Tab. 6.2.1).



**Abb. 3.3.2** Westernblotanalyse und N-reduktive Aktivität der äußeren Membranfraktion hepatischer Lebermitochondrien unterschiedlicher Spezies

(A) und (C): Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 20 - 40  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Zur Kontrolle wurde des Weiteren das jeweilige rekombinante Protein (0,05  $\mu\text{g}$  rekombinantes mARC1, 0,05  $\mu\text{g}$  rekombinantes mARC2, 0,07  $\mu\text{g}$



*rekombinante Cytochrom  $b_5$  Reduktase und 0,01  $\mu\text{g}$  rekombinantes Cytochrom  $b_5$  B) eingesetzt. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-mARC1 (1:1.000), anti-mARC2 (1:10.000), anti-Cytochrom  $b_5$  B (1:1.000), anti-Cytochrom  $b_5$  Reduktase (1:1.000) und anti-VDAC (1:1.000) als OMV-Marker.*

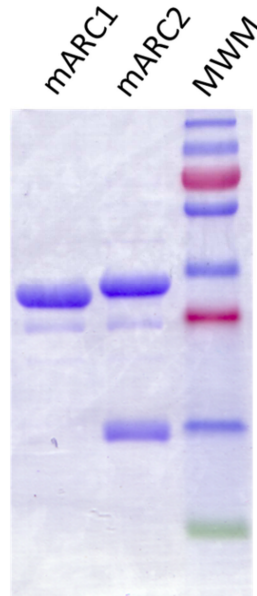
*(B) und (D): Die Inkubation wurde wie in Kap. 3.2.3.7.1 und Kap. 3.2.3.10 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 0,05 mg Protein. Die Inkubationszeiten betragen 15 - 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden. ND = nicht detektierbar, OMV = outer membrane vesicles  
BA = Benzamidin, SMX = Sulfamethoxazol*

### **3.3.1.3 Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression in porcinen und humanen hepatischen Präparationen**

Die Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression in den porcinen und humanen Subfraktionen erfolgte mittels quantitativer Westernblotanalyse. Zur Erstellung der Kalibriergerade wurden rekombinantes mARC1 und mARC2 verwendet.

#### **3.3.1.3.1 Reinheitsprüfung der rekombinanten mARC-Proteine mittels SDS-PAGE**

Die Identität und Reinheit, der für die quantitative Westernblotanalyse verwendeten rekombinanten mARC-Proteine, wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, mit anschließender Coomassiefärbung überprüft. Sowohl für mARC1 (32,9 kDa) als auch für mARC2 (33,4 kDa) befanden sich beim entsprechenden Molekulargewicht deutliche Banden. Neben den dominierenden Banden waren weitere schwächere Proteinsignale sichtbar, bei denen es sich eventuell um Zersetzungsprodukte des jeweiligen mARC-Proteins handeln könnte.



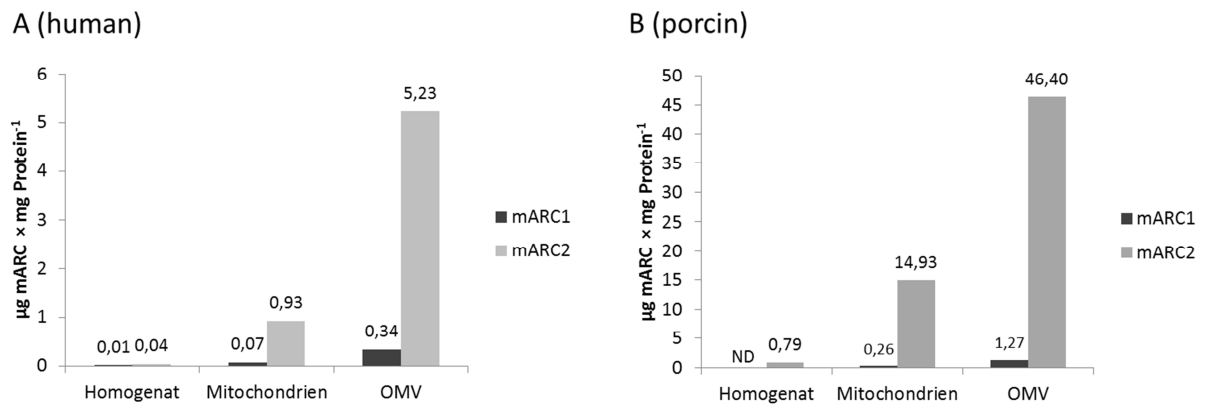
### Abb. 3.3.3 SDS-PAGE der rekombinanten mARC-Proteine mit Coomassiefärbung

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde wie in Kap. 3.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Coomassiefärbung erfolgte nach der in Kap. 3.2.3.3 aufgeführten Methode. Pro Bahn wurden 15  $\mu\text{g}$  rekombinantes Protein aufgetragen.

MWM = Molekulargewichtsmarker (130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa)

### 3.3.1.3.2 Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression in porcinen und humanen Leberpräparationen mittels quantitativer Westernblotanalyse

Aus Abbildung Abb. 3.3.4 ging hervor, dass sowohl in den porcinen als auch in den humanen Leberpräparationen mARC2 die vorherrschende Isoform war. Beide mARC-Proteine waren deutlich in der äußeren mitochondrialen Membranfraktion angereichert.



**Abb. 3.3.4 Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression in humanen und porcinen Leberpräparationen**

Die Westernblotanalyse und die anschließende Quantifizierung der mARC1- und mARC2-Expression erfolgte, wie in Kap. 3.2.3.5 beschrieben. Pro Bahn wurden 30 µg - 60 µg humanes Protein oder 2,5 µg - 60 µg porcines Protein aufgetragen. Zur Kalibrierung wurden 0,01 µg - 0,05 µg rekombinantes mARC1 oder 0,03 µg - 0,25 µg rekombinantes mARC2 eingesetzt. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Anti-mARC1 (1:1.000) und anti-mARC2 (1:10.000). Die ermittelten Werte sind Einfachmessungen, welche sich auf derselben Westernblotmembran befanden. Die Kalibriergerade umfasste 3 - 5 Punkte. Die lineare Regression lag zwischen 0,8953 und 0,9528.

OMV = outer membrane vesicles

### 3.3.2 Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 in porcinen Lebermitochondrien

Wie aus Kap. 3.3.1.2 hervorging, ist mARC1 neben der äußeren mitochondrialen Membran möglicherweise in einem weiteren submitochondrialen Kompartiment lokalisiert. Im Folgenden wurden daher verschiedene submitochondriale Fraktionen gewonnen und hinsichtlich der mARC-Expression charakterisiert.

#### 3.3.2.1 Charakterisierung der mitochondrialen Membranfraktion und der löslichen mitochondrialen Fraktion hinsichtlich der Lokalisation von mARC1 und mARC2

Die in diesem Kapitel hinsichtlich mARC1 und mARC2 charakterisierte mitochondriale Membranfraktion und die lösliche Mitochondrienfraktion wurden aus porcinen Lebermitochondrien, wie in Abb. 3.3.5 (A) schematisch dargestellt und in Kap. 3.2.2.2.1 beschrieben, gewonnen. Dabei beinhaltete das gewonnene Membranpellet die äußere und

innere Mitochondrienmembran. In der löslichen Fraktion waren die mitochondriale Matrix und der mitochondriale Intermembranraum enthalten.

Zur Bestimmung der Identität der Fraktionen erfolgte eine Westernblotanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene mitochondriale Markerenzyme (Abb. 3.3.5, B). COX IV (Cytochrom c Oxidase IV) und VDAC wurden als Marker für die innere und äußere mitochondriale Membran und DIABLO und SOD2 (Superoxid Dismutase 2) als Marker für den mitochondrialen Intermembranraum und die mitochondriale Matrix herangezogen.

COX IV ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und ist der finale Elektronenakzeptor in der Atmungskette (Abdulhag *et al.*, 2014). SOD2 ist ein Protein der mitochondrialen Matrix und katalysiert die Disproportionierung hochreaktiver Superoxidionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff (Karnati *et al.*, 2013). DIABLO, welches ebenfalls als Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*) bezeichnet wird, ist ein im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiertes proapoptisches Protein (Adrain *et al.*, 2001).

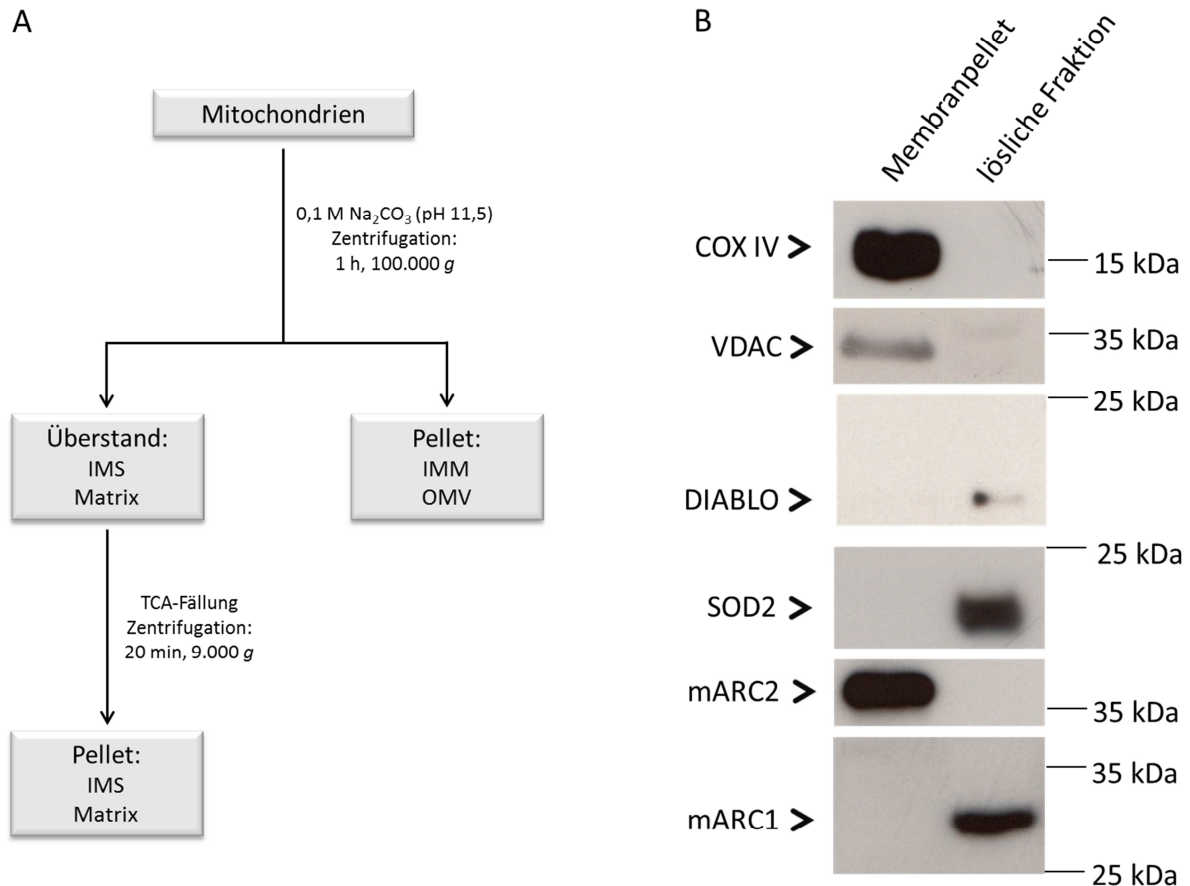
COX IV und VDAC konnten erwartungsgemäß im Membranpellet, aber nicht in der löslichen Fraktion detektiert werden. Die Markerenzyme DIABLO und SOD2 waren ausschließlich in der löslichen Fraktion zu finden.

Beide mARC-Proteine konnten mittels Westernblotanalyse detektiert werden (Abb. 3.3.5, B). Während mARC2 ausschließlich im Membranpellet nachgewiesen wurde, war die bereits in Abb. 3.3.2 (C), in den Mitochondrien detektierte mARC1-Bande deutlich in der löslichen Fraktion angereichert. Das in Abb. 3.3.2 (C), in der OMV-Fraktion detektierte mARC1 konnte im Membranpellet nicht nachgewiesen werden. Vermutlich wurde die Nachweisgrenze nicht erreicht, weil sich in dieser Fraktion ebenfalls Proteine der inneren Mitochondrienmembran befanden.

Die N-reduktive Aktivität wurde nicht bestimmt, da die Enzyme, aufgrund der während der Isolierung herrschenden Bedingungen, irreversibel denaturiert wurden.

In den Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC zeigten Klein *et al.* (2012) auf humaner Ebene, dass mARC1 nicht in der löslichen mitochondrialen Fraktion lokalisiert war, sondern in Mitochondrien ausschließlich als Protein der äußeren mitochondrialen Membran

vorkommt. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen unter Verwendung von HEP-G2-Zellen.



**Abb. 3.3.5 Subfraktionierungsschema und Westernblotanalyse der Membranfraktion und der löslichen Fraktion porciner hepatischer Mitochondrien**

(A) Schema zur Gewinnung der mitochondrialen Membranfraktion und der löslichen mitochondrialen Fraktion. Die Subfraktionierung erfolgte wie in Kap. 3.2.2.2.1 beschrieben.

(B) Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 15 - 20 µg porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Marker innere mitochondriale Membran: Anti-COX IV (1:10.000), Marker äußere mitochondriale Membran: Anti-VDAC (1:1.000) Marker mitochondrialer Intermembranraum: Anti-DIABLO (1:10.000), Marker mitochondriale Matrix: Anti-SOD2 (1:10.000); anti-mARC1 (1:1.000) und anti-mARC2 (1:10.000).

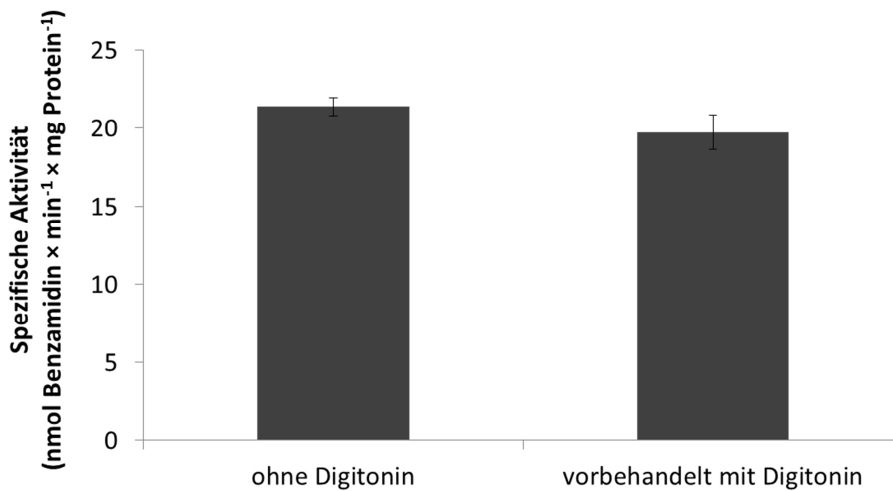
### **3.3.2.2 Charakterisierung mitochondrialer Subfraktionen hinsichtlich der Lokalisation von mARC1 und mARC2**

mARC1 wurde, wie in Kap. 3.3.2.1 gezeigt, in der löslichen Fraktion porciner Lebermitochondrien detektiert. In diesem Abschnitt erfolgte daher die Charakterisierung des mitochondrialen Intermembranraums und der mitochondrialen Matrix.

Da in den Arbeiten von Da Cruz *et al.* (2003) mARC1 und mARC2 in der inneren Membran von Mauslebermitochondrien detektiert werden konnten, wurde zusätzlich die innere mitochondriale Membran untersucht.

#### **3.3.2.2.1 Einfluss von Digitonin auf die N-reduktive Aktivität**

Digitonin ist ein Steroidsaponin, welches Cholesterol aus den Zellmembranen herauslöst und zur Gewinnung der IMM-Fraktion und IMS-Fraktion eingesetzt wurde (Kap. 3.2.2.2.3). Anhand der Mitochondrienfraktion wurde in Abb. 3.3.6 gezeigt, dass Digitonin in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin hatte. Zwischen den Enzymaktivitäten der unbehandelten und mit Digitonin behandelten Mitochondrien gab es keinen nennenswerten Unterschied.



**Abb. 3.3.6 Einfluss von Digitonin auf die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Lebermitochondrien**

*Die Vorbehandlung der porcinen Lebermitochondrien mit Digitonin erfolgte wie in Kap. 3.2.3.8 angegeben. Die Inkubation wurde wie in Kap. 3.2.3.7.1 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg porcines Protein, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.*

### 3.3.2.2.2 Analyse mitochondrialer Markerenzyme in den porcinen hepatischen mitochondrialen Subfraktionen

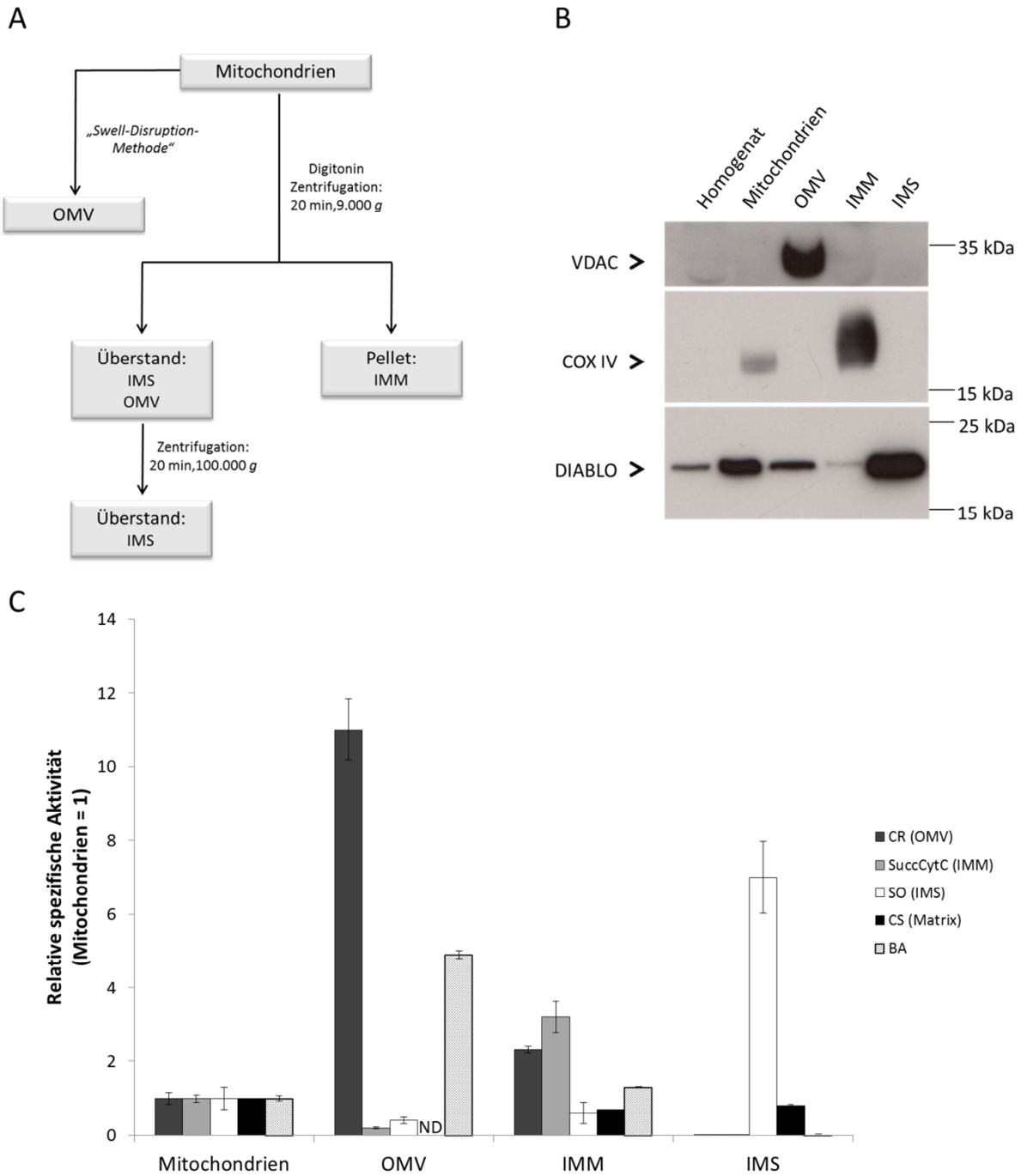
In Abb. 3.3.7 (A) ist die Isolierung der mitochondrialen Subfraktionen schematisch dargestellt. Zur Bestimmung der Identität der isolierten Fraktionen wurde eine Westernblotanalyse mit den bereits in Kap. 3.3.2.1 beschriebenen Markerenzymen durchgeführt (Abb. 3.3.7, B). VDAC wurde als Marker für die äußere Mitochondrienmembran deutlich in der OMV-Fraktion detektiert. Für COX IV als Protein der inneren Mitochondrienmembran wurde ausschließlich ein Signal in der IMM-Fraktion erhalten. DIABLO, welches im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert ist, wurde mit einer deutlichen Anreicherung gegenüber der Mitochondrienfraktion im Intermembranraum detektiert. Auch in der OMV-Fraktion und in der IMM-Fraktion wurde DIABLO nachgewiesen, allerdings waren die Signale in Bezug auf die Mitochondrien deutlich schwächer.

Um das Ausmaß der Crosskontamination der einzelnen Fraktionen zu bestimmen, wurden zusätzlich zur Westernblotanalyse die spezifischen Aktivitäten weiterer Markerenzyme ermittelt. Als Marker wurden für die äußere Membran die Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase (CR), für die innere Membran die Succinat Cytochrom c Reduktase (Succ Cyt c), für den Intermembranraum die Sulfitoxidase (SO) und für die Matrix die Citratsynthase (CS) herangezogen. In Abb. 3.3.7 (C) sind die relativen spezifischen Aktivitäten bezogen auf die Mitochondrienfraktion dargestellt. In allen charakterisierten Fraktionen waren die jeweiligen Markerenzyme in Bezug auf Mitochondrien deutlich angereichert. Die OMV- und IMS-Fraktion waren besonders rein, da eine klare Abreicherung der übrigen submitochondrialen Marker aufgezeigt werden konnte. Die IMM-Fraktion wies, im Gegensatz dazu, eine starke Crosskontamination mit äußerer mitochondrialer Membran auf. Die Aktivität der Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase war hier im Vergleich zur mitochondrialen Fraktion um den Faktor 2,3 angereichert.

Des Weiteren wurde im Vergleich zu den mitochondrialen Markerenzymen auch die relative Aktivität der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin dargestellt. Die höchste Aktivität war in der OMV-Fraktion zu verzeichnen. Die leichte Anreicherung der N-reduktiven Aktivität in der IMM-Fraktion korrelierte mit der Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase und war somit auf eine Crosskontamination mit der äußeren Membran zurückzuführen. In der IMS-Fraktion konnte hingegen kaum N-Reduktion nachgewiesen werden.

Die absoluten Werte der spezifischen Aktivität aller Markerenzyme sind in Tab. 3.3.1 aufgeführt.





**Abb. 3.3.7 Subfraktionierungsschema und Analyse mitochondrialer Markerenzyme porciner hepatischer Mitochondriensubfraktionen**

(A) Schema zur Gewinnung der mitochondrialen Subfraktionen. Die Subfraktionierung erfolgte wie in Kap. 3.2.2.2.2 und Kap. 3.2.2.2.3 beschrieben.

(B) Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 10 - 20 µg porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Marker äußere mitochondriale Membran: Anti-VDAC (1:1.000), Marker innere mitochondriale Membran: Anti-COX IV (1:10.000) und Marker mitochondrialer Intermembranraum: Anti-DIABLO (1:10.000).

(C) Relative spezifische Aktivität bezogen auf die Mitochondrienfraktion.

Die Enzymaktivitäten wurden spektrophotometrisch, wie in Kap. 3.2.3.12 - Kap. 3.2.3.15 beschrieben, bestimmt. Die Bestimmung der N-reduktiven Aktivität erfolgte wie in Kap. 3.2.3.7.1 beschrieben. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei Einzelmessungen.

CR = Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase (Marker äußere mitochondriale Membran), Succ Cyt c = Succinat Cytochrom c Reduktase (Marker innere mitochondriale Membran), SO = Sulfitoxidase (Marker mitochondrialer Intermembranraum), CS = Citratsynthase (Marker mitochondriale Matrix).

BA = Benzamidin, IMM = inner mitochondrial membrane, IMS = intermembrane space, OMV = outer membrane vesicles

Fraktion	Spezifische Aktivität ( $U \times mg^{-1}$ )			
	CR	SuccCytC	SO	CS
Mitochondrien	0,151 $\pm 0,025$	0,383 $\pm 0,038$	0,008 $\pm 0,002$	0,309 $\pm 0,002$
OMV	1,661 $\pm 0,126$	0,061 $\pm 0,006$	0,003 $\pm 0,001$	ND
IMM	0,331 $\pm 0,013$	1,233 $\pm 0,164$	0,005 $\pm 0,002$	0,221 $\pm 0,003$
IMS	0,012 $\pm 0,001$	0,007 $\pm 0,001$	0,056 $\pm 0,008$	0,248 $\pm 0,015$

**Tab. 3.3.1 Enzymatische Charakterisierung der isolierten submitochondrialen Fraktionen**

Die Enzymaktivitäten wurden spektrophotometrisch, wie in Kap. 3.2.3.12 - Kap. 3.2.3.15 beschrieben, bestimmt. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei Einzelmessungen.

CR = Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase (Marker äußere mitochondriale Membran), Succ Cyt c = Succinat Cytochrom c Reduktase (Marker innere mitochondriale Membran), SO = Sulfitoxidase (Marker mitochondrialer Intermembranraum), CS = Citratsynthase (Marker mitochondriale Matrix).

IMM = inner mitochondrial membrane, IMS = intermembrane space, OMV = outer membrane vesicles

### **3.3.2.2.3 Westernblotanalyse zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 und Bestimmung der N-reduktiven Aktivität**

Die Westernblotanalyse in Abb. 3.3.8 (A) zeigte, dass mARC1 und mARC2 in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert waren. Es sei angemerkt, dass mARC1 bei einem ungewöhnlich hohen Molekulargewicht lag. Neben der Detektion von mARC2 in der äußeren Membran, wurde auch in der IMM-Fraktion eine mARC2-Bande ermittelt, welche gegenüber den Mitochondrien angereichert war. Diese war jedoch auf eine Crosskontamination mit der äußeren Membran zurückzuführen, was anhand der Rotenon insensitive Cytochrom c Reduktase-Aktivität belegt werden konnte (Abb. 3.3.7, C).

Das in Kap. 3.3.2.1 in der löslichen Mitochondrienfraktion detektierte mARC1, welches auf Höhe des N-trunkierten rekombinanten mARC1 lag, war in der IMS-Fraktion angereichert. Diese Bande konnte auch in der IMM-Fraktion nachgewiesen werden. Jedoch war sie im Vergleich zur Mitochondrienfraktion dort nicht angereichert und vermutlich auf eine Crosskontamination mit dem mitochondrialen Intermembranraum bedingt. Dies konnte durch Bestimmung der Sulfitoxidaseaktivität als IMS-Marker belegt werden (Abb. 3.3.7, C).

Aufgrund der hohen Crosskontamination der IMM-Fraktion mit der OMV-Fraktion konnte keine eindeutige Aussage zur Lokalisation von mARC1 und mARC2 in der inneren Mitochondrienmembran getätigt werden.

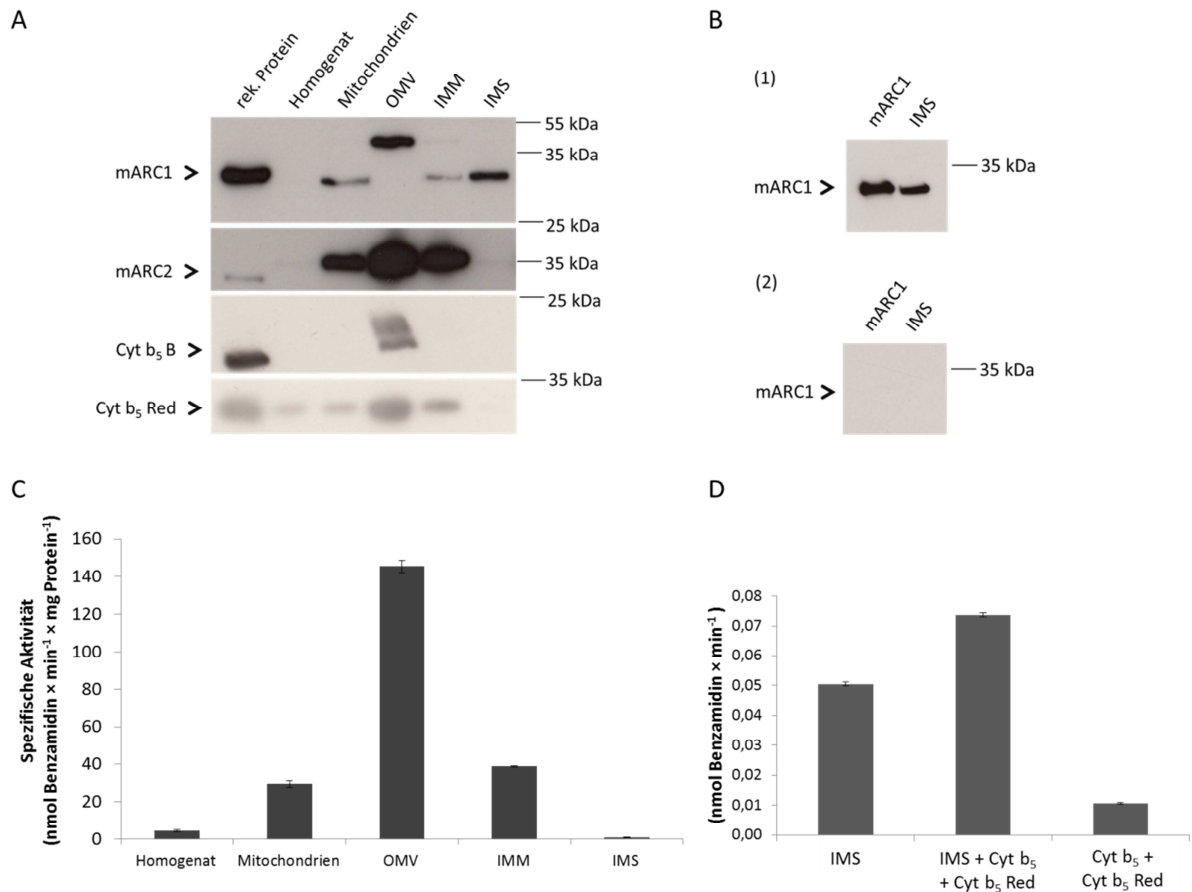
Neben den mARC-Proteinen waren auch die beiden Elektronentransportproteine Cytochrom  $b_5$  und die Cytochrom  $b_5$  Reduktase in der OMV-Fraktion mit einer deutlichen Anreicherung zu detektieren.

Die N-reduktive Aktivität korrelierte mit der Expression des mARC-haltigen Dreikomponentenzystems und war dementsprechend in der OMV-Fraktion am höchsten. Auch in der IMM-Fraktion wurde eine leichte Anreicherung (Faktor 1,3) der N-Reduktion im Vergleich zu den Mitochondrien detektiert, welche auf eine Crosskontamination mit der äußeren mitochondrialen Membran zurückzuführen war.

In der IMS-Fraktion wurde hingegen kaum eine Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin detektiert. Die ermittelten Umsetzungsraten waren gegenüber dem Homogenat und der Mitochondrienfraktion deutlich geringer.

In der IMS-Fraktion konnte mARC1, jedoch nicht Cytochrom  $b_5$  und die Cytochrom  $b_5$  Reduktase detektiert werden. Dementsprechend gering fiel die ermittelte N-reduktive Aktivität aus. Um zu testen, ob das in dieser Fraktion nachgewiesene mARC1 in der Lage war Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren, wurden dem *in vitro* Inkubationsansatz die beiden Elektronentransportproteine in rekombinanter Form zugesetzt (Abb. 3.3.8, D). Eine Steigerung der N-Reduktion konnte jedoch nicht detektiert werden. Die um 0,02 nmol erhöhte Bildung von Benzamidin pro Minute war alleine auf die beiden Elektronentransportproteine zurückzuführen. In vorangegangenen Studien mit Rattenleberperoxisomen konnte das N-reduktive Enzymsystem, durch Zugabe der Elektronentransportproteine in rekombinanter Form, ebenfalls nicht rekonstituiert werden (Gabel, 2011).

Um zu bestätigen, dass die auf der Höhe des rekombinanten mARC1 liegende Bande spezifisch vom mARC1-Antikörper erkannt wurde, erfolgte die Durchführung eines Blocking-Experimentes (Abb. 3.3.8, B). Auf der Kontrollmembran (1) konnten das rekombinante mARC1 und die Bande in der IMS-Fraktion deutlich detektiert werden. Im Vergleich dazu waren auf der Membran (2), welche mit dem Antikörper inkubiert wurde, dessen spezifische Bindungsstelle mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid geblockt war, keine Banden vorhanden. Der mARC1-Antikörper erkannte die entsprechende Bande somit spezifisch als mARC1.



**Abb. 3.3.8** Charakterisierung der mARC1- und mARC2-Expression und der N-reduktiven Aktivität in den porcinen mitochondrialen Subfraktionen

(A) Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 20 µg porcines Protein aufgetragen. Zur Kontrolle wurde des Weiteren das jeweilige rekombinante Protein (0,05 µg rekombinantes mARC1, 0,05 µg rekombinantes mARC2, 0,01 µg rekombinantes Cytochrom b<sub>5</sub> B und 0,07 µg rekombinante Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase) eingesetzt. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-mARC1 (1:1.000), anti-mARC2 (1:10.000), anti-Cytochrom b<sub>5</sub> B (1:1.000) und anti-Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase (1:1.000).

(B) Das Blocking-Experiment wurde wie in Kap. 3.2.3.6 beschrieben durchgeführt. Die anschließende Westernblotanalyse erfolgte nach Kap. 3.2.3.4. Pro Bahn wurden 20 µg porcines Protein und 0,05 µg rekombinantes mARC1 aufgetragen. Für die Immunodetektion wurde folgender Primärantikörper eingesetzt: Anti-mARC1 (1:1.000). (1) Kontrollmembran, (2) Blocking-Membran: Spezifische Antikörperbindungsstelle wurde mit dem entsprechenden Peptid geblockt.

(C) Die Inkubation wurde wie in Kap. 3.2.3.7.1 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg porcines Protein, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

(D) Die Rekonstitution des N-reduktiven Enzymsystems durch Zusatz rekombinanter Proteine erfolgte wie in Kap. 3.2.3.7.1. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg porcines Protein, 75 pmol Cytochrom b5, 7,5 pmol Cytochrom b5 Reduktase, 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.

IMM = inner mitochondrial membrane, IMS = intermembrane space, OMV = outer membrane vesicles

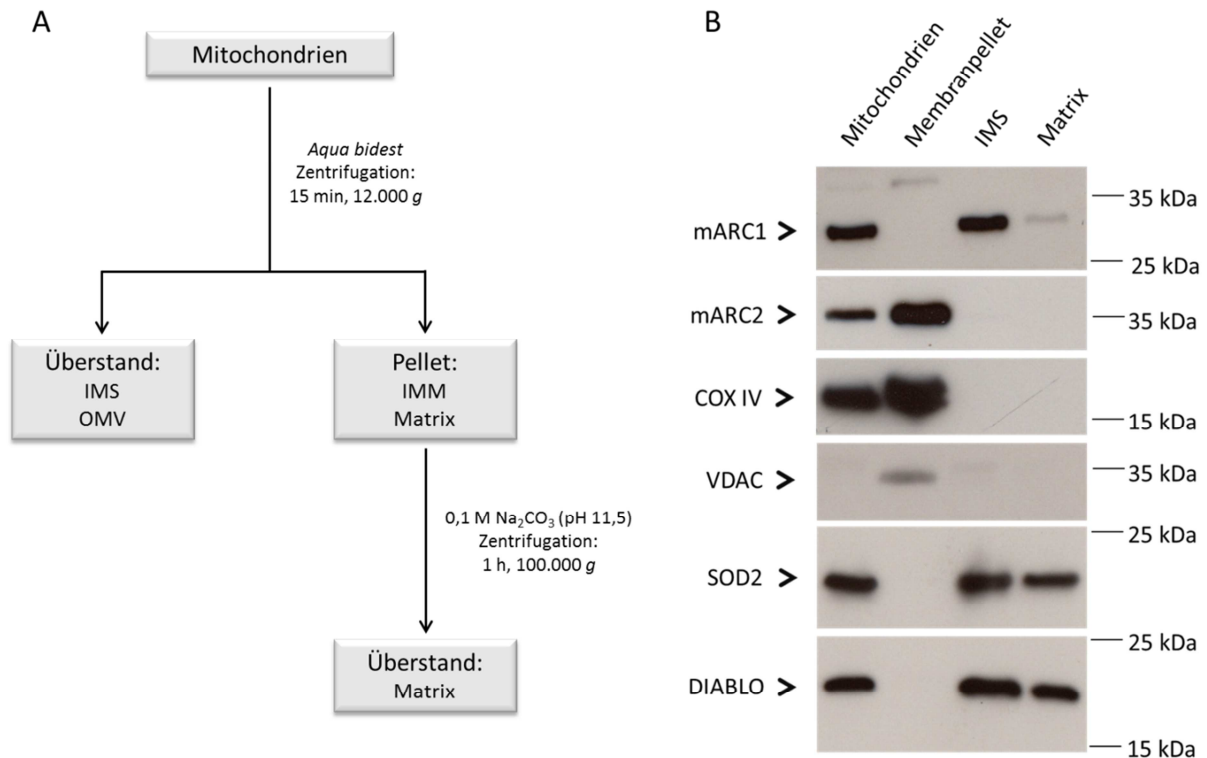
#### 3.3.2.2.4 Charakterisierung der mitochondrialen Matrix hinsichtlich der Lokalisation von mARC1

mARC1 konnte, im Gegensatz zu mARC2, in der löslichen submitochondrialen Fraktion detektiert und bereits dem mitochondrialen Intermembranraum zugeordnet werden (Abb. 3.3.8). Um zu zeigen, dass diese lösliche Form von mARC1 nicht in der Matrix lokalisiert war, wurde diese ebenfalls charakterisiert. Die Isolierung ist schematisch in Abb. 3.3.9 (A) dargestellt und erfolgte wie in Kap. 3.2.2.2.4 beschrieben.

Die Identität und Reinheit der Fraktionen und die mARC-Expression wurden mittels Westernblotanalyse charakterisiert (Abb. 3.3.9, B). Die Identitäten aller Fraktionen konnten mittels der gewählten Markerenzyme bestätigt werden. Die Marker COX IV und VDAC für die innere und äußere Mitochondrienmembran wurden in der IMS-Fraktion und in der Matrixfraktion nicht detektiert. Die mitochondriale Matrix war hingegen mit IMS verunreinigt, allerdings waren der IMS-Marker (DIABLO), sowie mARC1 gegenüber den Mitochondrien abgereichert. Durch die SOD2 konnte eine Crosskontamination der IMS-Fraktion mit der mitochondrialen Matrix nachgewiesen werden. Allerdings wurde durch die Bestimmung der Citratsynthaseaktivität in der IMS-Fraktion gezeigt, dass die Matrix, im Gegensatz zur mARC1-Bande, in dieser Fraktion abgereichert war (Tab. 3.3.1).

Die mARC1 Bande, welche in der löslichen Fraktion detektiert wurde, war somit im IMS lokalisiert und nicht in der mitochondrialen Matrix.

Die N-reduktive Aktivität in der Matrix konnte nicht bestimmt werden, da die Enzyme, aufgrund der während der Isolierung herrschenden Bedingungen, irreversibel denaturiert wurden.



**Abb. 3.3.9** Subfraktionierungsschema der mitochondrialen Matrix und Westernblotanalyse

(A) Schema zur Gewinnung der mitochondrialen Subfraktionen. Die Subfraktionierung erfolgte wie in Kap. 3.2.2.2.4 beschrieben.

(B) Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurde 15 - 20  $\mu\text{g}$  porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Anti-mARC1 (1:1.000), anti-mARC2 (1:10.000), Marker innere mitochondriale Membran: Anti-COX IV (1:10.000), Marker äußere mitochondriale Membran: Anti-VDAC (1:1.000), Marker mitochondrialer Intermembranraum: Anti-DIABLO (1:10.000), Marker mitochondriale Matrix: Anti-SOD2 (1:10.000).

OMV = outer membrane vesicles, IMS = intermembrane space

### 3.3.2.3 Massenspektrometrische Analyse und Reinigung des in der IMS-Fraktion detektierten mARC1

Die in der IMS-Fraktion detektierte mARC1-Bande wurde aus einem Coomassiegel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die Identität als mARC1 konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Da die IMS-Fraktion zahlreiche weitere Proteine enthielt, erfolgten Aufreinigungsversuche mittels Ionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie. Diese Versuche waren bisher leider nicht erfolgreich, deshalb wurde auf eine erneute massenspektrometrische Analyse verzichtet.

## 3.4 Diskussion

Alle bisher untersuchten Säugetiergenome codieren für zwei mARC-Proteine, welche in Mitochondrien lokalisiert sind (Wahl *et al.*, 2010). In zahlreichen Rekonstitutions-Assays mit rekombinanten Proteinen konnte gezeigt werden, dass mARC1 und mARC2 zusammen mit Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase in der Lage waren zahlreiche *N*-hydroxylierte Verbindungen und Prodrugs zu reduzieren (Grünwald *et al.*, 2008; Krompholz *et al.*, 2012). In Studien mit subzellulären porcinen Fraktionen konnte demonstriert werden, dass die *N*-reduktive Aktivität in den Mitochondrien und nicht in den Mikrosomen angereichert war und mit der Lokalisation von mARC korrelierte (Krischkowski, 2010; Krompholz *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurden humane und porcine Lebersubfraktionen hinsichtlich der Lokalisation der beiden mARC-Proteine und der *N*-reduktiven Aktivität untersucht. Die charakterisierten Mitochondrien, die mikrosomale Fraktion und die cytosolische Fraktion wurden, nach einer im Arbeitskreis etablierten Methode, mittels Differential- und Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Clement *et al.*, 2005; Havemeyer *et al.*, 2006; Krompholz *et al.*, 2012). Bei den isolierten Fraktionen handelte es sich um Anreicherungen, deren Identität und Reinheit mittels Westernblotanalyse spezifischer Markerproteine bestimmt wurde.

Die Charakterisierung der mARC-Expression in den hepatischen Subfraktionen erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen humanes mARC1 und mARC2. Die Spezifität der



Antikörper konnte in Abb. 3.3.2 (C) demonstriert werden. Der mARC1-Antikörper erkannte nur das rekombinante humane mARC1 und nicht das zur Kontrolle aufgetragene rekombinante mARC2. Der mARC2-Antikörper erkannte dementsprechend ausschließlich das rekombinante humane mARC2. Des Weiteren waren die gegen humanes mARC gerichteten Antikörper in der Lage auch porcines mARC1 und mARC2 spezifisch zu erkennen.

Die Westernblotanalyse zeigte, dass mARC1 und mARC2 sowohl auf humaner, als auch auf porciner Ebene in den Mitochondrien lokalisiert waren. Die in der Mikrosomenfraktion detektierten mARC-Banden waren deutlich schwächer und auf eine Crosskontamination mit mitochondrialen Protein zurückzuführen. Dies konnte mittels Analyse des Mitochondrienmarkers VDAC bestätigt werden.

Die *N*-Reduktion wurde anhand von Benzamidoxim, welches ein gut etabliertes Markersubstrat für das mARC-abhängige Enzymsystem darstellt, bestimmt. Erwartungsgemäß war diese, sowohl in den humanen, wie auch in den porcinen Leberfraktionen in den Mitochondrien angereichert und korrelierte mit der Lokalisation der beiden mARC-Proteine. Die Umsetzungsraten in den humanen Präparationen, waren im Vergleich, zu denen in den porcinen Lebermitochondrien ermittelten Werten, etwa um den Faktor vier geringer. Eine mögliche Erklärung für die deutlichen Unterschiede war, dass die humanen Leberproben bereits über mehrere Jahre bei -80 °C gelagert worden sind. Im Vergleich dazu wurden die porcinen Lebern stets nach der Schlachtung der Schweine in Standardpuffer gelegt, direkt im Anschluss subfraktioniert und hinsichtlich der *N*-reduktiven Aktivität charakterisiert. Trotz Zusatz von Proteasehemmern und Lagerung bei -80 °C werden Enzyme im Laufe der Zeit abgebaut und verlieren einen Teil ihrer Aktivität. Dies könnte auch bei den humanen Leberproben der Fall gewesen sein. Des Weiteren handelte es sich bei den Schweinen um Mastschweine, welche nach ca. 100 Masttagen geschlachtet wurden. Diese wiesen wahrscheinlich eine höhere metabolische Leberaktivität auf als die humanem Leberpräparationen, welche unter anderem von Menschen höheren Alters stammten.

In den Arbeiten von Clement *et al.* (2005) wurden ebenfalls Reduktionsstudien mit humanen Material durchgeführt. Ermittelt wurden unter anderem  $V_{\max}$ -Werte für die Reduktion der *N*-hydroxylierten Verbindungen Benzamidoxim und Guanoxabenz durch humane Leber- und Nierenmitochondrien. Bei Guanoxabenz handelt es sich um ein Prodrug mit *N*-hydroxylierter Guanidinstruktur. Die Wirkform Guanabenz ist ein zentralwirksamer  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Agonisten und besitzt eine antihypertone Wirkung. Der  $V_{\max}$ -Wert für die Umsetzung von

Guanoxabenz betrug in den Nierenmitochondrien  $0,3 \text{ (nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1})$  und in den Lebermitochondrien  $7,1 \text{ (nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1})$ . Für die Reduktion von Benzamidoxim wurden  $V_{\max}$ -Werte ermittelt, die ebenfalls bei ca.  $7 \text{ (nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1})$  lagen. Der in dieser Arbeit für die Lebermitochondrien bestimmte  $V_{\max}$ -Wert befand sich mit  $4,4 \text{ (nmol Benzamidin} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1})$  in ähnlichen Bereichen.

In der Vergangenheit haben sich verschiedene Arbeitskreise mit der submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 beschäftigt. Havemeyer konnte 2006 mit mARC2 die bis dahin unbekannte dritte Komponente des N-reduktiven Enzymsystems aus der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien reinigen und identifizieren. In vorangegangenen Studien detektierten Da Cruz *et al.* (2003) beide, zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt, mARC-Proteine in der inneren Membran von Mauslebermitochondrien. Allerdings wiesen die analysierten Fraktionen Crosskontaminationen, unter anderem mit Proteinen der äußeren Membran, auf. Das Vorkommen von mARC2 in der inneren Mitochondrienmembran konnte in den von Neve *et al.* (2012) durchgeführten Untersuchungen von Rattenlebermitochondrien nicht bestätigt werden. Gezeigt werden konnte die Lokalisation von mARC2 in der äußeren Mitochondrienmembran und die damit verbundene Anreicherung der N-reduktiven Aktivität.

Klein *et al.* (2012) führten Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 an humanen Zelllinien durch. Betrachtet wurden die löslichen mitochondrialen Subkompartimente und die Mitochondrienmembranen. mARC1 wurde hier ausschließlich in der äußeren mitochondrialen Membran detektiert.

Obwohl alle bisher analysierten Säugetiergenome für zwei mARC-Enzyme codieren, waren die durchgeführten Studien zur Lokalisation von mARC1 und mARC2 in den jeweiligen Spezies meist nur auf eines der beiden Proteine bezogen. Es ist denkbar, dass speziesabhängig immer eine Isoform dominant vertreten ist und das zweite mARC-Protein somit nicht detektiert werden konnte. In vorangegangenen Studien konnte im rekonstituierten humanen Enzymsystem gezeigt werden, dass beide rekombinanten mARC-Proteine in der Lage waren N-hydroxylierte Substrate zu reduzieren (Wahl *et al.*, 2010; Krompholz *et al.*, 2012). Dies wurde an lebenden humanen Zellen durch einen siRNA vermittelten mARC-Knockdown bestätigt. Folglich ist speziesabhängig wahrscheinlich jeweils

die dominant vorliegende mARC-Isoform hauptverantwortlich für den N-reduktiven Metabolismus (Plitzko *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit wurden mARC1 und mARC2 in porcinen und humanen Leberpräparationen mittels Westernblotanalyse quantifiziert. Die klassische Westernblotanalyse wird weitestgehend als qualitative Methode angewendet. Dennoch ist es unter Verwendung spezifischer Kontrollen möglich, dieses Verfahren auch zur quantitativen Analyse von Proteinen einzusetzen (Schiavini *et al.*, 1989; Hunger *et al.*, 1994). Zur Kalibrierung wurden rekombinantes mARC1 und mARC2 verwendet. Sowohl in den porcinen, als auch in den humanen Fraktionen war mARC2 gegenüber mARC1 die vorherrschende Isoform. Im Vergleich zu den auf Proteinebene ermittelten Expressionsdaten waren die mRNA-Level von mARC1 und mARC2 im humanen Lebergewebe ungefähr gleich groß (Expressionsdaten siehe Anhang Kap. 6.3). Die mRNA-Expression muss jedoch nicht zwangsläufig mit den jeweiligen Proteindaten korrelieren, da viele Faktoren die Regulation der Proteinexpression beeinflussen können (Vogel und Marcotte, 2012). Die in Kap. 6.3 aufgeführten mRNA-Daten demonstrieren, dass bei Betrachtung sämtlicher Gewebe und Zellen, mARC1 auf humaner Ebene die vorherrschende Isoform zu sein scheint.

Bei den in dieser Arbeit ermittelten Proteindaten der porcinen Proben war zu berücksichtigen, dass für die Kalibrierung rekombinantes humanes mARC eingesetzt wurde, da porcines mARC nicht zur Verfügung stand. Des Weiteren zeigte die Reinheitsprüfung der rekombinanten mARC-Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, dass mARC2 eine höhere Verunreinigung als mARC1 aufwies. Diese Verunreinigung wurde bei der quantitativen Auswertung der mARC2-Expression nicht berücksichtigt. Dadurch erhöhte sich die berechnete Menge mARC2 pro Milligramm Protein in den charakterisierten Präparationen.

In dieser Arbeit wurden des Weiteren Studien zur submitochondrialen Lokalisation beider mARC-Proteine innerhalb einer Spezies und vergleichend zwischen Mensch und Schwein durchgeführt. Dazu wurde zunächst die äußere Membran humaner und porciner Lebermitochondrien hinsichtlich der Expression von mARC1 und mARC2 und der N-reduktiven Aktivität charakterisiert. Es konnte für beide Spezies gezeigt werden, dass mARC1 und mARC2 eine Lokalisation in der äußeren mitochondrialen Membran aufwiesen. Wobei mARC1 in der porcinen OMV-Fraktion ein höheres Molekulargewicht als das humane

mARC1 besaß. Es konnte eindeutig belegt werden, dass die mARC-Expression mit der, anhand des Modellsubstrats Benzamidoxim bestimmten N-reduktiven Aktivität korrelierte, welche speziesunabhängig in der OMV-Fraktion angereichert war.

Für mARC1 wurde interessanterweise in der porcinen Mitochondrienfraktion eine Doppelbande detektiert (Abb. 3.3.1). Aus Abb. 3.3.2 war ersichtlich, dass die höhere mARC1-Bande in der OMV-Fraktion lokalisiert war. mARC1, welches auf Höhe des N-trunkierten rekombinanten mARC1 lag, war in dieser Fraktion jedoch nicht mehr zu detektieren. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass mARC1, neben der Lokalisation in der äußeren mitochondrialen Membran, in einem weiteren submitochondrialen Kompartiment zu finden war.

Daher wurden mittels Differentialzentrifugation verschiedene porcine submitochondriale Fraktionen gewonnen und hinsichtlich mARC1, mARC2 und der N-reduktiven Aktivität untersucht. Isoliert wurden die lösliche Fraktion (Matrix, mitochondrialer Intermembranraum) und die innere Mitochondrienmembran. Die Identität und Reinheit der isolierten Fraktionen wurde durch Aktivitätsbestimmung und Westernblotanalyse entsprechender Markerenzyme charakterisiert.

Die mARC1-Bande, welche sich auf der Höhe des rekombinanten N-trunkierten mARC1 befand, wurde deutlich in der IMS-Fraktion detektiert. mARC2 hingegen war nur in der OMV-Fraktion lokalisiert. Das in der IMM-Fraktion detektierte mARC2 war vermutlich auf eine Crosskontamination mit äußerer Membran zurückzuführen.

Klein *et al.* (2012) detektierten ebenfalls eine mARC1-Bande bei ca. 30 kDa in der löslichen Fraktion, führten diese jedoch auf eine Proteasebehandlung zurück. Es war nicht auszuschließen, dass es sich bei dem in dieser Arbeit detektierten mARC1 ebenfalls um ein durch Proteasen abgespaltenes Fragment handelte. Jedoch hätte mARC1 dann auch im Cytosol detektiert werden müssen, da die katalytische Domäne zur cytosolischen Seite orientiert ist (Klein *et al.*, 2012). In der mARC1-Westernblotanalyse der extrahepatischen Mitochondrien waren teilweise auch Doppelbanden zu detektieren. Die Hauptsignale lagen, mit Ausnahme des Herzens, auf der Höhe des rekombinanten N-trunkierten mARC1 (Abb. 2.3.1).

Die N-reduktive Aktivität war deutlich in der äußeren mitochondrialen Membranfraktion angereichert. Auch in der IMM-Fraktion wurde eine leichte Anreicherung detektiert, welche

jedoch auf eine Crosskontamination mit der äußeren mitochondrialen Membran zurückzuführen war. In der IMS-Fraktion konnte hingegen kaum eine Umsetzung detektiert werden. Die Westernblotanalyse hinsichtlich der beiden Elektronentransportproteine Cytochrom  $b_5$  und der Cytochrom  $b_5$  Reduktase zeigte korrelierend, dass diese dort nicht vorhanden waren. Ein Zusatz der Elektronentransportproteine in rekombinanter Form konnte jedoch keine Steigerung der N-reduktiven Aktivität herbeiführen. Als Ursache wäre denkbar, dass die Menge mARC1 in der IMS-Fraktion nicht ausreichte, um eine deutliche N-Reduktion zu bedingen. Möglich wäre ebenfalls, dass der für die Inkubation eingesetzte Kaliumphosphatpuffer (100 mM), aufgrund seiner hohen Ionenstärke die enzymatische Aktivität der zugesetzten rekombinanten Enzyme herabgesetzt hat. Denn im Gegensatz zu den subzellulären Fraktionen wurde für den rekombinanten rekonstituierten Dreikomponentenenzymassay ein 20 mM MES-Puffer (pH 6) als optimaler Inkubationspuffer ermittelt (Plitzko, 2010). Das optimale Verhältnis von Cytochrom  $b_5$  zur Cytochrom  $b_5$  Reduktase betrug, in Bezug auf den Häm- und FAD-Gehalt, 10:1. Dies wurde im Inkubationsansatz berücksichtigt.

mARC2 weist neben den Mitochondrien eine Colokalisation in der Membran von Rattenleberperoxisomen auf. Rekonstitutionsassays unter Zusatz der beiden rekombinanten Elektronentransportproteinen führten in den peroxisomalen Fraktionen ebenfalls nicht zur Steigerung der N-reduktiven Aktivität (Gabel, 2011).

Die im IMS detektierte lösliche Form von mARC1 besitzt dem Anschein nach eine andere Aufgabe als N-oxygenierte Verbindungen zu reduzieren. Da Cytochrom  $b_5$  und die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase mit ihrer katalytisch aktiven Domäne zur cytosolischen Seite gerichtet sind, ist es ihnen im intakten Mitochondrium nicht möglich mit dem löslichen mARC1 zu interagieren. Da im IMS keine N-reduktive Aktivität nachgewiesen werden konnte, kooperieren in dieser Fraktion höchstwahrscheinlich auch keine anderen Elektronentransportproteine mit mARC1.

Auf Sequenzanalyse basierende Daten lassen vermuten, dass die mARC-Enzyme eine  $\beta$ -barrel Domäne besitzen (Anantharaman und Aravind, 2002).  $\beta$ -barrel-Proteine werden im Allgemeinen als Vorstufenproteine in den mitochondrialen Intermembranraum transportiert und von dort aus in die äußere Mitochondrienmembran eingebaut (Schmidt *et al.*, 2010). Es ist denkbar, dass mARC1 aufgrund seiner  $\beta$ -barrel Domäne im IMS detektiert werden konnte. Fraglich ist dann, warum mARC2 in dieser Fraktion nicht detektiert wurde.

Entgegen diesen Vermutungen konnten Klein *et al.* (2012) zeigen, dass es sich bei mARC1 um ein Signal-verankertes Protein handelt, welches unabhängig vom Membranpotential von der cytosolischen Seite in die äußere mitochondriale Membran eingebaut wird.

Das mARC1 im IMS wurde auf Höhe des rekombinanten mARC1 detektiert. Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten humanen mARC-Proteine waren N-trunkiert und besaßen somit keinen Membrananker mehr. Dadurch wiesen sie ein ca. 3 kDA geringeres Molekulargewicht als das native mARC1 und mARC2 auf. Es kann daher vermutet werden, dass dem löslichen mARC1 ebenfalls der Membrananker fehlte und es dadurch bei einem etwas niedrigeren Molekulargewicht als die mARC-Banden in der OMV-Fraktion detektiert wurde. Ein fehlender Membrananker spricht außerdem für eine Lokalisation in der löslichen Fraktion.

Die Sulfitoxidase und mARC sind Molybdoenzyme, welche aufgrund der Struktur ihres Molybdäncofaktors zur Sulfitoxidase-Familie gehören. Die Sulfitoxidase wird als Vorstufenprotein mit einer mitochondrialen Targeting-Sequenz synthetisiert, welche zur Lokalisation im mitochondrialen Intermembranraum führt. Hier erfolgt im Anschluss der Einbau des Molybdäncofaktors und des Häms, sowie die Dimerisierung (Mendel und Leimkühler, 2014). Vielleicht war das mARC1 im IMS nicht N-reduktiv aktiv, weil der Einbau des Cofaktors noch nicht erfolgt war. Klein (2012) postuliert, dass der Einbau des Molybdäncofaktors in das membranständige mARC1 erst nach der Intergration in die äußere Membran stattfindet.

mARC1 und mARC2 konnten auf porciner und humaner Ebene als Proteine der äußeren mitochondrialen Membran detektiert werden. Während mARC2 ausschließlich als membranständiges Protein zu finden war, konnte mARC1 zusätzlich in der löslichen Fraktion porciner Mitochondrien detektiert werden. Vergleicht man dies mit den pflanzlichen mARC-Proteinen, ist mARC2 dort ebenfalls in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, während mARC1 ein cytosolisches Protein darstellt (Mendel und Leimkühler, 2014). Das pflanzliche mARC1 zeigte ebenso wie das lösliche porcine mARC1 keine N-reduktive Aktivität. mARC1 scheint als lösliche Form eine andere Aufgabe als die N-Reduktion zu haben.

Für das humane mARC1, welches sich aus 337 Aminosäuren zusammensetzt, wurde ein N-terminales mitochondriales Targeting-Signal für Aminosäure 1 - 20, eine Transmembrandomäne für Aminosäure 21 - 40 und eine katalytische Domäne für Aminosäure 41 - 337 vorhergesagt (Wahl *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2012). Datenbankenrecherchen (Uniprot) ergaben, dass für mARC1 drei alternative Splice-Varianten vorausgesagt wurden. Als Isoform 1 (Q5VT66-1) wurde das aus 337 Aminosäuren bestehende mARC1 bezeichnet, welches ein Molekulargewicht von 37,5 kDa besitzt und auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Für Isoform 2 (Q5VT66-2) wurde ein Molekulargewicht von 39,5 kDa und für Isoform 3 (Q5VT66-3) ein Molekulargewicht von 28,4 kDa vorhergesagt. Es wäre denkbar, dass es sich bei dem in der löslichen Fraktion nachgewiesenen mARC1 um die Isoform 3 handelte. Im Vergleich zur Isoform 1, fehlten der Isoform 3 die Aminosäuren 1 - 102. Für Isoform 2 und Isoform 3 waren laut Datenbank jedoch keine experimentellen Bestätigungen vorhanden.

Die in der löslichen Fraktion detektierte mARC1-Bande wurde mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Identität als mARC1 konnte nicht bestätigt werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es sich bei dieser Bande nicht um mARC1 handelt. Möglicherweise war die analysierte Probe zu stark mit weiteren Proteinen verunreinigt. Diesbezüglich durchgeführte Aufreinigungsversuche, mittels Ionenaustauschchromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie, waren bisher nicht erfolgreich. Des Weiteren war die Probe porciner Herkunft, in den Datenbanken waren lediglich die Aminosäuresequenzen des humanen mARC1 bekannt. Durch blocken des mARC1-Antikörpers, mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid, konnte gezeigt werden, dass der Antikörper die entsprechende Bande spezifisch als mARC1 erkannte.

### 3.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden humane und porcine hepatische Subfraktionen hinsichtlich der mARC1- und mARC2-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität untersucht. Es konnte auf humaner und porciner Ebene gezeigt werden, dass beide mARC-Proteine, sowie die *N*-reduktive Aktivität in den Mitochondrien lokalisiert waren. Eine Lokalisation von mARC im Cytosol und in den Mikrosomen konnte ausgeschlossen werden.

Des Weiteren konnten mARC1 und mARC2 in der äußeren Membran humaner und porciner Lebermitochondrien detektiert werden. Dies korrelierte mit der *N*-reduktiven Aktivität, welche speziesunabhängig in dieser Fraktion angereichert war. Angemerkt sei, dass die mARC1-Bande in der porcinen OMV-Fraktion bei einem leicht höheren Molekulargewicht detektiert wurde als das humane mARC1.

Für den toxischen Metaboliten Sulfamethoxazolhydroxylamin konnte eine mARC-abhängige *N*-Reduktion zu Sulfamethoxazol durch humane Leberpräparationen gezeigt werden.

Überdies wurde demonstriert, dass die gegen humanes mARC1 und mARC2 gerichteten Antikörper in der Lage waren auch die porcinen mARC-Proteine spezifisch zu erkennen.

Fortführend wurden weitere Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 an porcinen Lebermitochondrien durchgeführt. Dazu wurden die äußere und innere Mitochondrienmembran, die mitochondriale Matrix und der mitochondriale Intermembranraum isoliert und mittels geeigneter Markerenzyme hinsichtlich ihrer Identität und Reinheit charakterisiert. Es konnte mittels Westernblotanalyse gezeigt werden, dass mARC2 ausschließlich ein membranständiges Protein war, während mARC1 zusätzlich im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert war. Das in der löslichen Fraktion detektierte mARC1 wies ein geringeres Molekulargewicht auf, als das mARC1 und mARC2 der äußeren mitochondrialen Membran und entsprach in etwa dem des *N*-trunkierten rekombinanten humanen mARC1. Während gezeigt werden konnte, dass der verwendete Antikörper das mARC1 in der IMS-Fraktion spezifisch erkannte, konnte mittels massenspektrometrischer Analyse die Identität dieses Proteins nicht bestätigt werden. Die *N*-reduktive Aktivität war, korrelierend zu den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der Cytochrom  $b_5$  Reduktase, im Intermembranraum kaum zu detektieren. Durch Zusatz der beiden



Proteine in rekombinanter Form konnte keine Steigerung der *N*-Reduktion herbeigeführt werden.

Eine endgültige Aussage über die Lokalisation von mARC in der inneren mitochondrialen Membranfraktion konnte aufgrund der hohen Crosskontamination mit äußeren Membranfragmenten nicht getätigt werden.

Des Weiteren wurde die mARC1- und mARC2-Expression in humanen und porcinen Lebersubfraktionen mittels quantitativer Westernblotanalyse bestimmt. mARC2 konnte sowohl in porciner, als auch in humaner Leber als die vorherrschende Isoform ermittelt werden.

## 4 mARC-Expression und N-reduktive Aktivität im humanen Vollblut und Blutfraktionen

---

### 4.1 Einleitung und Zielsetzung

Das Blut zählt aus funktioneller Sicht zu den flüssigen Körpergeweben. Es besteht aus den Blutzellen und dem Plasma, einer eiweiß- und elektrolythaltigen Lösung. Neben seinen Transporteigenschaften innerhalb des Organismus besitzt es eine wichtige Abwehrfunktion und dient zur Aufrechterhaltung eines inneren konstanten Milieus (Homöostase). Ein erwachsener Mensch besitzt ein Blutvolumen von 4-6 Litern. Von den zellulären Blutbestandteilen machen die Erythrozyten den Hauptanteil (44 %) aus. Durchschnittlich befinden sich in einem Mikroliter Blut bis zu 5,1 Millionen Erythrozyten. Diese kern- und mitochondrienlosen Blutzellen besitzen einen mittleren Durchmesser von 7,5 µm und weisen eine runde, bikonkave Form auf. Die bedeutsamste Funktion der Erythrozyten stellt der Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid dar, bei dem das enthaltene Hämoglobin eine wichtige Rolle spielt (Thews *et al.*, 1999). Eine weitere Gruppe von Blutzellen sind die Leukozyten, welche sich in Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten unterteilen. Sie erfüllen unterschiedliche Abwehrfunktionen des Organismus. Im Mittel befinden sich in einem Mikroliter Blut 7000 Leukozyten. Den Hauptanteil der Leukozyten machen die Granulozyten aus. Sie unterteilen sich nach der Anfärbbarkeit ihrer Granula in Neutrophile (59 %), Eosinophile (2 %) und Basophile (<1 %). Sie nehmen eine wichtige Rolle bei akuten Entzündungsreaktionen und bei der Abwehr von Mikroorganismen ein. Die Hauptaufgabe der polymorphkernigen Granulozyten liegt in der Phagozytose (Thews *et al.*, 1999). Die Monozyten sind die größten Blutzellen und machen 6 % der Leukozytenzahl aus. Im Vordergrund ihrer Funktion steht ebenfalls die Phagozytose, aber auch die Beteiligung an spezifischen Abwehrvorgängen. Genau wie die Monozyten weisen auch die Lymphozyten eine zentrale Bedeutung in der spezifischen Immunabwehr auf. Sie werden nach ihrer Funktion in B- und T-Lymphozyten unterteilt und nehmen einen Anteil von 30 % der Blutzellen ein. Die Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind die kleinsten Blutzellen. Durch Thrombozytenaggregation, Thrombozytenadhäsion und Freisetzung von

gerinnungsfördernden Faktoren spielen die kernlosen Blutplättchen eine wichtige Rolle bei der Hämostase (Schmidt *et al.*, 2000).

Arzneimittel können auf verschiedene Art und Weise appliziert werden. Eine topische Applikation ist erstrebenswert, wenn die Arzneistoffwirkung auf den Applikationsort beschränkt sein soll und eine Beeinflussung des Gesamtorganismus unerwünscht ist. Wird jedoch eine systemische Wirkung angestrebt muss der Arzneistoff direkt in die Blutbahn injiziert oder in resorbierbarer Form appliziert werden. Die orale Applikation ist dabei die einfachste und die häufigste Verabreichungsform. Dementsprechend besitzt die Resorption im Gastrointestinaltrakt die größte Bedeutung. Da in zahlreichen Wirkstoffklassen Amidin- und Guanidinstrukturen vertreten sind stellt das, in Kap. 1.3.1 erläuterte Prodrug-Prinzip eine Möglichkeit dar, die Resorption solcher Pharmakonmoleküle aus dem Magen-Darm-Trakt, durch *N*-Hydroxylierung in ausreichender Form zu ermöglichen. Im Wesentlichen findet die Resorption nach oraler Verabreichung im oberen Teil des Dünndarms statt, da hier durch Oberflächenvergrößerung eine besonders ausgedehnte resorbierende Fläche vorhanden ist (Mutschler *et al.*, 2008). Die Resorption der meisten Arzneistoffe erfolgt passiv durch Diffusion, aber auch eine Carrier-vermittelte Aufnahme oder aktive Transportvorgänge sind möglich. Nach der Resorption gelangt der Arzneistoff, wie alle anderen aufgenommenen Verbindungen auch, über die Pfortader zur Leber. Der vor und in der ersten Leberpassage metabolisierte Anteil eines Arzneistoffs wird als First-Pass-Effekt bezeichnet (Steinhilber *et al.*, 2010). In Kap. 2.3 konnte am Modellsubstrat Benzamidoxim gezeigt werden, dass die Leber eines der Hauptgewebe war, in dem die *N*-Reduktion und somit die Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs stattfindet. Anschließend erfolgen der Übertritt in den Blutkreislauf und der Transport in andere Kompartimente des Organismus bis hin zum Wirkort.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten humanes Vollblut und die daraus isolierten Blutzellen hinsichtlich der mARC-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität charakterisiert werden. Ziel war es zu ermitteln, ob bereits im Blut die Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs stattfindet und ob diese *N*-Reduktion mit der Expression von mARC korrelierte.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Materialien und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Kap. 7 aufgelistet.

Das Benzamidoxim wurde aus Hydroxylamin und Benzonitril synthetisiert und in üblicherweise charakterisiert (Krüger, 1885).

### 4.2.2 Gewinnung von Blutzellfraktionen und Plasma aus humanem Vollblut

Zur Gewinnung der humanen Blutzellfraktionen wurde EDTA- oder Citrat-Vollblut verwendet. Das Blut stammte von gesunden männlichen und weiblichen freiwilligen Probanden (18 - 30 Jahre) und wurde vor der Isolierung der Blutzellfraktionen stets frisch abgenommen. Isoliert wurden folgende Fraktionen: Plasma, Erythrozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten. Pro Versuch wurde das Blut von jeweils einem Probanden analysiert. Insgesamt wurde Blut von drei verschiedenen Probanden herangezogen.

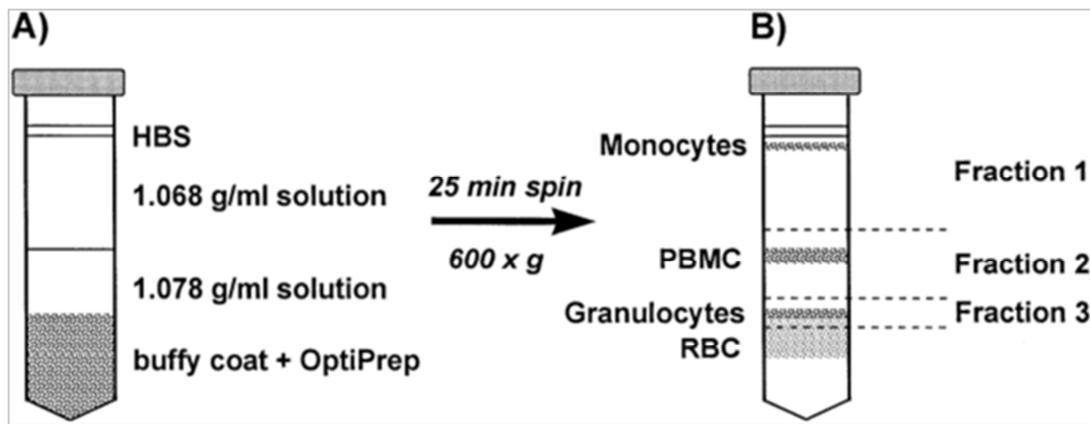
#### 4.2.2.1 Isolierung von Plasma, Erythrozyten und Monozyten

Die Isolierung der Monozyten aus leukozytenreichen Plasma (LRP) erfolgte in Anlehnung an die Methode von Graziani-Bowering *et al.* (1997), mittels Flotation in einem diskontinuierlichen Iodixanolgradienten. Zur Gewinnung des leukozytenreichen Plasmas wurde das frische EDTA-Vollblut zunächst in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und 20 Minuten bei 550 *g* zentrifugiert. Das Plasma und die Erythrozyten wurden vorsichtig abgesaugt und aufbewahrt. Anschließend wurden 10 ml der leukozytenreichen Schicht in ein frisches Falcon überführt und mit 4 ml OptiPrep™ versetzt.

Für die weitere Isolierung wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet: HEPES-buffered saline ((HBS) 0,8 % Natriumchlorid, 10 mM HEPES, pH 7,4), Lösung A (1mM EDTA in HBS), Lösung B (0,5 % BSA in Lösung A), Lösung 1,078 g / ml (1 Teil OptiPrep™ und 3 Teile Lösung B), Lösung 1,068 g / ml (1 Teil OptiPrep™ und 4 Teile Lösung B). Alle Lösungen wurden vor Gebrauch stets frisch hergestellt und sterilfiltriert (Millex®GP Filter Unit 0,22 µm, Millipore, Cork, Irland).

Die Mischung aus LRP und OptiPrep™ wurde mit 7,5 ml Lösung der Dichte 1,078 g / ml, 20 ml Lösung der Dichte 1,068 g / ml und 5 ml HBS vorsichtig überschichtet (Abb. 4.2.1).

Anschließend wurde 25 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Fraktion 1, welche die Monozyten enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert (18 - 20 ml) und in PBS (0,25 % (m/v) BSA) durch fünfminütiges zentrifugieren bei 200 g gewaschen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Pro Gewinnung wurden 50 ml EDTA-Vollblut verwendet.

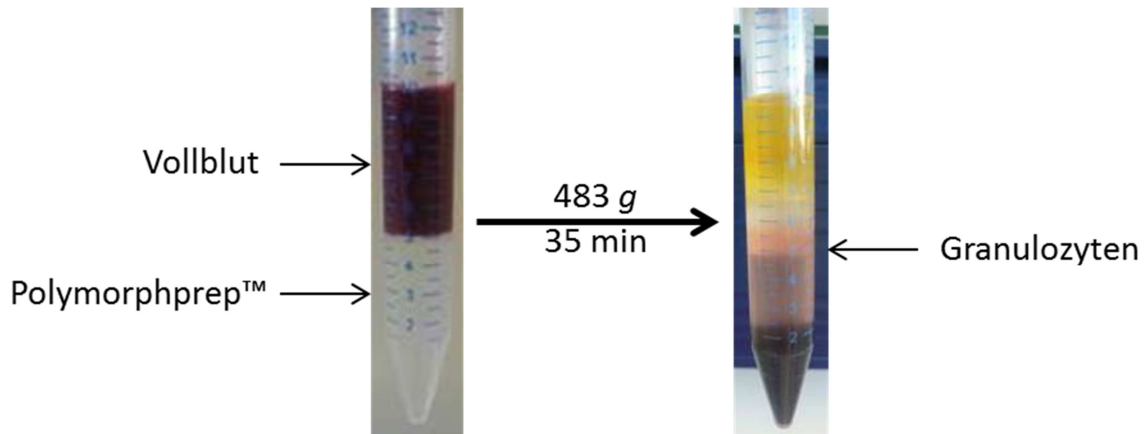


**Abb. 4.2.1 Isolierung von Monozyten aus leukozytenreichen Plasma (Graziani-Bowering et al., 1997)**

*HBS = HEPES-buffered saline, PBMC = peripheral blood mononuclear cell, RBC = red blood cell, buffy coat = leucocyte rich plasma*

#### 4.2.2.2 Isolierung von Granulozyten aus humanem Vollblut

Die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut erfolgte in Anlehnung an die Methode von Böyum (1968). Dazu wurden zunächst 5 ml Vollblut auf 5 ml Polymorphprep™ geschichtet und 35 Minuten bei 483 g zentrifugiert (Abb. 4.2.2). Die erhaltene Granulozytenbande wurde vorsichtig mit einer langen Pasteurpipette abpipettiert und in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Es folgten zwei zehnminütige Waschschrte in PBS (0,25 % (m/v) BSA) bei 425 g. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Pro Gewinnung wurden 80 ml Citrat-Vollblut verwendet.



**Abb. 4.2.2 Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut (eigene Quelle)**

## 4.2.3 Charakterisierung des humanen Vollbluts und der Blutfraktionen

### 4.2.3.1 Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Vitalität der Blutzellen erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer unter Verwendung einer 0,4 %igen (m/v) Trypanblaulösung.

### 4.2.3.2 Bestimmung der N-reduktiven Aktivität

Die N-reduktive Aktivität in den porcinen Gewebemogenaten wurde anhand der Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim zum korrespondierenden Amidin bestimmt.

#### 4.2.3.2.1 *In vitro* Inkubationsansatz

Die Inkubation wurde in einer Platte mit 24 Reaktionsgefäßen bei 37 °C, unter aeroben Bedingungen in einem Schüttelinkubator durchgeführt. Das Volumen des Inkubationsansatzes betrug 500 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 5 mM Benzamidoxim in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) mit 10 mM HEPES (pH 7,4). Zu den 500 µl wurde das jeweilige Volumen (20 - 70 µl) der Proteinprobe hinzugegeben, welches 0,05 mg - 0,43 mg Protein enthielt. Nach einer Vorinkubation von 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe der entsprechenden Proteinproben gestartet. Die Reaktion wurde nach 2 Stunden durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Methanol gestoppt. Die Ansätze wurden in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 10 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde das Protein 5

Minuten bei 11.000 *g* abzentrifugiert. Gebildetes Benzamidin wurde mittels der beschriebenen HPLC-Analytik (Kap. 4.2.3.3) im Überstand vermessen. Jeder Inkubationsansatz wurde doppelt angesetzt und jeweils zweifach vermessen. Zusätzlich wurden zur Kontrolle zwei Inkubationsansätze ohne Protein vermessen, sowie 2  $\mu$ M Benzamidinlösung zur Überprüfung der Kalibrierfunktion.

#### **4.2.3.2.2 Zeitabhängigkeit**

Eine Zeitabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch humanes Vollblut wurde nach der in Kap. 4.2.3.2.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Inkubationszeiten der Probe betragen 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten. Eingesetzt wurden 10  $\mu$ l Vollblut.

#### **4.2.3.3 HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Benzamidin**

Die Quantifizierung des gebildeten Benzamidins erfolgte nach der im Arbeitskreis etablierten Methode von Clement *et al.* (2005), mit dem in Kap. 2.2.3.5 beschriebenen System.

#### **4.2.3.4 Proteingehaltsbestimmung**

Zur Bestimmung der Proteingehälter wurde die BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985), unter Verwendung des BCA Assay Kits von Pierce (Rockford, USA) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben.

#### **4.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach der im Kap. 2.2.3.2 beschriebenen diskontinuierlichen Methode durchgeführt (Laemmli, 1970).

#### **4.2.3.6 Westernblot**

Die Westernblotanalyse wurde nach der in Kap. 2.2.3.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die eingesetzten Primärantikörper und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper sind im Kap. 7.1 aufgeführt.

#### 4.2.3.7 Blocking-Experiment

Um zu ermitteln ob bestimmte in der Westernblotanalyse detektierte Banden spezifisch vom verwendeten Primärantikörper erkannt wurden, erfolgte die Durchführung eines Blocking-Experimentes. Die spezifische Bindungsstelle des Antikörpers wurde dazu mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid geblockt, sodass der Antikörper nicht mehr in der Lage war, spezifische Banden zu erkennen. Das Blocking-Experiment wurde wie in Kap. 3.2.3.6 durchgeführt. Im Anschluss wurde wie in Kap. 4.2.3.6 beschrieben verfahren.

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 mARC1- und mARC2-Expression im humanen Vollblut und Blutfraktionen

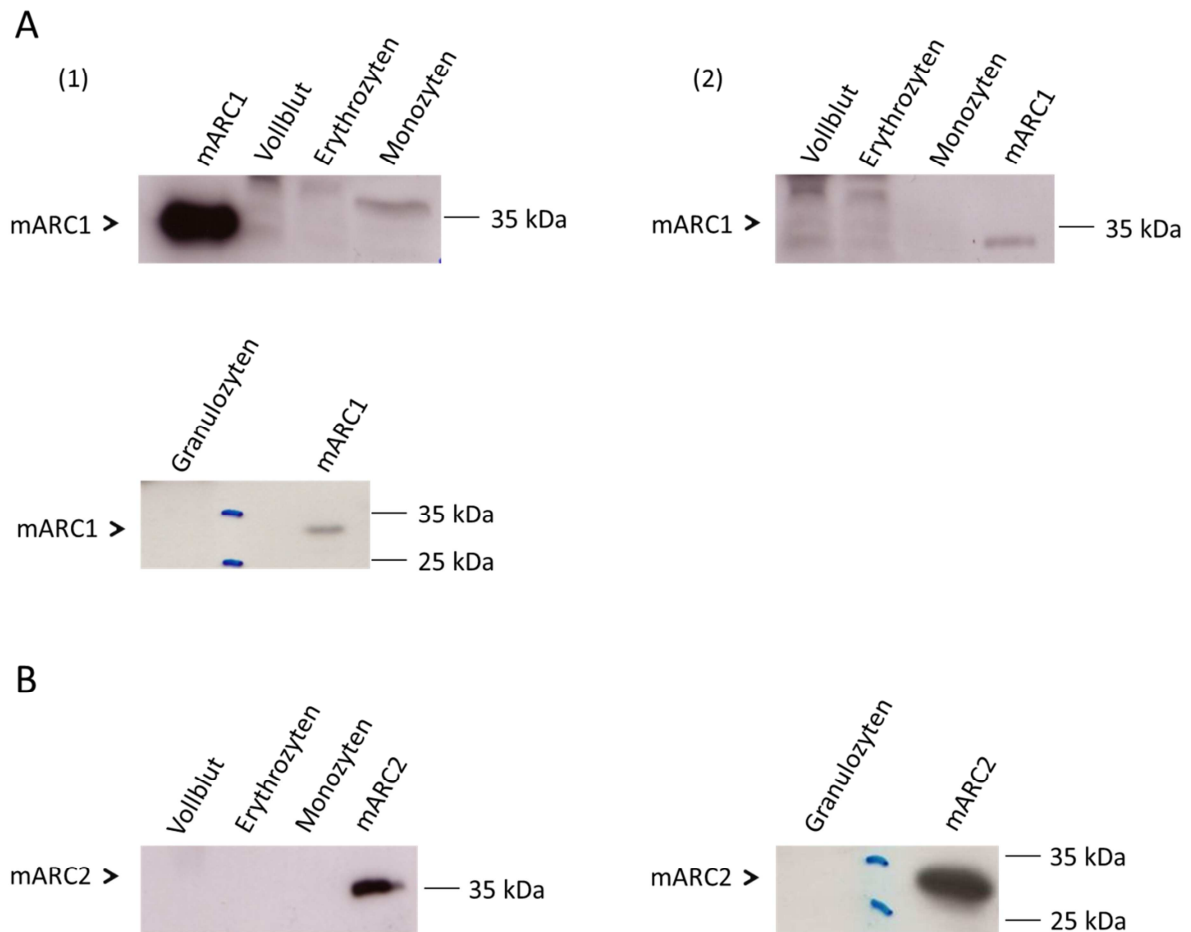
Abb. 4.3.1 (A) zeigte, dass in den Monozyten mittels Westernblotanalyse mARC1 detektiert werden konnte. Im humanen Vollblut, in der Erythrozytenfraktion und in der Granulozytenfraktion konnte kein mARC1 nachgewiesen werden.

Um zu bestätigen, dass die in der Monozytenfraktion detektierte Bande spezifisch vom mARC1-Antikörper erkannt wurde, erfolgte die Durchführung eines Blocking-Experimentes. Auf der Kontrollmembran (1) in Abb. 4.3.1 (A) konnten das rekombinante mARC1 und die Bande in den Monozyten deutlich detektiert werden. Blocking-Membran (2) wurde mit dem Antikörper inkubiert, dessen spezifische Bindungsstelle mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid geblockt war. Im Gegensatz zur Membran (1) war in der Monozytenfraktion auf Membran (2) keine Banden mehr detektierbar und das rekombinante humane mARC1 nur noch in deutlich abgeschwächter Intensität vorhanden. Der mARC1-Antikörper erkannte die entsprechende Bande in den Monozyten somit spezifisch als mARC1.

Im Vollblut und den analysierten Blutfraktionen konnte mARC2 mittels Westernblotanalyse nicht detektiert werden (Abb. 4.3.1, B). Als Kontrolle wurde rekombinantes humanes mARC2 aufgetragen.

Im Blutplasma konnte kein mARC1 und mARC2 detektiert werden. Die entsprechenden Westernblots werden hier nicht aufgeführt.





**Abb. 4.3.1** Westernblotanalyse zur mARC1- und mARC2-Expression im humanen Vollblut und in den Blutzellfraktionen

Die Westernblotanalyse erfolgte, wie in Kap. 4.2.3.6 aufgeführt und das Blocking-Experiment nach der in Kap. 4.2.3.7 beschriebenen Methode. Pro Bahn wurden 80  $\mu\text{g}$  humanes Protein und 0,05  $\mu\text{g}$  rekombinantes humanes mARC1 bzw. 0,05  $\mu\text{g}$  rekombinantes humanes mARC2 aufgetragen. Für die Immunodetektion wurde folgender Primärantikörper eingesetzt: Anti-mARC1 (1:1.000), anti-mARC2 (1:500).

(A) mARC1-Expression: (1) Kontrollmembran, (2) Blocking-Membran: Spezifische Antikörperbindungsstelle wurde mit dem entsprechenden Peptid geblockt.

(B) mARC2-Expression

#### 4.3.2 N-reduktive Aktivität im humanen Vollblut und in den Blutzellfraktionen

Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch humanes Vollblut, gemessen über die Zeit, zeigte keinen linearen Verlauf. Das gebildete Benzamidin betrug, abzüglich des

Kontrollansatzes ohne Protein, konstant 0,5  $\mu\text{M}$ . Es handelte sich hierbei um keine enzymatische Reaktion.

Die in den neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten und im Plasma ermittelten Benzamidinkonzentrationen lagen unter der Bestimmungsgrenze (0,5  $\mu\text{M}$ ).

Verfahren wurde wie in Kap. 4.2.3.2 beschrieben.

## 4.4 Diskussion

In den vorangegangenen Kapiteln wurden bereits die *N*-reduktive Aktivität und die mARC-Expression in verschiedenen porcinen Geweben und humanen Leberpräparationen beschrieben. Da das Blut ein wichtiges Transportmedium für zahlreiche Nährstoffe, Arzneistoffe und deren Prodrugs zu den Organen und Geweben darstellt, wurden in dieser Arbeit Studien zur Expression von mARC und der *N*-reduktiven Aktivität an humanen Vollblut und Blutzellfraktionen durchgeführt. Die mARC-Expression wurde mittels Westernblotanalyse untersucht und die *N*-reduktive Aktivität am Modellsubstrat Benzamidoxim bestimmt. Charakterisiert wurden humanes Vollblut, Blutplasma, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten.

In der Leukozytenfraktion wurde bereits eine hohe mRNA-Expression für mARC1 beschrieben (mündliche Übermittlung von Afshan Malik, King's College, London). Des Weiteren zeigte das in den Datenbanken aufgeführte mRNA-Expressionsprofil von mARC1 hohe mRNA-Level in Monozyten (Expressionsdaten siehe Kap. 6.3). Korrelierend dazu konnte in dieser Arbeit mARC1 auf Proteinebene in den Monozyten detektiert werden. Die mARC1-Bande besaß ein ähnliches Molekulargewicht wie das in der äußeren Membran humaner Lebermitochondrien detektierte mARC1, sodass es sich hierbei möglicherweise um eine membranständige Form handelte. Als membranständige Form wäre eine Lokalisation in der äußeren mitochondrialen Membran oder gegebenenfalls auf der Monozytenoberfläche denkbar. Es ist bereits bekannt, dass hämatopoetische Stammzellen, welche zu weißen Blutzellen reifen, mARC1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abrignani *et al.*, 2010). In den Arbeiten von Schwering (2010) wurde ein Signal für mARC1 sowohl in der Monozytenmembranfraktion als auch in der löslichen Fraktion detektiert.

Da Monozyten unter anderem an spezifischen Abwehrfunktionen involviert sind, ist eine mögliche Beteiligung von mARC1 am Immunsystem durchaus denkbar.

Neutrophile Granulozyten weisen laut Datenbank vergleichsweise hohe mRNA-Daten für mARC1 auf (Expressionsdaten siehe Kap. 6.3). Des Weiteren wird mARC1 mit der Autoimmunerkrankung *Lupus erythematoses* in Verbindung gebracht. Um Gene zu identifizieren, welche mit systemischen *Lupus erythematoses* assoziieren, wurden Genexpressionsprofile neutrophiler Granulozyten von Patienten mit bekannten Nierenerkrankungen, mit denen gesunder Patienten verglichen. 130 Gene zeigten eine veränderte Expression, unter anderem auch mARC1 (Behrens *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch in den neutrophilen Granulozyten, wie auch in den übrigen untersuchten Fraktionen kein mARC1 auf Proteinebene nachgewiesen werden.

mARC2 wurde in dieser Arbeit in keiner der untersuchten humanen Blutfraktionen detektiert. Dies korrelierte mit der Tatsache, dass im peripheren humanen Blut keine mRNA-Expression von mARC2 belegt werden konnte (Shahni, 2011). Demnach war zu vermuten, dass mARC2 im humanen Blut nicht nachweisbar exprimiert wurde und eher eine zell- und gewebespezifische Funktion aufweist. Eine deutliche mARC2-Expression in verschiedenen Geweben und Organen konnte an porcinen Proben bereits in Kap. 2 demonstriert werden. Auch das in den Datenbanken hinterlegte mRNA-Expressionsprofil für mARC2 zeigte im Vergleich zu den mRNA-Daten von mARC1 äußerst geringe Werte im Vollblut und verschiedenen Blutzellen auf (Expressionsdaten siehe Kap. 6.3).

Aufgrund ihrer starken Basizität liegen Arzneistoffe, welche Amidin- und Guanidinstrukturen enthalten, unter physiologischen Bedingungen protoniert vor und werden daher im Gastrointestinaltrakt nicht resorbiert. Durch Bildung N-hydroxylierter Derivate konnten diese Arzneistoffe oral verfügbar gemacht werden. In Tierstudien wurde beobachtet, dass nach oraler Gabe solcher Prodrugs diese bereits im Blut in N-reduzierter Form vorlagen. In dieser Arbeit wurden Studien zur N-reduktiven Aktivität am Modellsubstrat Benzamidoxim durchgeführt, um zu ermitteln ob eine mögliche N-Reduktion im Blut stattfindet.

In *in vitro* Inkubationsansätzen konnte im humanen Vollblut Benzamidin detektiert werden. Die bestimmte Zeitabhängigkeit folgte jedoch keiner linearen Reaktion, sodass es sich

vermutlich um keine enzymatische Umsetzung handelte. In den isolierten Blutzellen und dem Plasma konnte ebenfalls keine *N*-reduktive Aktivität nachgewiesen werden.

Erythrozyten sind Blutzellen, welche weder einen Zellkern noch Mitochondrien besitzen. Da das *N*-reduktive Enzymsystem eine mitochondriale Lokalisation aufweist, wurde erwartungsgemäß keine *N*-reduktive Aktivität detektiert. Erythrozyten beinhalten zwar eine lösliche Form des Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase, mARC konnte jedoch nicht detektiert werden (Giordano und Steggle, 1991; Bando *et al.* 2004).

In der neutrophilen Granulozytenfraktion konnte ebenfalls keine *N*-Reduktion und keine mARC-Expression nachgewiesen werden. Problematisch bei neutrophilen Granulozyten ist, dass sie lediglich eine kurze Lebensdauer besitzen und innerhalb von zwei bis vier Stunden nach Blutentnahme verwendet werden sollten. Des Weiteren sind sie sehr empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen, sodass mit ihnen vorsichtig, ohne große Erschütterungen und bei konstanten Temperaturen gearbeitet werden sollte, um eine Aktivierung oder den Zelltod zu vermeiden (Oh *et al.*, 2008).

In den Arbeiten von Schwering (2010) wurden  $V_{\max}$ -Werte von 4,5 (nmol Benzamidin  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$  mg Protein<sup>-1</sup>) in den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und 2,3 (nmol Benzamidin  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$  mg Protein<sup>-1</sup>) in den Erythrozyten bestimmt. Diese ermittelten Daten waren jedoch nur schwer reproduzierbar (mündliche Mitteilung von Schwering). Hinsichtlich der mARC-Expression konnte unter Anwendung der Westernblotanalyse in den Monozyten ein Signal für mARC1 und mARC2, bei jedoch nicht vorhandener *N*-reduktiver Aktivität erhalten werden. In den Erythrozyten konnte eine Expression von mARC2 nachgewiesen werden, dies korrelierte mit der *N*-reduktiven Aktivität. In den polymorphkernigen Granulozyten wurde trotz deutlicher *N*-Reduktion keines der beiden mARC-Proteine detektiert.

Eine mögliche Ursache für die, im Vergleich zu dieser Arbeit, unterschiedlichen Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf die *N*-reduktive Aktivität, könnte die geringe Anzahl an Probanden gewesen sein. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten müsste eine größere Studie angesetzt werden.

In dieser Arbeit konnte im humanen Vollblut und den charakterisierten Blutzellfraktionen keine *N*-reduktive Aktivität detektiert werden. Die geringen Konzentrationen Benzamidin, welche im humanen Vollblut nachgewiesen wurden, waren vermutlich auf eine nicht-enzymatische Reaktion zurückzuführen.

Bezüglich der Tierstudien wäre es denkbar, dass ein Teil der nach oraler Verabreichung *in vivo* detektierten aktivierten Prodrugs im Blut durch eine nicht-enzymatische *N*-Reduktion bedingt war. In dieser Arbeit und in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem die Leber, aber auch der Darm hohe *N*-reduktive Aktivitäten aufwies (Clement *et al.*, 2005; Krischkowski, 2010; Krompholz *et al.*, 2012). Somit ist es wahrscheinlicher, dass ein Großteil, der im Blut detektierten *N*-reduzierten Prodrugs im Rahmen des First-Pass-Effekts aktiviert wurde. Eine Untersuchung des Pfortaderbluts könnte zumindest für den im Darm metabolisierten Anteil aufschlussreich sein.

## 4.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden humanes Vollblut, Monozyten, Erythrozyten, neutrophile Granulozyten und Blutplasma hinsichtlich der *N*-reduktiven Aktivität und der Expression von mARC1 und mARC2 charakterisiert. Dabei erfolgte die Bestimmung der *N*-Reduktion anhand des Modellsubstrats Benzamidoxim und die Analyse der mARC-Expression mittels Westernblot.

mARC2 konnte in keiner der untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden. mARC1 hingegen wurde in der Monozytenfraktion detektiert. *N*-reduktive Aktivität war in keiner der Fraktionen vorhanden. Das in geringen Mengen im Vollblut detektierte Benzamidin war höchstwahrscheinlich auf eine nicht-enzymatische Reaktion zurückzuführen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

---

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte in Säugetieren bekannte Molybdoenzym. Alle bisher analysierten Säugetiergenome beinhalten zwei mARC-Gene (mARC1 und mARC2). mARC2 wurde 2006 als dritte, bis dahin unbekannte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems aus der äußeren Membran porciner Lebermitochondrien gereinigt und identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006). Dieses Dreikomponentenenzymssystem setzt sich neben mARC aus den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase zusammen und ist in der Lage zahlreiche *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren. In vorangegangenen Biotransformationsstudien konnte dies für Verbindungen wie Amidoxime, Hydroxylamine, Sulfhydroxamsäuren, *N*-hydroxylierte Guanidine und Amidinohydrazone, Oxime und *N*-Oxide gezeigt werden (Grünwald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010; Frieriep *et al.*, 2013; Jakobs *et al.*, 2014). Diese Biotransformationsstudien wurden im rekonstituierten System mit rekombinanten und gereinigten Proteinen oder an zellulären Subfraktionen durchgeführt. Die *N*-Reduktion spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs, bei der Detoxifizierung mutagener Basenanaloga und weiterer, durch das P450-System im Körper gebildeter *N*-oxygenierter Metabolite (Grünwald *et al.*, 2008; Havemeyer *et al.*, 2010; Havemeyer *et al.*, 2011; Krompholz *et al.*, 2012). Neben der Detoxifizierung sind weitere physiologische Funktionen der mARC-Proteine unbekannt, allerdings gibt es bereits zahlreiche Hinweise. Es wird postuliert, dass eine mögliche Verbindung zwischen mARC2 und *Diabetes mellitus* existiert (Malik *et al.*, 2007). In Betracht gezogen wird außerdem die Beteiligung von mARC an der Lipidsynthese. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von mARC2 eine Verminderung der Lipidsynthese zur Folge hatte (Neve *et al.*, 2012). In den Arbeiten von Jakobs *et al.* (2014) konnte ebenfalls ein Bezug zwischen mARC und dem Fettstoffwechsel nachgewiesen werden. Die mARC-Proteine scheinen demnach in gewisser Hinsicht im Energiestoffwechsel involviert zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Proteinebene anhand hepatischer und extrahepatischer porciner mitochondrialer Fraktionen und Gewebehomogenate, unter Verwendung

spezifischer Antikörper ein Expressionsprofil für mARC1 und mARC2 erstellt. Die Mitochondrien und Homogenate folgender Gewebe wurden charakterisiert: Leber, Gehirn, Niere, Herz Schilddrüse, Lunge, Dünndarm und Pankreas. Zusätzlich wurden die Gewebekomponenten der Milz, der Nebenniere, des Fettgewebes, der Haut, der Lymphknoten und der Harnblase analysiert. In allen untersuchten Gewebepreparationen konnte *N*-reduktive Aktivität gemessen und, mit Ausnahme der Lymphknoten, mindestens eines der beiden mARC-Proteine detektiert werden.

In den mitochondrialen Fraktionen und in den Gewebekomponenten wurde die höchste mARC1-Expression im Herzen und im Pankreas ermittelt. Die höchsten Expressionslevel für mARC2 konnten in der Leber, der Niere, dem Pankreas und der Schilddrüse nachgewiesen werden. Die Gewebeverteilung von mARC1 und mARC2 korrelierte, mit Ausnahme des Fettgewebes, weitestgehend mit der in Datenbanken aufgeführten mRNA-Expression.

Des Weiteren konnten in den Mitochondrienfraktionen, in denen mARC2 am stärksten exprimiert wurde, auch die deutlichsten Umsatzraten ermittelt werden. Die höchsten *N*-reduktiven Aktivitäten wurden dementsprechend in der Leber, der Niere, der Schilddrüse und dem Pankreas gemessen. In den charakterisierten Gewebekomponenten konnte diesbezüglich, mit Ausnahme der Schilddrüse, die Korrelation zwischen der mARC2-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität bestätigt werden. Eine Korrelation zwischen dem Mitochondrienaufkommen und der mARC-Expression konnte in den Gewebekomponenten hingegen nicht aufgezeigt werden.

Bezüglich des Schilddrüsenhomogenats wurde die höchste mARC2-Expression bei jedoch geringer *N*-reduktiver Aktivität detektiert. Die beiden Elektronentransportproteine Cytochrom  $b_5$  und die NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase, welche Bestandteile des mARC-abhängigen *N*-reduktiven Dreikomponentenzystems sind, konnten mittels Westernblotanalyse nicht detektiert werden. Es ist daher denkbar, dass die Schilddrüse ein Organ ist in welchem mARC eine andere gewebespezifische Funktion als die *N*-Reduktion aufweist. In weiterführenden Experimenten sollten fluoreszenzmikroskopische Studien zur Lokalisation von mARC2 in der Schilddrüse durchgeführt werden. Dadurch kann beispielsweise gezeigt werden, ob mARC2 möglicherweise hauptsächlich eine peroxisomale Lokalisation aufweist. Des Weiteren ist es denkbar, dass mARC2 in der extrazellulären Matrix angereichert ist. Diese sollte daher ebenfalls isoliert und charakterisiert werden.

Es konnte durch eine umfassende Gewebeauswahl gezeigt werden, dass das mARC-abhängige *N*-reduktive Enzymsystem nicht nur für den hepatischen, sondern auch für den extrahepatischen Arzneistoffmetabolismus von Bedeutung ist. Dies unterstreicht die im Arbeitskreis vorangegangenen Studien zur extrahepatischen Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen (Clement *et al.*, 2005; Krischkowski, 2010; Krompholz *et al.*, 2012; Froriep *et al.*, 2013; Jakobs *et al.*, 2014). Fortführend sollte die Reduktion der *N*-hydroxylierten Prodrugs, welche bisher im rekombinanten rekonstituierten Enzymsystem und anhand mitochondrialer Fraktionen untersucht wurde, auch in den extrahepatischen Gewebekomponenten charakterisiert werden. Dies ist sinnvoll, da die Gewebekomponenten im Gegensatz zu den mitochondrialen Fraktionen die Gesamtheit aller Enzyme des entsprechenden Gewebes enthalten. Dadurch kann beispielsweise das Ausmaß der Aktivierung von Prodrugs in bestimmten Geweben genauer beurteilt werden.

Insgesamt korrelierte die Gewebeverteilung der mARC-Proteine mit den bisher postulierten möglichen physiologischen Funktionen. Die genauen Aufgaben und regulatorischen Abläufe sind bisher nicht bekannt und sollten Gegenstand weiterer Forschung sein.

In dieser Arbeit wurden des Weiteren humane und porcine hepatische Subfraktionen hinsichtlich der mARC1- und mARC2-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität untersucht. Es konnte auf humaner und porciner Ebene gezeigt werden, dass beide mARC-Proteine, sowie die *N*-reduktive Aktivität in den Mitochondrien lokalisiert waren. Eine Lokalisation von mARC im Cytosol und in den Mikrosomen konnte ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus konnten mARC1 und mARC2 in der äußeren Membran humaner und porciner Lebermitochondrien detektiert werden. Dies korrelierte mit der *N*-reduktiven Aktivität, welche speziesunabhängig in dieser Fraktion angereichert war. Angemerkt sei, dass die mARC1-Bande in der porcinen OMV-Fraktion bei einem leicht höheren Molekulargewicht detektiert wurde als das humane mARC1.

Überdies wurde demonstriert, dass die gegen humanes mARC1 und mARC2 gerichteten Antikörper in der Lage waren auch die porcinen mARC-Proteine spezifisch zu erkennen.



In der Vergangenheit haben sich verschiedene Arbeitskreise mit der submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 beschäftigt. In den vorangegangenen Studien detektierten Da Cruz *et al.* (2003) beide, zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes mARC-Proteine in der inneren Membran von Mauslebermitochondrien. Das Vorkommen von mARC2 in der inneren Mitochondrienmembran konnte in den von Neve *et al.* (2012) durchgeführten Untersuchungen an Rattenlebermitochondrien nicht bestätigt werden. Gezeigt werden konnten die Lokalisation von mARC2 in der äußeren Mitochondrienmembran und die damit verbundene Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität. Klein *et al.* (2012) führten Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 an humanen Zelllinien durch. Betrachtet wurden die löslichen mitochondrialen Subkompartimente und die Mitochondrienmembranen. mARC1 wurde hier ausschließlich in der äußeren mitochondrialen Membran detektiert. Obwohl alle bisher analysierten Säugetiergenome für zwei mARC-Enzyme codieren, waren die durchgeführten Studien zur Lokalisation von mARC1 und mARC2 in den jeweiligen Spezies meist nur auf eines der beiden Proteine bezogen. Es ist denkbar, dass speziesabhängig immer eine Isoform dominant vertreten war.

In dieser Arbeit wurden weitere Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC1 und mARC2 an porcinen Lebermitochondrien durchgeführt. Dazu wurden die äußere und innere Mitochondrienmembran, die mitochondriale Matrix und der mitochondriale Intermembranraum durch Differential- und Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Bestimmung der Identität und Reinheit der gewonnenen Fraktionen erfolgte mittels geeigneter Markerenzyme. Durch Westernblotanalyse konnte gezeigt werden, dass mARC2 ausschließlich ein membranständiges Protein war, während mARC1 zusätzlich im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert war. Das in der löslichen Fraktion detektierte mARC1 wies ein geringeres Molekulargewicht auf als das mARC1 in der äußeren mitochondrialen Membran und entsprach in etwa dem des *N*-trunkierten rekombinanten humanen mARC1. Während gezeigt wurde, dass der verwendete Antikörper das mARC1 in der IMS-Fraktion spezifisch erkannte, konnte mittels massenspektrometrischer Analyse die Identität dieses Proteins nicht bestätigt werden. Die *N*-reduktive Aktivität war korrelierend zu den beiden Elektronentransportproteinen Cytochrom  $b_5$  und der Cytochrom  $b_5$  Reduktase

im Intermembranraum kaum zu detektieren. Durch Zusatz der beiden Proteine in rekombinanter Form konnte keine Steigerung der *N*-Reduktion herbeigeführt werden.

Eine endgültige Aussage über die Lokalisation von mARC in der inneren mitochondrialen Membranfraktion konnte in dieser Arbeit aufgrund der hohen Crosskontamination mit äußeren Membranfragmenten nicht getätigt werden.

Um zu ermitteln, ob es sich bei dem im mitochondrialen Intermembranraum detektierten Protein um eine lösliche Form von mARC1 handelte, sollten in folgenden Studien die Aufreinigungsversuche dieses Proteins ausgebaut werden. Das gereinigte Protein sollte anschließend einer erneuten massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden. Des Weiteren sollte die Isolierung der IMM-Fraktion optimiert, anhand reinerer Fraktionen wiederholt und hinsichtlich der mARC-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität untersucht werden.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die mARC1- und mARC2-Expression in humanen und porcinen Lebersubfraktionen mittels quantitativer Westernblotanalyse bestimmt. Zur Kalibrierung wurden rekombinantes humanes mARC1 und mARC2 verwendet. mARC2 konnte sowohl in porciner als auch in humaner Leber als die vorherrschende Isoform ermittelt werden.

Sulfamethoxazol wird in Kombination mit Trimethoprim unter anderem bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen eingesetzt. Das im Körper durch Oxidationsreaktionen gebildete Sulfamethoxazolhydroxylamin stellt einen toxischen Metaboliten des Sulfamethoxazols dar. Ott *et al.* (2014) demonstrierten im rekombinanten rekonstituierten Enzymsystem und anhand porciner Subfraktionen, dass das mARC-Enzymsystem in der Lage war, Sulfamethoxazolhydroxylamin zu detoxifizieren. In dieser Arbeit konnte ergänzend gezeigt werden, dass Sulfamethoxazolhydroxylamin ebenfalls durch humane Lebersubfraktionen zu Sulfamethoxazol reduziert wird. Die humane Leber ist somit an der Entgiftung dieses toxischen Metaboliten beteiligt. Die Umsetzungsraten waren in der äußeren mitochondrialen Membran angereichert. Dies stand im Einklang mit der Lokalisation des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems.

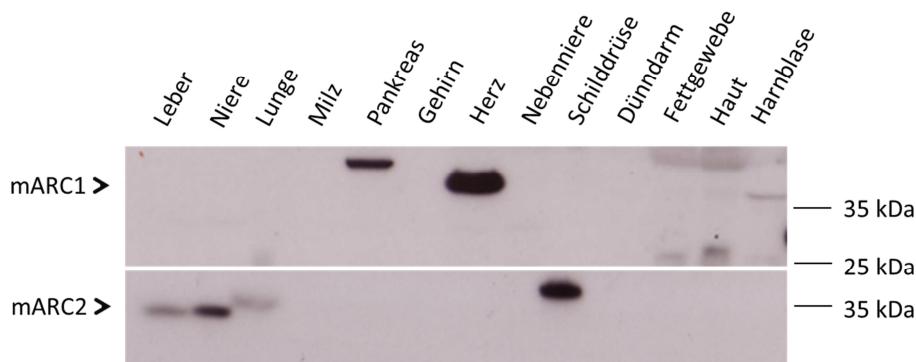
Neben der humanen Leber wurden in dieser Arbeit auch humanes Vollblut und Blutfraktionen bezüglich der mARC-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität charakterisiert. Ziel war es zu ermitteln, ob bereits im Blut die Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs stattfindet und ob diese *N*-Reduktion mit der Expression von mARC korreliert. Aus humanem Vollblut wurden mittels Zentrifugationsverfahren Monozyten, neutrophile Granulozyten, Erythrozyten und Blutplasma isoliert. Die Westernblotanalyse ergab, dass mARC1 in den Monozyten lokalisiert war. mARC2 konnte, ebenso wie die *N*-reduktive Aktivität, in keiner der untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden. Das in geringen Mengen im Vollblut detektierte Benzamidin war höchstwahrscheinlich auf eine nicht-enzymatische Reaktion zurückzuführen.

In den im Arbeitskreis erfolgten *in vivo* Tierstudien lag nach oraler Gabe bereits nach kurzer Zeit ein Großteil der im Blut detektierten Prodrugs in aktivierter Form vor. Da im Blut keine nachweisbare *N*-reduktive Aktivität detektiert wurde, könnte eine Untersuchung des Pfortaderbluts durchgeführt werden. Dies würde zumindestens für den, im Rahmen des First-Pass-Effekts, im Darm aktivierten Anteil der Prodrugs aufschlussreich sein.

## 6 Anhang

### 6.1 mARC-Expression und *N*-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen Geweben

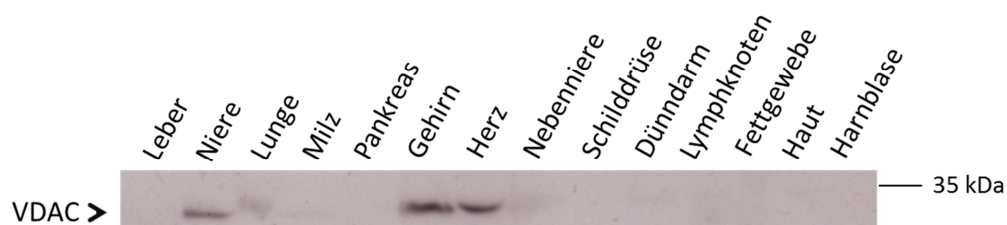
#### 6.1.1 mARC-Expression



**Abb. 6.1.1 Westernblotanalyse Charge 2: mARC1- und mARC2-Expression in porcinen Gewebekomogenaten**

Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 35  $\mu$ g porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Anti-mARC1 (1:1.000) und anti-mARC2 (1:10.000).

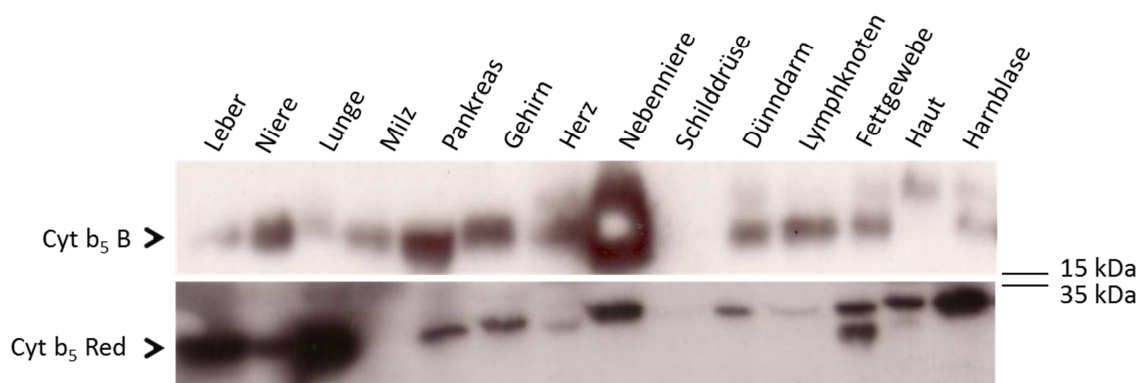
#### 6.1.2 VDAC-Expression



**Abb. 6.1.2 VDAC-Expression in porcinen Gewebekomogenaten: Charge 2**

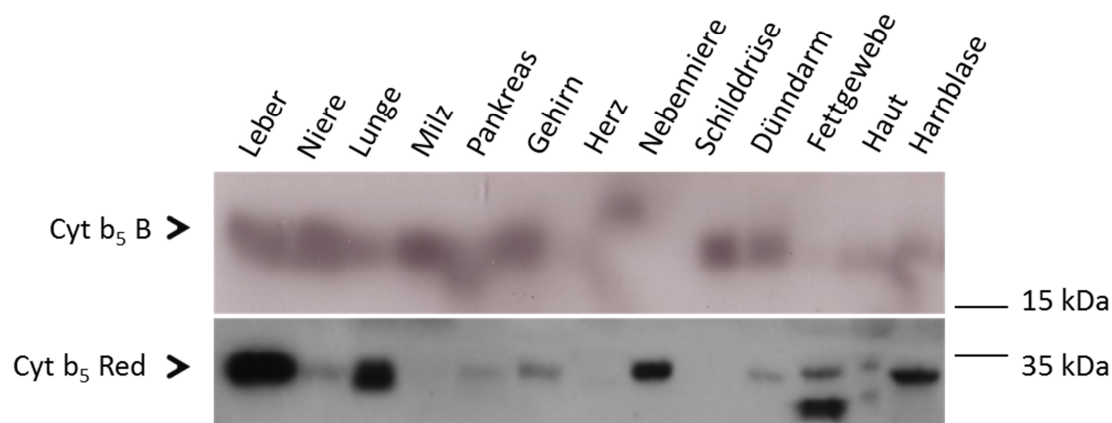
Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 35  $\mu$ g porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurde folgender Primärantikörper eingesetzt: Anti-VDAC (1:1.000).

### 6.1.3 Westernblotanalyse Cytochrom $b_5$ und Cytochrom $b_5$ Reduktase



**Abb. 6.1.3 Westernblotanalyse Charge 1: Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$  Reduktase in porcinen Gewebekomogenaten**

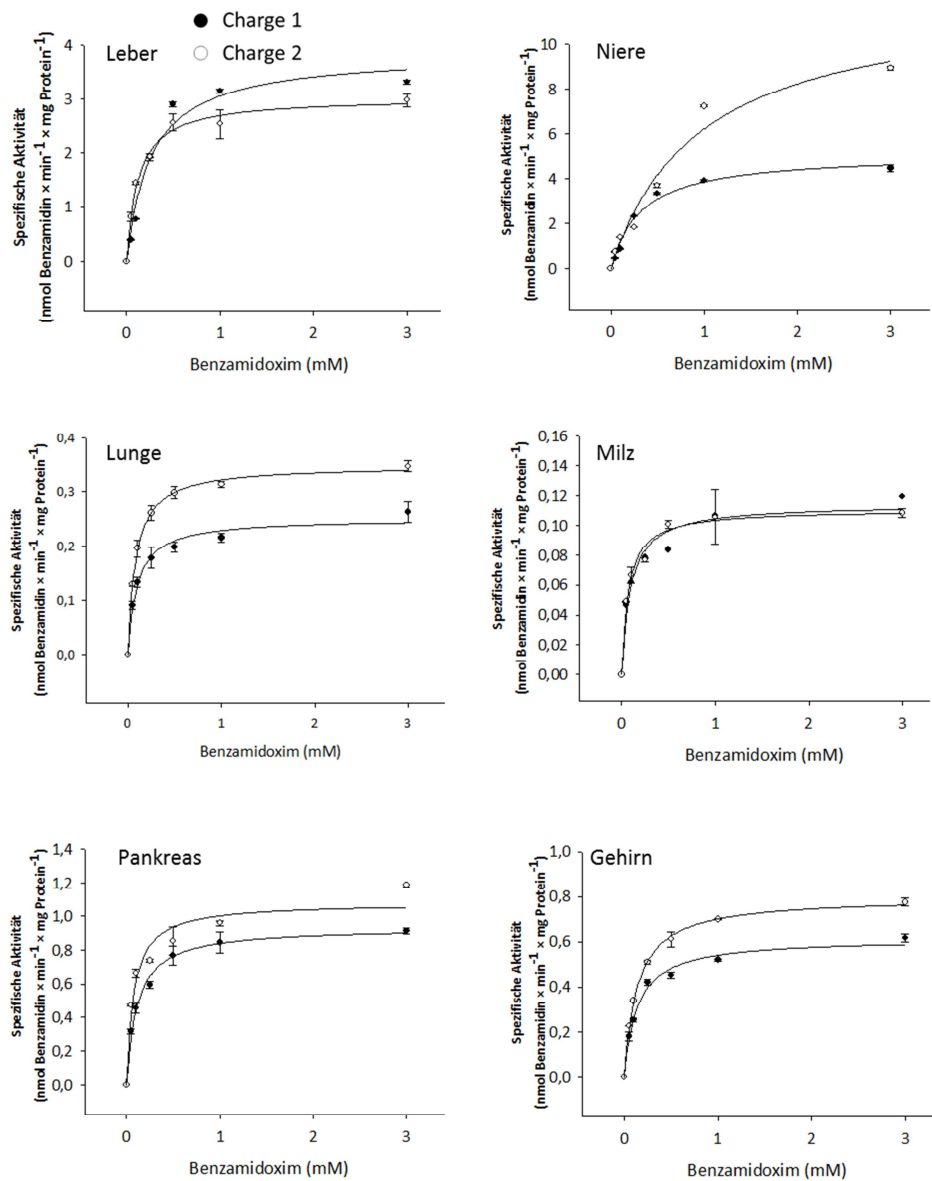
Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 35  $\mu$ g porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Anti-Cyt  $b_5$  B (1:1.000) und anti-Cyt  $b_5$  Red (1:1.000).



**Abb. 6.1.4 Westernblotanalyse Charge 2: Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $b_5$  Reduktase in porcinen Gewebekomogenaten**

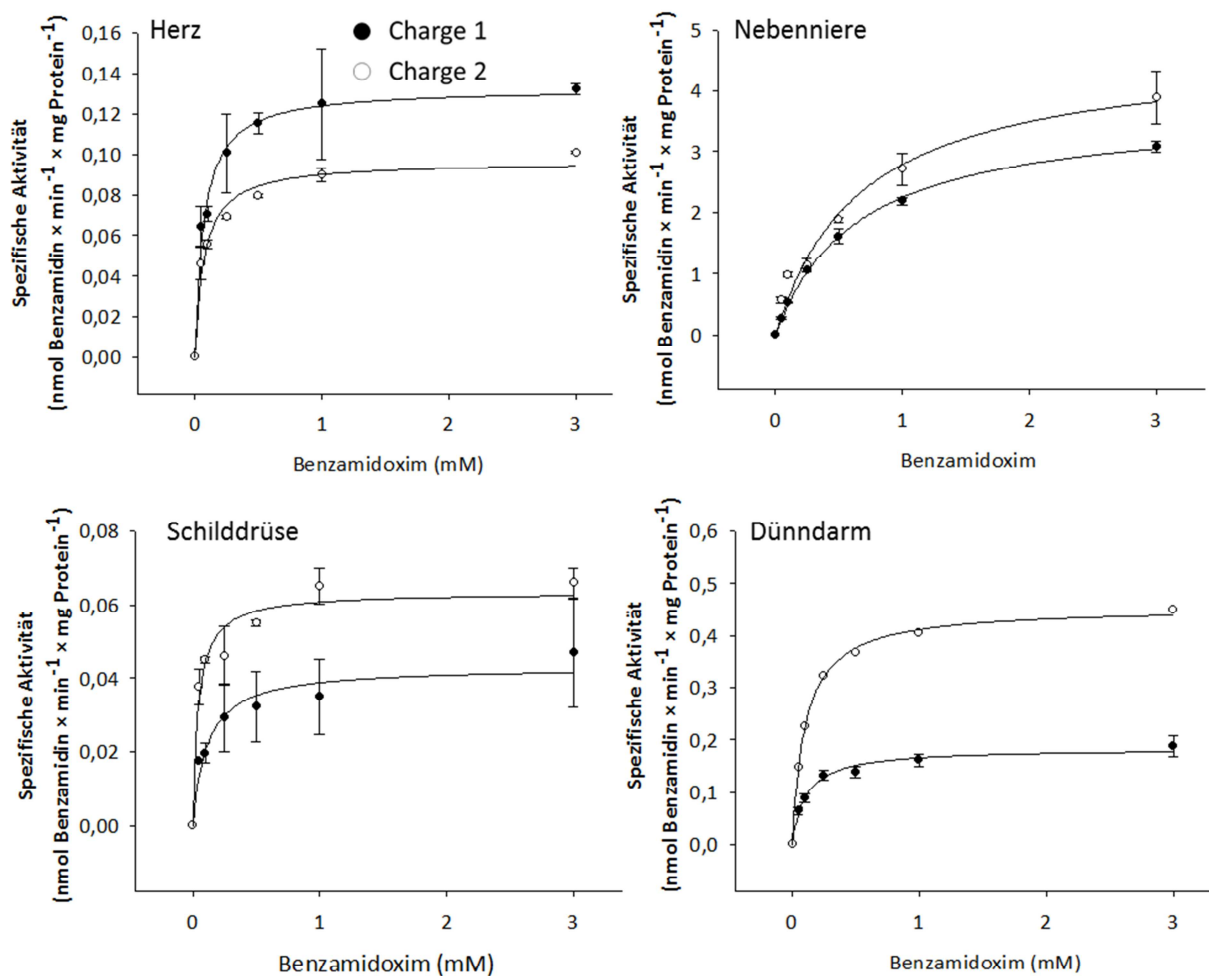
Die Westernblotanalyse wurde wie in Kap. 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Pro Bahn wurden 35  $\mu$ g porcines Protein aufgetragen. Für die Immunodetektion wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: Anti-Cyt  $b_5$  B (1:1.000) und anti-Cyt  $b_5$  Red (1:1.000).

### 6.1.4 Substratabhängigkeiten der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin



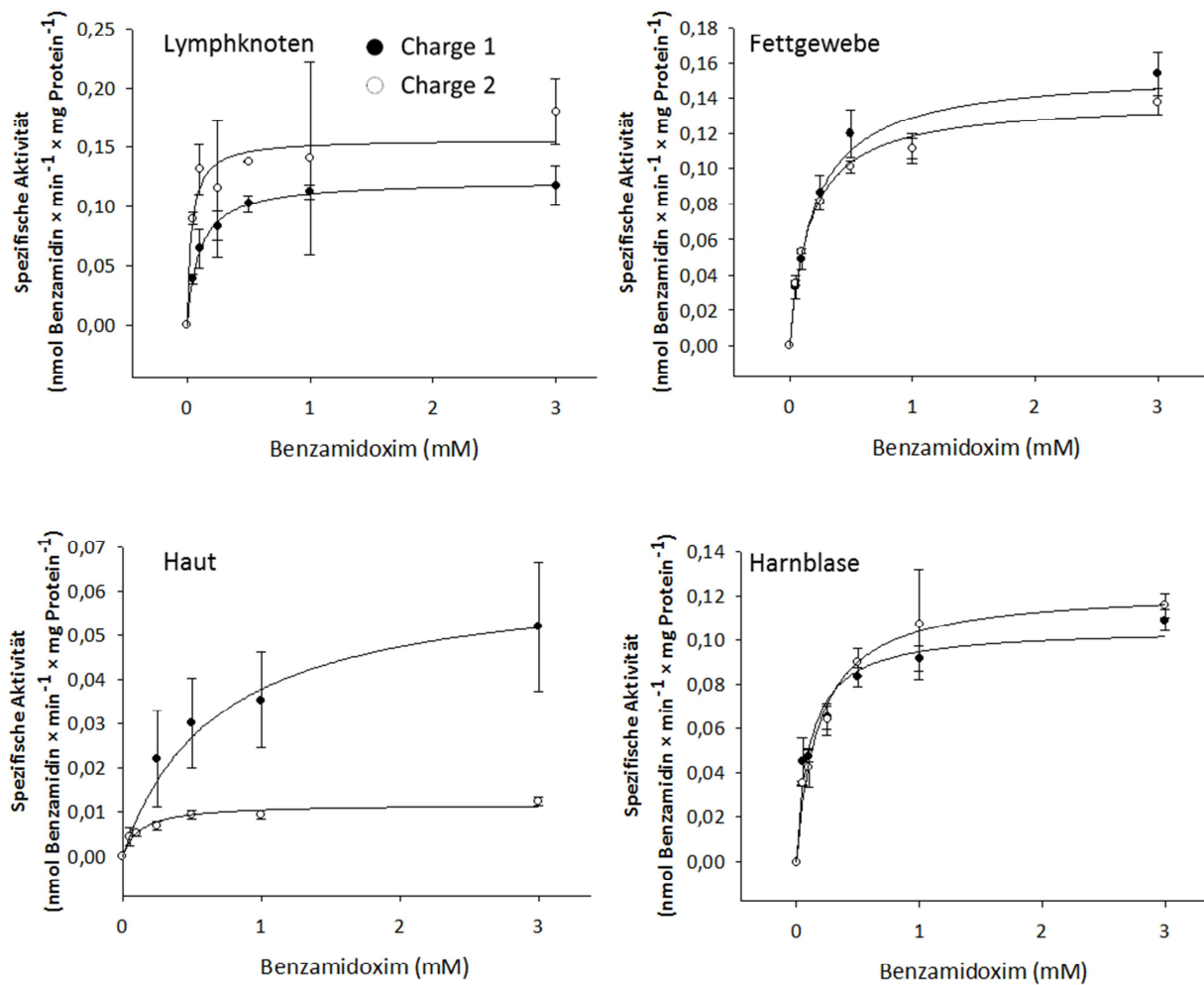
**Abb. 6.1.5 Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Gewebehomogenate**

Die Inkubationen wurden wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,1 mg porcines Protein, 0,05 – 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 40 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.



**Abb. 6.1.6 Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Gewebekomponenten**

Die Inkubationen wurden wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,1 mg porcines Protein, 0,05 – 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 40 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.



**Abb. 6.1.7 Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Gewebekomponenten**

Die Inkubationen wurden wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,1 mg porcines Protein, 0,05 – 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 40 Minuten. Die ermittelten Umsatzraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.



## 6.2 mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in humanen und porcinen Lebersubfraktionen und submitochondriale Lokalisation von mARC

### 6.2.1 Enzymkinetische Parameter der humanen Lebersubfraktionen

Fraktion	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol $\times$ min <sup>-1</sup> $\times$ mg <sup>-1</sup> )
Homogenat	1,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
Mitochondrien	2,5 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,2
OMV	2,6 $\pm$ 0,4	6,6 $\pm$ 0,5

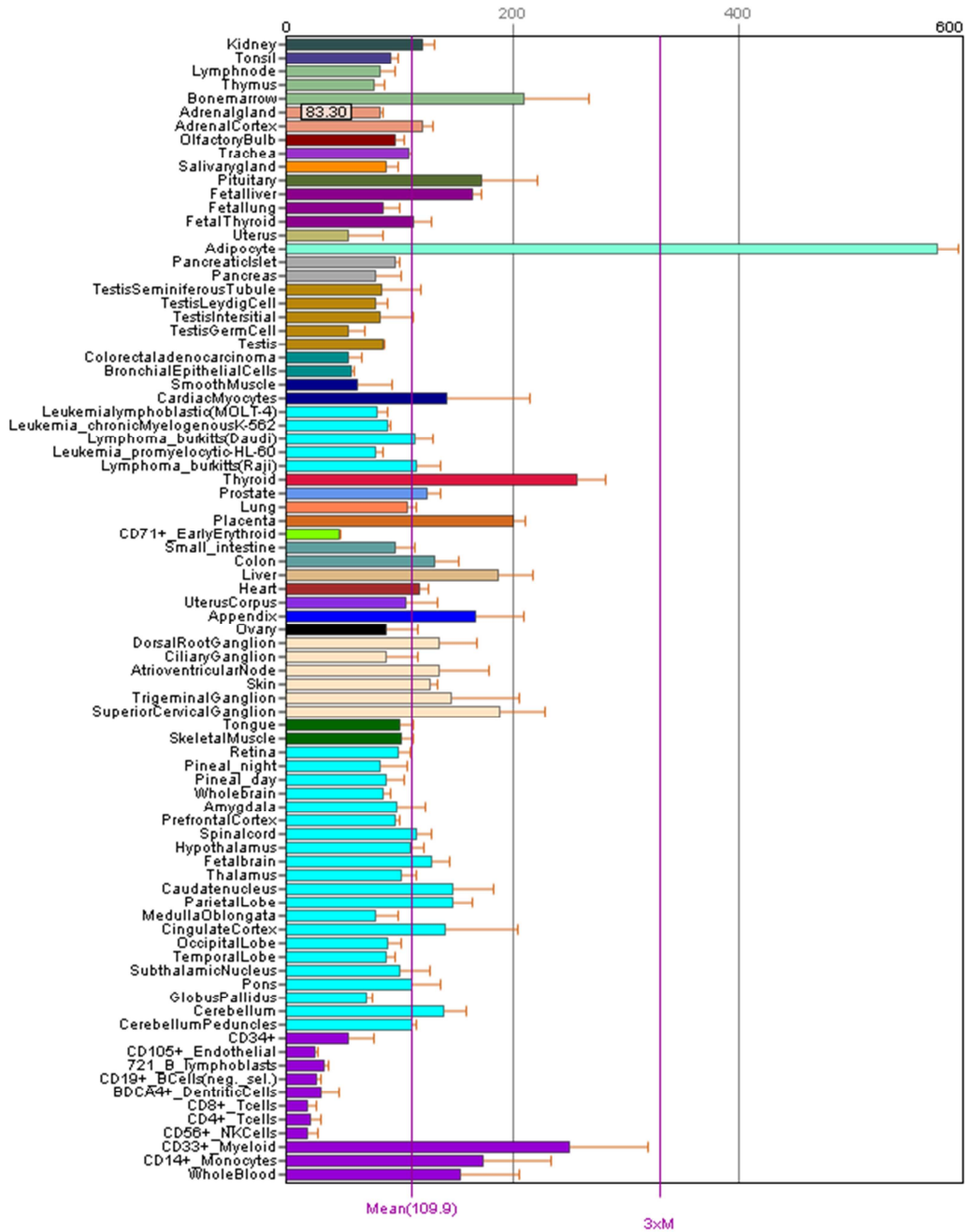
**Tab. 6.2.1 Enzymkinetische Parameter der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch humane Lebersubfraktionen**

*Die Inkubation wurde wie in Kap. 3.2.3.7.2 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 mg humanes Protein, 0,05 - 3 mM Benzamidoxim, 1 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei parallel inkubierten Reaktionsansätzen, welche jeweils doppelt vermessen wurden.*

*OMV = outer membrane vesicles*

### 6.3 mRNA-Expressionsdaten

#### mRNA-Expressionsdaten von mARC1 in humanen Geweben



<http://biogps.org/#goto=genereport&id=64757>

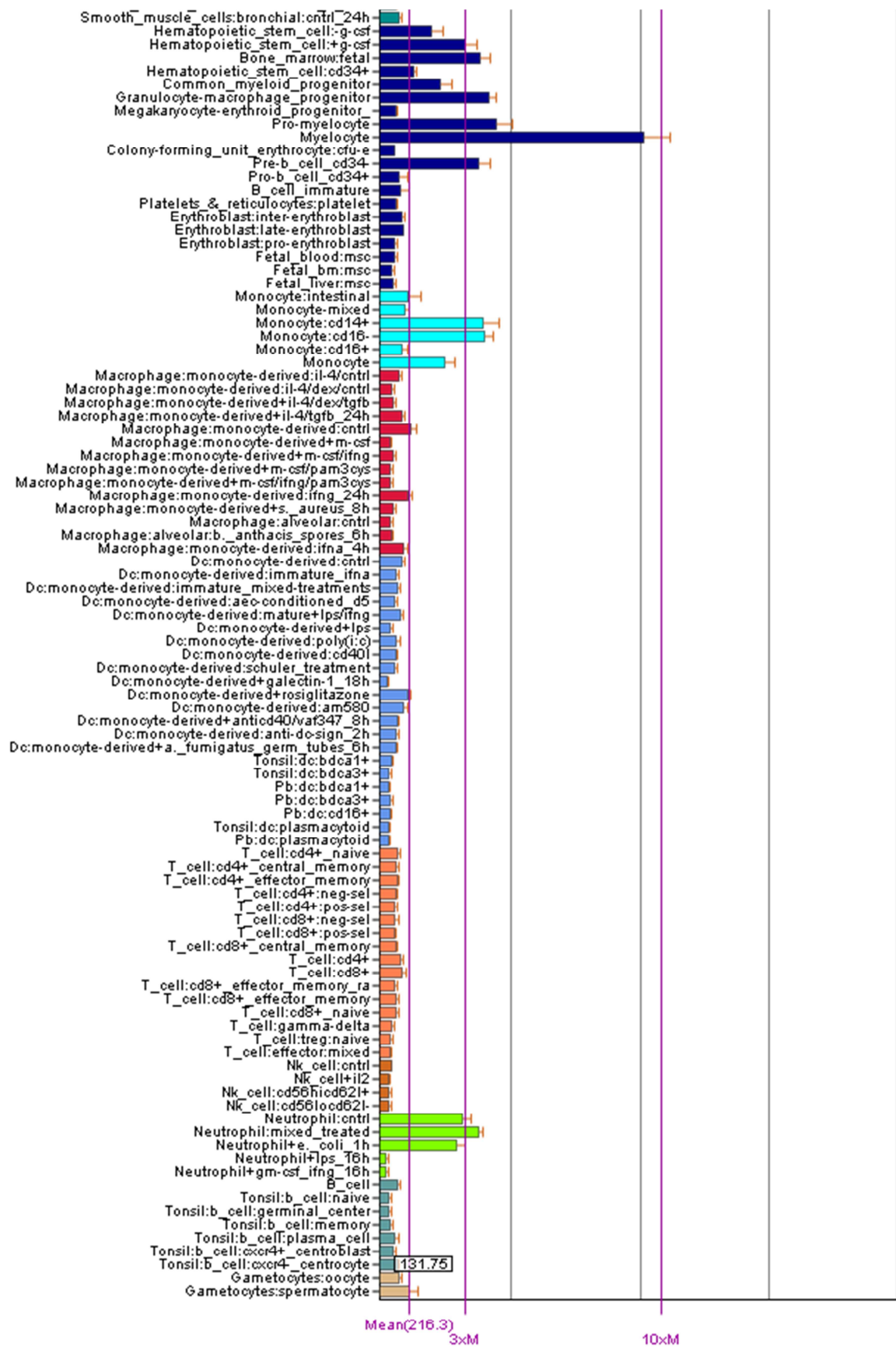
mRNA-Expressionsdaten von mARC2 in humanen Geweben



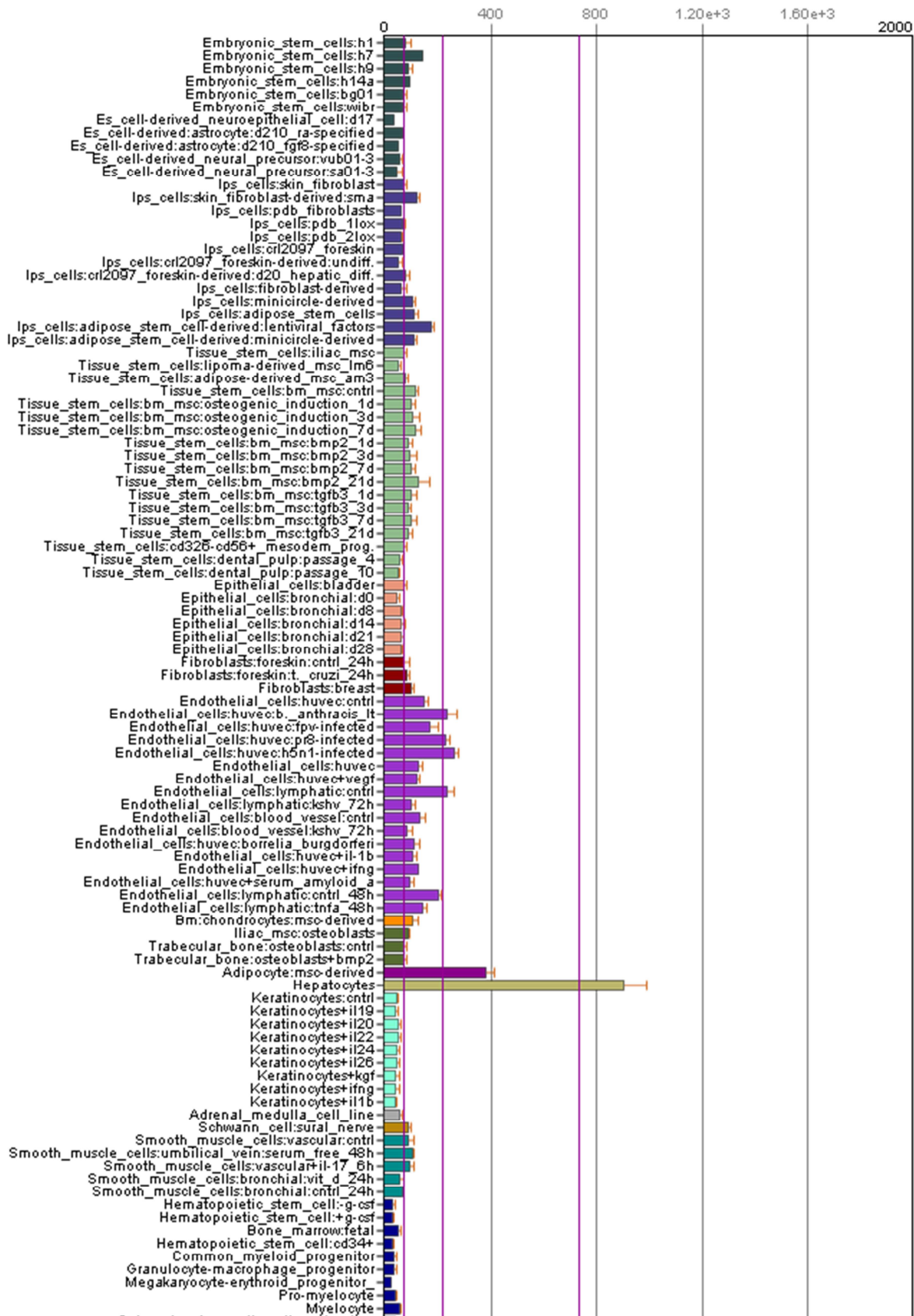
<http://biogps.org/#goto=genereport&id=54996>

## mRNA-Expressionsdaten von MARC1 in humanen Zellen





## mRNA-Expressionsdaten von mARC2 in humanen Zellen





<http://biogps.org/#goto=genereport&id=54996>

## 7 Materialien und Geräte

### 7.1 Substanzen und sonstige Materialien

Alle Substanzen und Materialien, welche nicht in diesem Abschnitt vermerkt sind wurden ebenfalls von Roth GmbH Co. KG, Merck KGaA oder Sigma Aldrich bezogen.

Acrylamid (Rotiphorese®30 (37,5:1))	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Acetonitril	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Albumin Standard (2 mg/ml)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Amersham ECL Plus™ Western Blotting Reagent	GE Healthcare, UK
Anti-Calnexin, antibody produced in rabbit	Acris Antibodies, Herford
Anti-COX IV 1, antibody produced in rabbit	Acris Antibodies, Herford
Anti-Cytochrom b <sub>5</sub> B, antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Cytochrom b <sub>5</sub> Reduktase, antibody produced in rabbit	Acris Antibodies, Herford
Anti-DIABLO, antibody produced in rabbit	Acris Antibodies, Herford
Anti-GAPDH, antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Goat IgG (Donkey), Peroxidase conjugated	Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK
Anti-mARC1, antibody produced in rabbit	Abgent, San Diego, USA
Anti-mARC2, antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Rabbit IgG (Goat), Peroxidase conjugated	Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK
Anti-SOD2, antibody produced in rabbit	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-VDAC2, antibody produced in goat	Acris Antibodies, Herford
Benzamidin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt



Centricon® Plus-70	Millipore, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Digitonin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco`s PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
DTT	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Eisessig	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HEPES(4-(2-Hydroxyethylpiperazin-1-ethansulfonsäure)	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Millex®GP Filter Unit 0,45 µm	Millipore, Cork, Ireland
MOSC1 Antibody Blocking Peptide	Abgent, San Diego, USA
NADH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumoctylsulfonat	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
OptiPrep™	AXIS-SHIELD PoC AS , Oslo (N)
OptiPlate – 96-Well (white)	PerkinElmer, Rodgau

ortho-Phosphorsäure, 85%	Merck KGaA, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Percoll®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Colbe
Plastibrand UV-Küvette mikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Polymorphprep™	AXIS-SHIELD PoC AS , Oslo (N)
PVDF Transfer Membrane Amersham Hybond™-P	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Reaktionsgefäße 1,5 ml/2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Numbrecht
Röhrchen 15 ml, PP	Sarstedt, Nürnbrecht
Röhrchen 50 ml, PP	Sarstedt, Nürnbrecht
Saccharose	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure, 36%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
SDS-Pellets	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Sulfamethoxazolhydroxylamin	Dalton, Toronto, Kanada
TEMED	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Tris-Base	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TWEEN	Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
UV-Küvette mikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Wellplates Zellkultur	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Whatman-Paper	Whatman GmbH, Dassel

## 7.2 Geräte

Cary 50 Scan UV-Visible Microplate Reader	Varian GmbH, München
Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer	Varian GmbH, München
Cary Win UV Software Version 2.0	Varian GmbH, München
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA10	Beckman Coulter, Krefeld
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf
Lumi-Imager F1™	Roche
Magnetkernrührer IKA-COMBIMAG RET	IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen
Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Messer-Homogenisator	Eigenbau der Universität Austin, Texas
Millipore Schlauchpumpe für Organperfusion Model XX8200230	Millipore GmbH, Schwalbach
Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Biorad, München
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
Olympus CK2 Inverses Phasenkontrast-Mikroskop	Olympus GmbH, Hamburg
Platteninkubator DTS-4	LTF, Wasserburg
pH-Messgerät inoLab® pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Pipetten Reference® Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill	B. Braun Biotech International, Melsungen
Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
SDS-PAGE Mini Protean® Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

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

## 8 Literaturverzeichnis

---

- Abdulhag U. N.; Soiferman D.; Schueler-Furman O.; Miller C.; Shaag A.; Elpeleg O.; Edvardson S.; Saada A.** 2014. Mitochondrial complex IV deficiency, caused by mutated COX6B1, is associated with encephalomyopathy, hydrocephalus and cardiomyopathy. *European journal of human genetics*.
- Abrignani S.; Crosti M.; Moro M.** 2010. Hematopoietic cells that express MOSC-1. US 2010/0166777 A1. *Patent Application Publication*.
- Adrain C.; Creagh E. M.; Martin S. J.** 2001. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO journal* **20**, 6627–6636.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Walter P.** 2005. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 3. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Anantharaman V.; Aravind L.** 2002. MOSC domains: ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS microbiology letters* **207**, 55–61.
- Andersson S.; Hofmann Y.; Nordling A.; Li X.; 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 metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **33**, 570–578.
- Angermüller S.; Bruder G.; Völkl A.; Wesch H.; Fahimi H. D.** 1987. Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *European journal of cell biology* **45**, 137–144.

- Beedham C.** 1997. The role of non-P450 enzymes in drug oxidation. *Pharmacy world & science PWS* **19**, 255–263.
- Behrens T. W.; Gillespie E.C.; Gregersen P. K.** 2006. Systemic lupus erythematosus. US 2006/0177814 A1. *Patent Application Publication*.
- Bernauer U.; Heinrich-Hirsch B.; Tönnies M.; Peter-Matthias W.; Gundert-Remy U.** 2006. Characterisation of the xenobiotic-metabolizing Cytochrome P450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination. *Toxicology letters* **164**, 278–288.
- Bernheim M. L.; Hochstein P.** 1968. Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **124**, 436–442.
- Bittner F.** 2013. MOSC family of Mo-enzymes. In: Kretsinger R. H., Uversky V. N., Permyakov E. A: *Encyclopedia of Metalloproteins* Springer New York 1451-1456.
- Bohnert M.; Wenz L.-S.; Zerbes R. M.; Horvath S. E.; Stroud D. A.; von der Malsburg, K.; Müller J. M.; Oeljeklaus S.; Perschil I.; Warscheid B.; Chacinska A.; Veenhuis M.; van der Klei I. J.; Daum G.; Wiedemann N.; Becker, T.; Pfanner N.; van der Laan N.** 2012. Role of mitochondrial inner membrane organizing system in protein biogenesis of the mitochondrial outer membrane. *Molecular biology of the cell* **23**, 3948–3956.
- Borgese N.; D'Arrigo A.; Silvestris M. de; Pietrini G.** 1993a. NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS letters* **325**, 70–75.
- Borgese N.; D'Arrigo A.; Silvestris M. de; Pietrini G.** 1993b. NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5. The problem of posttranslational targeting to the endoplasmic reticulum. *Sub-cellular biochemistry* **21**, 313–341.

- Borgese N.; Longhi R.** 1990. Both the outer mitochondrial membrane and the microsomal forms of cytochrome b5 reductase contain covalently bound myristic acid. Quantitative analysis on the polyvinylidene difluoride-immobilized proteins. *The biochemical journal* **266**, 341–347.
- Bøyum A.** 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* **97**, 77–89.
- Bradford M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- Cannon B.; Nedergaard J.** 2001. Respiratory and thermogenic capacities of cells and mitochondria from brown and white adipose tissue. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **155**, 295–303.
- Che R.; Yuan Y.; Huang S.; Zhang A.** 2014. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *American journal of physiology. Renal physiology* **306**, F367-78.
- Clement B.** 2002. Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug metabolism reviews* **34**, 565–579.
- Clement B.; Lomb R.; Möller W.** 1997. Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O<sub>2</sub>-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *The Journal of biological chemistry* **272**, 19615–19620.
- Clement B.; Lopian K.** 2003. Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **31**, 645–651.

- Clement B.; Mau S.; Deters S.; Havemeyer A.** 2005. Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **33**, 1740–1747.
- Clement B.; Raether W.** 1985. Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittel-Forschung* **35**, 1009–1014.
- Cohen H. J.; Betcher-Lange S.; Kessler D. L.; Rajagopalan K. V.** 1972. Hepatic sulfite oxidase. Congruency in mitochondria of prosthetic groups and activity. *The journal of biological chemistry* **247**, 7759–7766.
- Cohen H. J.; Fridovich I.** 1971. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. *The journal of biological chemistry* **246**, 359–366.
- Da Cruz S.; Xenarios I.; Langridge J.; Vilbois F.; Parone P. A.; Martinou J.-C.** 2003. Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *The journal of biological chemistry* **278**, 41566–41571.
- De Waziers I.; Cugnenc P. H.; Yang C. S.; Leroux J. P.; Beaune P. H.** 1990. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* **253**, 387–394.
- Dolezal P.; Likic V.; Tachezy J.; Lithgow T.** 2006. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 314–318.
- Dutheil F.; Beaune P.; Lorient M.-A.** 2008. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* **90**, 426–436.



- Forner F.; Kumar C.; Luber C. A.; Fromme T.; Klingenspor M.; Mann M.** 2009. Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell metabolism* **10**, 324–335.
- Freese E. B.** 1968. The mutagenic effect of hydroxyaminopurine derivatives on phage T4. *Mutation research* **5**, 299–301.
- Froriep D., Clement B., Bittner F., Mendel R. R., Reichmann D., Schmalix W., Havemeyer A.** 2013. Activation of anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica* **43**, 780–784.
- Gabel S.** 2011. Untersuchungen zur peroxisomalen Lokalisation von mARC. *Diplomarbeit*, Kiel.
- Gakh O.; Cavadini P.; Isaya G.** 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et biophysica acta* **1592**, 63–77.
- Garattini E.; Fratelli M.; Terao M.** 2008. Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cellular and molecular life sciences CMLS* **65**, 1019–1048.
- Gherzi-Egea J.-F.; Perrin R.; Leininger-Muller B.; Grassiot M.-C.; Jeandel C.; Floquet J.; Cuny G.; Siest G.; Minn A.** 1993. Subcellular localization of cytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochemical pharmacology* **45**, 647–658.
- Giordano S. J.; Steggle A. W.** 1991. The human liver and reticulocyte cytochrome b5 mRNAs are products from a single gene. *Biochemical and biophysical research communications* **178**, 38–44.
- Graziani-Bowering G. M.; Graham J. M.; Fillion L. G.** 1997. A quick, easy and inexpensive method for the isolation of human peripheral blood monocytes. *Journal of immunological methods* **207**, 157–168.

- Grünewald S.; Wahl B.; Bittner F.; Hungeling H.; Kanzow S.; Kotthaus J.; Schwering U.; Mendel R. R.; Clement B.** 2008. The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *Journal of medicinal chemistry* **51**, 8173–8177.
- Guengerich F. P.** 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology* **14**, 611–650.
- Hall J. E.; Kerrigan J. E.; Ramachandran K.; Bender B. C.; Stanko J. P.; Jones S. K.; Patrick D. A.; Tidwell R. R.** 1998. Anti-Pneumocystis activities of aromatic diamidoxime prodrugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**, 666–674.
- Hanukoglu I.** 2006. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug metabolism reviews* **38**, 171–196.
- Harrison R.** 2004. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug metabolism reviews* **36**, 363–375.
- Havemeyer A.; Bittner F.; Wollers S.; Mendel R.; Kunze T.; Clement B.** 2006. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *The journal of biological chemistry* **281**, 34796–34802.
- Havemeyer A.; 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 metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **38**, 1917–1921.
- Havemeyer A.; Lang J.; Clement B.** 2011. The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug metabolism reviews* **43**, 524–539.

- Herrmann J. M.; Riemer J.** 2010. The intermembrane space of mitochondria. *Antioxidants & redox signaling* **13**, 1341–1358.
- Hille R.** 1996. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical reviews* **96**, 2757–2816.
- Huang T. L.; Bacchi C. J.; Kode N. R.; Zhang Q.; Wang G.; Yartlet N.; Rattendi D.; Londono I.; Mazumder L.; Vanden E.; Jean J.; Mayence, A.; Donkor I. O.** 2007. Trypanocidal activity of piperazine-linked bisbenzamidines and bisbenzamidoxime, an orally active prodrug. *International journal of antimicrobial agents* **30**, 555–561.
- Hunger H. D.; Schmidt G.; Flachmeier C.** 1994. Quantitative western blotting using [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP and the ultrasensitive bio-imaging analyzer. *Analytical biochemistry* **217**, 98–102.
- Islinger M.; Lüers G. H.; Li K. W.; Loos M.; Völkl A.** 2007. Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *The journal of biological chemistry* **282**, 23055–23069.
- Jakobs H. H.; Froriep D.; Havemeyer A.; Mendel R. R.; Bittner F.; Clement B.** 2014. The Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Involvement in Metabolic Reduction of *N*-Oxides, Oximes and *N*-Hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem (Epub ahead of print)*.
- Jakobs H. H.; Mikula M.; Havemeyer A.; Strzalkowska A.; Borowa-Chmielak M.; Dzwonek A.; Gajewska M.; Hennig E. 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* **9**, 105371.
- Jarasch E. D.; Grund C.; Bruder G.; Heid H. W.; Keenan T. W.; Franke W. W.** 1981. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* **25**, 67–82.

- Jhajra S.; Ramesh Varkhede N.; Suresh Ahire D.; Vidyasagar Naik B.; Prasad B.; Paliwal J.; Singh S.** 2011. Extrahepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Their Significance. In: Lyubimov AV, ed. *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 1–99.
- Kadlubar F. F.; Fu P. P.; Jung H.; Shaikh A. U.; Beland F. A.** 1990. The metabolic *N*-oxidation of carcinogenic arylamines in relation to nitrogen charge density and oxidation potential. *Environmental health perspectives* **87**, 233–236.
- Kadlubar F. F.; Ziegler D. M.** 1974. Properties of a NADH-dependent *N*-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics* **162**, 83–92.
- Kamin H.; Masters B. S.; Gibson Q. H.; Williams C. H.** 1965. Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. *Federation proceedings* **24**, 1164–1171.
- Karnati S.; Lüers G.; Pfreimer S.; Baumgart-Vogt E.** 2013. Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes. *Histochemistry and cell biology* **140**, 105–117.
- Kimura S.; Kawamura M.; Iyanagi T.** 2003. Role of Thr(66) in porcine NADH-cytochrome b5 reductase in catalysis and control of the rate-limiting step in electron transfer. *The journal of biological chemistry* **278**, 3580–3589.
- Kisker C.; Schindelin H.; Rees D. C.** 1997. Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annual review of biochemistry* **66**, 233–267.
- Kitamura S.; Sugihara K.; Ohta S.** 2006. Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **21**, 83–98.
- Klein J. M.** 2012. Cellular maturation of mitochondrial molybdoenzymes. *Dissertation*, Köln.

- Klein J. M.; Busch J. D.; Potting C.; Baker M. J.; Langer T.; Schwarz G.** 2012. The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *The journal of biological chemistry* **287**, 42795–42803.
- Klingenspor M.** 2003. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Experimental physiology* **88**, 141–148.
- 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). *The biochemical journal* **433**, 383–391.
- Krischkowski C.** 2010. mARC-Expression und *N*-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen Organen. *Diplomarbeit*, Kiel.
- Krishna D. R.; Klotz U.** 1994. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clinical pharmacokinetics* **26**, 144–160.
- Kroemer H. K.; Klotz U.** 1992. Glucuronidation of drugs. A re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors. *Clinical pharmacokinetics* **23**, 292–310.
- 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. *Chemical research in toxicology* **25**, 2443–2450.
- Kroon A. I.; Koorengel M. C.; Goerdayal S. S.; Mulders P. C.; Janssen M. J.; Kruijff B. de.** 1999. Isolation and characterization of highly purified mitochondrial outer membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (method). *Molecular membrane biology* **16**, 205–211.

- Krüger P.** 1885. Über Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **18**, 1053–1060.
- Kundu T. K.; Velayutham M.; Zweier J. L.** 2012. Aldehyde oxidase functions as a superoxide generating NADH oxidase: an important redox regulated pathway of cellular oxygen radical formation. *Biochemistry* **51**, 2930–2939.
- Kurian J. R.; Bajad S. U.; Miller J. L.; Chin N. A.; Trepanier L. A.** 2004. NADH cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* **311**, 1171–1178.
- Kurian J. R.; Chin N. A.; Longlais B. J.; Hayes K. L.; Trepanier L. A.** 2006. Reductive detoxification of arylhydroxylamine carcinogens by human NADH cytochrome b5 reductase and cytochrome b5. *Chemical research in toxicology* **19**, 1366–1373.
- Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Ling G.; Gu J.; Genter M. B.; Zhuo X.; Ding X.** 2004. Regulation of cytochrome P450 gene expression in the olfactory mucosa. *Chemico-biological interactions* **147**, 247–258.
- Lombard D. B.; Alt F. W.; Cheng H.-L.; Bunkenborg J.; Streeper R. S.; Mostoslavsky R.; Kim J.; Yancopoulos G.; Valenzuela D.; Murphy A.; Yang Y.; Chen Y.; Hirschey M. D.; Bronson R. T.; Haigis M.; Guarente L. P.; Farese R. V.; Weissman S.; Verdin E.; Schwer B.** 2007. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and cellular biology* **27**, 8807–8814.
- Lyubimov A. V.** 2012. *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*. John Wiley & Sons **6**, 315-443.

- 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. *Biochemical and biophysical research communications* **357**, 237–244.
- Massey V.; Edmondson D.** 1970. On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *The journal of biological chemistry* **245**, 6595–6598.
- Mendel R. R.; Bittner F.** 2006. Cell biology of molybdenum. *Biochimica et biophysica acta* **1763**, 621–635.
- Mendel R. R.; Kruse T.** 2012. Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 1568–1579.
- Mendel R. R.; Leimkühler S.** 2014. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *Journal of biological inorganic chemistry* (Epub ahead of print).
- 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. *Functional & integrative genomics*.
- Molavi A.** 1989. Pentamidine for the prevention and treatment of *P. carinii* pneumonia. *American family physician* **40**, 195–200.
- Mouse Genome Database (MGD) Project.** 2014.  
<http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:4435988?page=alleleDetail&id=MGI:4435988>.  
Accessed August 2014.
- Mutschler E.; Geisslinger G.; Kroemer H. K.; Ruth P.; Schäfer-Korting M.** 2008.  
*Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 2008th edn.  
Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

- Negishi K.; Bessho T.; Hayatsu H.** 1994. Nucleoside and nucleobase analog mutagens. *Mutation research* **318**, 227–238.
- Neupert W.** 1997. Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry* **66**, 863–917.
- Neve E. P.; Nordling A.; Andersson T. B.; Hellman U.; Diczfalusy U.; Johansson I.; Ingelman-Sundberg M.** 2012. Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *The journal of biological chemistry* **287**, 6307–6317.
- Nowak K.; Luniak N.; Witt C.; Wüstefeld Y.; Wachter A.; Mendel R. R.; Hänsch R.** 2004. Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant & cell physiology* **45**, 1889–1894.
- Oh H.; Siano B.; Diamond S.** 2008. Neutrophil isolation protocol. *Journal of visualized experiments JoVE*.
- Ott G., Plitzko B., Krischkowski C., Reichmann D., Bittner F., Mendel R. R., Kunze T., Clement B., Havemeyer A.** 2014. Reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine (SMX-HA) by the mitochondrial amidoxime reducing coponent (mARC). *Chemical research in toxicology (Epub ahead of print)*.
- Ott G.** 2013. Untersuchungen zu genetischen Variationen im mARC-haltigen N-reduktiven Enzymsystem. *Dissertation*, Kiel.
- Pacifici G. M.; Franchi M.; Bencini C.; Repetti F.; Di Lascio N.; Muraro G. B.** 1988a. Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **18**, 849–856.



- Pacifici G. M.; Franchi M.; Gervasi P. G.; Longo V.; Di Simplicio P.; Temellini A.; Giuliani L.** 1989. Profile of drug-metabolizing enzymes in human ileum and colon. *Pharmacology* **38**, 137–145.
- Pacifici G. M.; Rane A.** 1982. Metabolism of styrene oxide in different human fetal tissues. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **10**, 302–305.
- Pacifici G. M.; Temellini A.; Giuliani L.; Rane A.; Thomas H.; Oesch F.** 1988b. Cytosolic epoxide hydrolase in humans: development and tissue distribution. *Archives of toxicology* **62**, 254–257.
- Pecinová A.; Drahota Z.; Nůsková H.; Pecina P.; Houštěk J.** 2011. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion* **11**, 722–728.
- Peterlin-Masic L.; Cesar J.; Zega A.** 2006. Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Current pharmaceutical design* **12**, 73–91.
- Pfanner N.; Geissler A.** 2001. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 339–349.
- Plitzko B.** 2010. Optimierung der *in-vitro* Rekonstitution des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems. *Diplomarbeit*, Kiel.
- Plitzko B.; Ott G.; Reichmann D.; Henderson C. J.; Wolf C. R.; 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. *The journal of biological chemistry* **288**, 20228–20237.
- Pryde D. C.; Dalvie D.; Hu Q.; Jones P.; Obach R. S.; Tran T.-D.** 2010. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *Journal of medicinal chemistry* **53**, 8441–8460.

- Ragg R.; Natalio F.; Tahir M. N.; Janssen H.; Kashyap A.; Strand D.; Strand S.; Tremel W.** 2014. Molybdenum Trioxide Nanoparticles with Intrinsic Sulfite Oxidase Activity. *ACS nano*.
- Rehling P.; Meisinger C.** 2005. Proteintransport in Mitochondrien: TOM- und TIM-Komplexe. *Biospektrum*, 460–463.
- Reichman D.** 2013. Untersuchung Molybdäncofaktor-haltiger MOSC-Proteine aus *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation, Braunschweig*.
- Schiavini D. G.; Puel J. M.; Averous S. A.; Bazex J. A.** 1989. Quantitative western immunoblotting analysis in survey of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *Journal of clinical microbiology* **27**, 2062–2066.
- Schmidt O.; Pfanner N.; Meisinger C.** 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 655–667.
- Schmidt R.; Thews G.; Lang F.** 2000. *Physiologie des Menschen*, 28th edn. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schnaitman C.; Greenawalt J. W.** 1968. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *The journal of cell biology* **38**, 158–175.
- Schwarz G.; Mendel R. R.; Ribbe M. W.** 2009. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**, 839–847.
- Schwering U.** 2010. Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs. *Dissertation, Kiel*.
- Shahni R.** 2011. The Role of Two novel Genes, NSA2 and CDK7, in Diabetic Nephropathie. *Dissertation, King's College London, London*.

- Sirover M. A.** 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et biophysica acta* **1432**, 159–184.
- 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. *Analytical biochemistry* **150**, 76–85.
- Sottocasa G. L.; Kuylenstierna B.; Ernster L.; Bergstrand A.** 1967. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *The journal of cell biology* **32**, 415–438.
- 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. *The journal of biological chemistry* **289**, 10345–10358.
- Srere P. A.** 1969. Citrate Synthase. *Methods Enzymol*, 1969, 3–11.
- Steinhilber D.; Schubert-Zsliavec M.; Roth H. J.** 2010. *Medizinische Chemie: Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*, 2nd edn.: Deutscher Apotheker Verlag.
- Stojanovski D.; Müller J. M.; Milenkovic D.; Guiard B.; Pfanner N.; Chacinska A.** 2008. The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochimica et biophysica acta* **1783**, 610–617.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6062–6067.

- Testai E.** 2001. The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for *in vitro* toxicology for metabolic studies. *Cell biology and toxicology* **17**, 271–285.
- Thews G.; Mutschler E.; Vaupel P.** 1999. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 5th edn.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Vassilakos A.; Michalak M.; Lehrman M. A.; Williams D. B.** 1998. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* **37**, 3480–3490.
- Vincenzini M. T.; Favilli F.; Stio M.; Iantomasi T.** 1991. Intestinal glutathione transport system: a possible detoxication role. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1073**, 571–579.
- Vogel C.; Marcotte E. M.** 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics* **13**, 227–232.
- 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. *The journal of biological chemistry* **285**, 37847–37859.
- 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 R. J. A.; Warscheid B.** 2007. Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & cellular proteomics MCP* **6**, 2045–2057.

- Willey J. C.; Coy E. L.; Frampton M. W.; Torres A.; Apostolakos M. J.; Hoehn G.; Schuermann W. H.; Thilly W. G; Olson D. E.; Hammersley J. R.; Crespi, C. L.; Utell, M. J.** 1997. Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **17**, 114–124.
- Wundt J.** 2009. Charakterisierung von NeoHepatozyten als Ersatz für humane Hepatozyten und Induktionsuntersuchungen. *Dissertation*, Kiel.
- Xue J.; Du L.; Zhu R.; Huang J.; Phillips D. L.** 2014. Direct time-resolved spectroscopic observation of arylnitrenium ion reactions with guanine-containing DNA oligomers. *The journal of organic chemistry* **79**, 3610–3614.
- Yamamoto T.; Yamada A.; Watanabe M.; Yoshimura Y.; Yamazaki N.; Yoshimura Y.; Yamauchi T.; Kataoka M.; Nagata T.; Terada H.; Shinohara Y.** 2006. VDAC1, having a shorter *N*-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *Journal of proteome research* **5**, 3336–3344.
- Young J. C.; Hoogenraad N. J.; Hartl F. U.** 2003. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**, 41–50.
- Zalk R.; Israelson A.; Garty E. S.; Azoulay-Zohar H.; Shoshan-Barmatz V.** 2005. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *The biochemical journal* **386**, 73–83.
- Zhang J. Y.; Wang Y.; Prakash C.** 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human lung. *Current drug metabolism* **7**, 939–948.



## Erklärung zu §8 der Promotionsordnung

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

### Publikationen

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

**Ott G., Plitzko B., Krischkowski C., Reichmann D., Bittner F., Mendel R. R., Kunze T., Clement B., Havemeyer A.** 2014. Reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine (SMX-HA) by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Chemical research in toxicology* (Epub ahead of print).

### Tagungsbeiträge

**Krischkowski C., Clement B., Bittner F., Mendel R. R., Havemeyer A.** 2012 Distribution of mARC in different porcine tissues. *22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, EFMC-ISCM, Berlin, Deutschland* (Poster).

**Krischkowski C., Clement B., Bittner F., Mendel R. R., Havemeyer A.** 2013. Distribution of mARC in different porcine tissue homogenates and characterization of subcellular human liver fractions. *Molybdenum and Tungsten Enzyme Conference, Sintra, Portugal* (Poster).

**Krischkowski C., Clement B., Bittner F., Mendel R. R., Havemeyer A.** 2013. mARC expression and *N*-reductive activity in subcellular fractions of human liver. *DPhG Jahrestagung, Braunschweig, Deutschland* (Poster).

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

Kiel im Oktober 2014

Carmen Krischkowski



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Clement für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und den wertvollen Ratschlägen in den Arbeitsgruppensitzungen.

Bei Frau Dr. Antje Havemeyer bedanke ich mich ganz herzlich für die jahrelange engagierte Betreuung und die vielen unverzichtbaren Anregungen sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft und das sorgfältige und zügige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei der Großschlachtereier Thomsen und Herrn Dr. Ehlers bedanke ich mich für die unkomplizierte Bereitstellung der porcinen Gewebe.

Frau Kirsten Signus danke ich für die Hilfe bei der Beschaffung der Vollblutproben. Bei Petra und Sven bedanke ich mich für die technische Unterstützung im Labor.

Bei Rebecca und Steffi bedanke ich mich sehr für die Korrektur einzelner Teilabschnitte dieser Arbeit.

Bei Anja, Antje, Bernd, Björn, Ilka, Jörg, Julia, Juliane, Lena K., Lukas H., Merle, Petra und Pia bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die stets heitere Atmosphäre bei der Betreuung des 1. Semesters.

Birte danke ich für die konstruktive, verständnisvolle und äußerst lustige gemeinsame Bürozeit.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen sowie ehemaligen Kollegen für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Auch für die thematisch interessanten und sehr geselligen Seminarfahrten nach Sehlendorf möchte ich mich herzlich bedanken. Sehlendorf!

Ein besonders großes Dankeschön für die vielen unvergesslichen Momente innerhalb und außerhalb der Mauern des Instituts geht an Birte, Björn, Chris, Daniel, Franzi, Ina, Janis, Jennifer, Julia, Laura, Lena K., Melli, Rebecca, Stefan und Swetlana. Danke für die schöne gemeinsame Zeit!

Ein großer Dank gilt Holger für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung jeglicher Art und die schöne Zeit neben der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen lieben Eltern und meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre immer da gewesene Unterstützung, ihr Verständnis und das Vertrauen in mich. Vielen Dank!

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Vor- und Familienname	Carmen Krischkowski
Geburtsdatum	27. Oktober 1984
Geburtsort	Schwerin
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulausbildung

---

1991 bis 1995	Käthe Kollwitz Grundschule, Rehna
1995 bis 2004	Gymnasium Gadebusch, Gadebusch
Juni 2004	allgemeine Hochschulreife

### Studium

---

Apr. 2005 bis Mai 2009	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jul. 2009 bis Dez. 2009	Pharmaziepraktikum in der Maternus Apotheke, Köln
Jan. 2010 bis Jun. 2010	Pharmaziepraktikum am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
Okt. 2010	Erteilung der Approbation als Apothekerin

### Promotion und Weiterbildung

---

seit Okt. 2010	wissenschaftliche Mitarbeiterin am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
seit Nov. 2010	Weiterbildung zur Fachapothekerin für pharmazeutische Analytik



Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte in Säugern bekannte Molybdoenzym. Alle bisher analysierten Säugetiergenome codieren für zwei mARC-Proteine (mARC1 und mARC2). mARC ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und bildet zusammen mit Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$  Reduktase das *N*-reduktive Dreikomponentenenzymssystem. Das mARC-abhängige Enzymssystem ist an der Reduktion zahlreicher *N*-oxygenierter Verbindungen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Prodrugs, bei der Detoxifizierung mutagener Basenanaloga und weiterer, durch das P450-System im Körper gebildeter *N*-oxygenierter Metabolite.

In dieser Arbeit wurde auf Proteinebene ein Expressionsprofil für mARC1 und mARC2, anhand porciner hepatischer und extrahepatischer Gewebekomponenten erstellt. Dabei konnte in nahezu allen untersuchten Geweben mindestens eines der beiden mARC-Proteine detektiert werden. Die höchste mARC1-Expression wurde im Herzen und im Pankreas ermittelt. mARC2 war am stärksten in der Leber, der Niere, der Schilddrüse und dem Pankreas exprimiert. Die mARC-Expression korrelierte, mit Ausnahme der Schilddrüse, deutlich mit der, am Modellsubstrat Benzamidoxim bestimmten *N*-reduktiven Aktivität. Die ermittelte Gewebeverteilung von mARC korrelierte weitestgehend mit den postulierten physiologischen Funktionen.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit humane und porcine Lebersubfraktionen hinsichtlich der mARC-Expression und der *N*-reduktiven Aktivität untersucht. Es konnte, sowohl auf porciner, als auch auf humaner Ebene demonstriert werden, dass die *N*-reduktive Aktivität und beide mARC-Proteine in der äußeren mitochondrialen Membranfraktion angereichert waren. Für den toxischen Metaboliten Sulfamethoxazolhydroxylamin konnte ebenfalls eine mARC-abhängige *N*-Reduktion zu Sulfamethoxazol, durch die humanen Leberpräparationen gezeigt werden. In weiteren Lokalisationsstudien an porcinen submitochondrialen Leberfraktionen konnte mARC1 zusätzlich im mitochondrialen Intermembranraum detektiert werden.

In den durchgeführten Untersuchungen des humanen Vollbluts und den daraus isolierten Blutzellfraktionen, wurde keine enzymatisch bedingte *N*-Reduktion detektiert. Während eine Lokalisation für mARC1 in den Monozyten nachgewiesen werden konnte, wurde mARC2 in keiner der untersuchten Fraktionen detektiert.



The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is the fourth in mammalian known molybdenum enzyme. All hitherto analysed mammal genomes encode for two mARC proteins (mARC1 and mARC2). mARC is localized in the outer mitochondrial membrane and forms together with cytochrome  $b_5$  and the NADH cytochrome  $b_5$  reductase the *N*-reductive three component enzyme system. The mARC dependent *N*-reductive enzyme system is involved in the reduction of numerous *N*-oxygenated compounds and plays an important role in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs, in the detoxification of mutagenic base analogs, and further *N*-oxygenated products of the P450 system.

In this thesis an expression profile of mARC1 and mARC2 on protein level in hepatic and extrahepatic tissue homogenates was created. In nearly all investigated tissues at least one mARC protein could be detected. The highest mARC1 expression was determined in heart and pancreas. mARC2 was highly expressed in liver, kidney, thyroid and pancreas. The mARC expression correlated, with exception of the thyroid, clearly with the *N*-reductive activity which was determined by the use of the model substrate benzamidoxime. Furthermore the tissue distribution of mARC correlated with the predicted endogenous functions of the mARC enzymes.

Furthermore in this study human and porcine liver subfractions were examined in regard to the expression of mARC and the *N*-reductive activity. It could be demonstrated for both human and porcine preparations that the *N*-reductive activity and the mARC enzymes were enriched in the outer mitochondrial membrane fraction. For the toxic metabolite sulfamethoxazole hydroxylamine also could be shown a mARC dependent *N*-reduction to sulfamethoxazole by human liver subfractions. In additional localization studies by the use of porcine submitochondrial liver fractions mARC1 could be detected supplementary in the mitochondrial intermembrane space.

In performed investigations of human whole blood and isolated blood cell fractions no *N*-reduction caused by enzymatic activity could be detected. While a localization of mARC1 in monocytes could be established, there was no detection of mARC2 in the characterized fractions.

