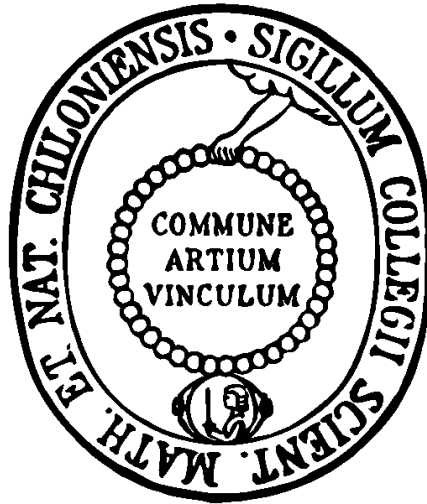


Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen am mARC-Enzymsystem



Dissertation

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

vorgelegt von

Eva Bauch

Kiel 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. Bernd Clement
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Philipp Kurz
Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2015
Zum Druck genehmigt: 13.04.2015
Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl
(Dekan)

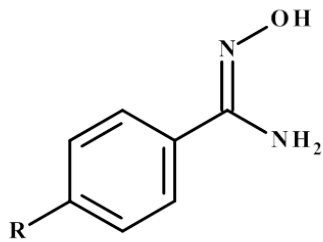
Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

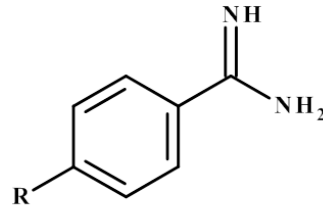
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
CoMFA	<i>comparative molecular field analysis</i>
Cyt b ₅	Cytochrom b ₅
Cyt b ₅ R	Cytochrom b ₅ Reduktase
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E_s	Taft-Konstante
ESI-MS	Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation
FAD	Flavinadenindinukleotid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK-293	humane embryonale Nierenzelllinie
HMDE	<i>hanging mercury drop electrode</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
kDa	Kilodalton
K_i	Hemmkonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LD ₅₀	<i>Dosis letalis 50</i>

mARC	<i>mitochondrial Amidoxime Reducing Component</i>
MCP	Moco Carrierprotein
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
Moco	Molybdäncofaktor
MOCS	<i>molybdenum cofactor synthesis</i>
MOSC	Moco Sulfurase C-terminale Domäne
MPT	Molybdopterin
MR	Molrefraktion
Mt	Mitochondrien
MWCNT	<i>multiwall carbon nanotubes</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
ND	nicht detektierbar
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
OMV	äußere mitochondriale Membranfraktion (<i>outer membrane vesicles</i>)
π	Hansch-Konstante
P	Oktan-ol-Wasser-Verteilungskoeffizient
PNS	<i>post nuclear supernatant</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QSAR	<i>quantitative structure-activity relationship</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RyR	Ryanodin-Rezeptor
σ	Hammett-Konstante
SAM	<i>self-assembled monolayer</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SL	Schweineleber
3T3-L1	murine Fibroblastenzelllinie, Präadipozyten
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
V_{\max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
vs.	<i>versus</i> (gegen)

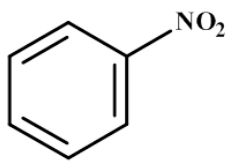
Strukturformelverzeichnis



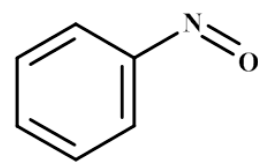
para-substituierte Benzamidoxime
R: H, Br, Cl, CN, NO₂, CH₃, OCH₃, CF₃, OH, NH₂



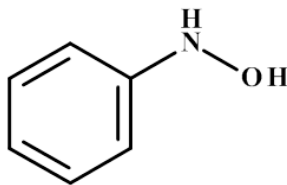
para-substituierte Benzamidine



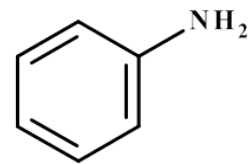
Nitrobenzol



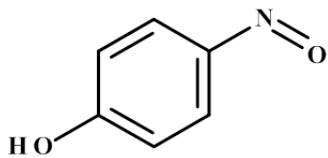
Nitrosobenzol



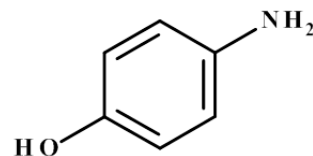
N-Phenylhydroxylamin



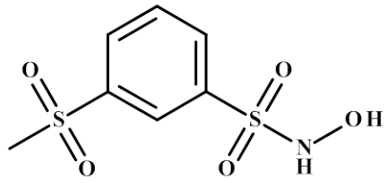
Anilin



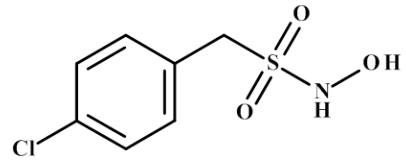
4-Nitrosophenol



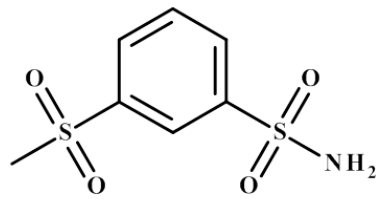
4-Aminophenol



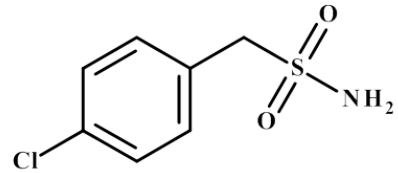
N-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid



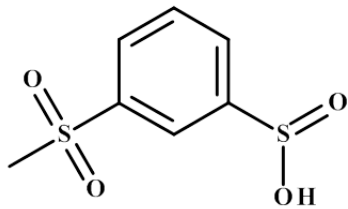
4-Chlorphenyl-N-hydroxymethansulfonamid



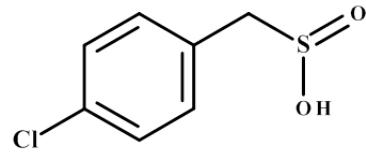
3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid



4-Chlorphenylmethansulfonamid



3-Methylsulfonylbenzolsulfinsäure



4-Chlorphenylmethansulfinsäure

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.....	1
1.1.1	Einführung	1
1.1.2	Parameter zur Beschreibung von biologischer Wirkung und physikochemischen Eigenschaften.....	3
1.2	Molybdoenzyme	6
1.2.1	Einführung	6
1.2.2	Molybdäncofaktor	8
1.3	mARC-Enzymsystem.....	11
1.3.1	Einführung	11
1.3.2	mARC	11
1.3.3	Cytochrom b ₅	13
1.3.4	Cytochrom b ₅ Reduktase	13
1.4	Zielsetzung	15
2	<i>para</i>-substituierte Benzamidoxime	17
2.1	Einleitung.....	17
2.1.1	Amidoxim-Prodrugprinzip	17
2.1.2	Zielsetzung	18
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Materialien und Geräte	20
2.2.2	Gewinnung und Charakterisierung der Proteinquellen	20
2.2.2.1	Gewinnung der porcinen subzellulären Fraktionen.....	20
2.2.2.2	Isolierung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion.....	20
2.2.2.3	Rekombinante Proteine des mARC-Enzymsystems	21
2.2.2.4	Bestimmung des Proteingehalts.....	21
2.2.2.5	SDS-PAGE und Western Blot-Analyse.....	21
2.2.2.6	Bestimmung des Molybdän-Gehalts von mARC.....	24
2.2.2.7	Bestimmung des Häm-Gehalts von Cytochrom b ₅	24
2.2.2.8	Häm-Saturierung von Cytochrom b ₅	24
2.2.2.9	Bestimmung des FAD-Gehalts der Cytochrom b ₅ Reduktase.....	25
2.2.3	HPLC-Analytik	25
2.2.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung.....	25
2.2.3.2	Benzamidoxim und -amidin.....	26
2.2.3.3	4-Chlorbenzamidoxim und -amidin	26

2.2.3.4	4-Brombenzamidoxim und -amidin	26
2.2.3.5	4-Nitrobenzamidoxim und -amidin.....	27
2.2.3.6	4-Cyanobenzamidoxim und -amidin.....	27
2.2.3.7	4-Trifluormethylbenzamidoxim und -amidin.....	28
2.2.3.8	4-Methylbenzamidoxim und -amidin	28
2.2.3.9	4-Methoxybenzamidoxim und -amidin.....	29
2.2.3.10	4-Aminobenzamidoxim und -amidin	29
2.2.3.11	4-Hydroxybenzamidoxim und -amidin	30
2.2.4	Stabilitäten und Löslichkeiten	30
2.2.4.1	Löslichkeiten der <i>para</i> -substituierten Benzamidoxime	30
2.2.4.2	Stabilitäten der <i>para</i> -substituierten Benzamidoxime und -amidine	30
2.2.5	Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Biotransformationsansätze	31
2.2.5.1	Inkubationen mit rekombinanten Enzymen	31
2.2.5.1.1	Ermittlung der optimalen Stöchiometrie	31
2.2.5.1.2	Zeitabhängigkeit	31
2.2.5.1.3	Substratabhängigkeit.....	32
2.2.5.2	Inkubationen mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion.	33
2.2.5.2.1	Zeitabhängigkeit	33
2.2.5.2.2	pH-Abhängigkeit	33
2.2.5.2.3	Substratabhängigkeit.....	34
2.2.6	Cyclische Voltammetrie und Differentielle Puls-Voltammetrie	35
2.2.7	Elektrolyse von Benzamidoxim mit nachfolgender HPLC-Analytik	35
2.2.8	¹ H-NMR-Spektroskopie	37
2.2.9	Statistik	37
2.3	Ergebnisse	37
2.3.1	Charakterisierung der Enzymquellen	37
2.3.1.1	Subzelluläre Fraktionen der Schweineleber	37
2.3.1.2	Rekombinante Proteine des mARC-Enzymsystems	40
2.3.2	HPLC-Analytik	40
2.3.3	Stabilitäten und Löslichkeiten	51
2.3.3.1	Löslichkeiten der <i>para</i> -substituierten Benzamidoxime	51
2.3.3.2	Stabilitäten der <i>para</i> -substituierten Benzamidoxime und -amidine	51
2.3.4	<i>N</i> -Reduktion durch das rekombinante mARC-Enzymsystem	54
2.3.4.1	Ermittlung der optimalen Stöchiometrie.....	54
2.3.4.2	Zeitabhängigkeit	56
2.3.4.3	Substratabhängigkeit	57
2.3.5	<i>N</i> -Reduktion durch die äußere mitochondriale Membranfraktion	60
2.3.5.1	Zeitabhängigkeit	60
2.3.5.2	pH-Abhängigkeit.....	60
2.3.5.3	Substratabhängigkeit	63

2.3.6	Elektrochemischen Reduktion von Benzamidoxim	66
2.3.6.1	Cyclische Voltammetrie	66
2.3.6.2	Differentielle Puls-Voltammetrie.....	66
2.3.6.3	Elektrolyse	69
2.3.7	Redoxpotentiale.....	73
2.3.8	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	75
2.3.9	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.....	75
2.3.9.1	Enzymatische Reduktion.....	76
2.3.9.2	Elektrochemische Reduktion.....	77
2.4	Diskussion	78
2.5	Zusammenfassung	81
3	Redoxpotential von mARC1	83
3.1	Einleitung	83
3.1.1	Methoden der Proteinelektrochemie.....	83
3.1.2	Proteinelektrochemie an Molybdoenzymen sowie Cytochrom b ₅ und Cytochrom b ₅ Reduktase	85
3.1.3	Zielsetzung	87
3.2	Methoden.....	87
3.2.1	Materialien und Geräte	87
3.2.2	Proteinquelle	88
3.2.3	Modifikation der Elektroden.....	88
3.2.4	Elektrochemische Messungen	88
3.3	Ergebnisse	88
3.3.1	Cyclische Voltammetrie.....	88
3.3.2	Differentielle Puls-Voltammetrie	92
3.4	Diskussion	95
3.5	Zusammenfassung	97
4	N-hydroxylierte Sulfonamide	99
4.1	Einleitung.....	99
4.1.1	Bedeutung von HNO-Donoren im Rahmen der Pharmakotherapie	99
4.1.2	Zielsetzung	103
4.2	Methoden.....	105
4.2.1	Materialien und Geräte	105
4.2.2	Proteinquellen	105
4.2.3	HPLC-Analytik	106
4.2.3.1	N-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, 3-Methylsulfonyl- benzolsulfonamid und -sulfinsäure	106
4.2.3.2	4-Chlorphenyl-N-hydroxymethansulfonamid, 4-Chlorphenyl- methansulfonamid und -sulfinsäure.....	107
4.2.3.3	Kalibrierung und Wiederfindung.....	107
4.2.4	Stabilitätsuntersuchungen	108

4.2.5	Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Biotransformationsansätze	108
4.2.5.1	Zeitabhängigkeit	108
4.2.5.2	Substratabhängigkeit	108
4.3	Ergebnisse	109
4.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	109
4.3.1.1	3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid	109
4.3.1.2	4-Chlorphenylmethansulfonamid	112
4.3.2	Stabilitätsuntersuchungen	114
4.3.2.1	Stabilitätsuntersuchungen unter Inkubationsbedingungen	114
4.3.2.2	Stabilitätsuntersuchungen bei Raumtemperatur	114
4.3.3	Biotransformation von <i>N</i> -Hydroxy-3-methylsulfonyl- benzolsulfonamid	118
4.3.3.1	Zeitabhängigkeit	118
4.3.3.2	Substratabhängigkeit	118
4.3.4	Biotransformation von 4-Chlorphenyl- <i>N</i> -hydroxymethansulfonamid ...	121
4.3.4.1	Zeitabhängigkeit	121
4.3.4.2	Substratabhängigkeit	121
4.4	Diskussion	124
4.5	Zusammenfassung	127
5	Nitro- und Nitrosoverbindungen	129
5.1	Einleitung	129
5.1.1	Toxizität aromatischer Nitro- und Nitrosoverbindungen	129
5.1.2	Enzymatische Reduktion aromatischer Nitro- und Nitrosoverbindungen	132
5.1.3	Zielsetzung	133
5.2	Methoden	134
5.2.1	Materialien und Geräte	134
5.2.2	Proteinquellen	134
5.2.3	HPLC-Analytik	135
5.2.3.1	4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin	135
5.2.3.2	Detektion von 4-Aminobenzamidoxim und -amidin	136
5.2.3.3	Nitrobenzol, Nitrosobenzol, <i>N</i> -Phenylhydroxylamin und Anilin ...	136
5.2.3.4	Detektion von Nitrosobenzol, <i>N</i> -Phenylhydroxylamin und Anilin.	137
5.2.3.5	4-Nitrosophenol, 1,4-Benzochinon und 4-Aminophenol	137
5.2.4	Stabilitäten	138
5.2.4.1	4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin	138
5.2.4.2	Nitrobenzol, Nitrosobenzol, <i>N</i> -Phenylhydroxylamin und Anilin ...	138
5.2.4.3	4-Nitrosophenol und 4-Aminophenol	138
5.2.4.4	4-Nitrosophenol in An- und Abwesenheit von NADH	138
5.2.5	Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Biotransformationsansätze	139

5.3	Ergebnisse	139
5.3.1	HPLC-Analytik	139
5.3.1.1	Detektion von 4-Aminobenzamidoxim und -amidin.....	139
5.3.1.2	Detektion von Nitrosobenzol, <i>N</i> -Phenylhydroxylamin und Anilin.	142
5.3.2	Stabilitäten	144
5.3.2.1	4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin	144
5.3.2.2	Nitrobenzol, Nitrosobenzol, <i>N</i> -Phenylhydroxylamin und Anilin	144
5.3.2.3	4-Nitrosophenol und 4-Aminophenol	147
5.3.3	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien.....	149
5.3.3.1	4-Nitrobenzamidoxim und -amidin.....	149
5.3.3.1.1	Inkubationen mit 4-Nitrobenzamidoxim	150
5.3.3.1.2	Inkubationen mit 4-Nitrobenzamidin.....	150
5.3.3.2	Nitrobenzol	153
5.3.3.3	4-Nitrosophenol	155
5.4	Diskussion	159
5.5	Zusammenfassung	161
6	Zusammenfassung und Ausblick	163
7	Materialien und Geräte	167
7.1	Substanzen und sonstige Materialien.....	167
7.2	Geräte	170

1 Einleitung

1.1 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

1.1.1 Einführung

Bereits 1868 wurde die Hypothese in Form einer mathematischen Gleichung formuliert, dass die biologische Aktivität φ eine Funktion der chemischen Struktur C sei (Brown und Fraser, 1868):

$$\varphi = f(C) \quad (1.1)$$

Charles Richet, der 1913 den Nobelpreis für Medizin erhielt, verglich die Wasserlöslichkeiten einiger Verbindungen mit ihren toxischen Dosen am Hund und postulierte 1893 eine inverse Beziehung zwischen Wasserlöslichkeit und biologischer Aktivität (Richet, 1893). Um 1901 entdeckten Hans Horst Meyer und Charles Ernest Overton unabhängig voneinander, dass ein Zusammenhang zwischen der Fettlöslichkeit und Wirksamkeit von Anästhetika besteht und begründeten die Lipidtheorie der Narkose (Meyer, 1901; Overton, 1901). 1937 untersuchte Louis Hammett den Einfluss eines Substituenten in *meta*- oder *para*-Position am Benzolring auf die Geschwindigkeits- bzw. Gleichgewichtskonstante verschiedener Reaktionen, wie etwa der Ionisation substituerter Benzoesäure-Derivate in Wasser bei 25 °C (Hammett, 1937). Er formulierte folgende Beziehung:

$$\log K = \log K^0 + \sigma\rho \quad (1.2)$$

K ist hierbei die Geschwindigkeits- oder Gleichgewichtskonstante eines substituierten Reaktanden und K^0 die entsprechende Größe des unsubstituierten Reaktanden. σ definierte er als eine Konstante, die vom Substituenten abhängig ist, und ρ als Reaktionskonstante, auf welche sowohl die Reaktionsart als auch das Medium und die Temperatur einen Einfluss haben. Für alle untersuchten Reaktionen bestimmte er die Reaktionskonstante ρ . Außerdem ermittelte er für eine Vielzahl an Substituenten in *meta*- und *para*-Position die Substituenten-Konstante σ , welche später als Hammett-Konstante bezeichnet wurde.

1962 untersuchte Corwin Hansch Zusammenhänge zwischen der biologischen Wirkung unterschiedlich substituerter Phenoxyessigsäuren in Pflanzen und ihrer chemischen Struktur (Hansch *et al.*, 1962). Er erkannte, dass die elektronischen Eigenschaften, charakterisiert durch die Hammett-Konstante σ , einen Einfluss auf die wachstumsfördernde Wirkung dieser Substanzen haben, konnte jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang formulieren. Er postulierte, dass zusätzlich die Konzentrationen der Verbindungen am Wirkort eine Rolle spielen. Diese seien wiederum von der Geschwin-

digkeit, mit der die Substanzen die wässrigen und organischen Kompartimente der Pflanzenzelle durchdringen, abhängig. Um die Fähigkeit der Phenoxyessigsäuren zur Durchquerung der verschiedenen Kompartimente zu quantifizieren, bestimmte er ihre Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten P , wobei C die Konzentration im jeweiligen Kompartiment und α das Ausmaß der Dissoziation in Wasser beschreibt:

$$P = \frac{C_{\text{Oktanol}}}{C_{\text{Wasser}}(1 - \alpha)} \quad (1.3)$$

Er erkannte, dass die Lipophilie einen additiven Molekülparameter darstellt und es sich beim Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten P um die Summe der Beiträge einzelner Gruppen des Moleküls handelt. Zur Vereinfachung definierte er daher den Lipophilieparameter π , wobei X für eine substituierte und H für die unsubstituierte Verbindung steht:

$$\pi = \log P_X - \log P_H \quad (1.4)$$

Ferner vermutete er, dass die Geschwindigkeiten, mit welchen die Phenoxyessigsäuren die Kompartimente durchqueren und den Wirkort erreichen, nicht linear, sondern parabolisch vom Verteilungskoeffizienten abhängen. Basierend auf seinen Erkenntnissen erweiterte er die 1937 von Hammett erstellte Gleichung zu folgendem Term:

$$\log \frac{1}{C} = k\pi + k'\pi^2 + \sigma\rho + k'' \quad (1.5)$$

C ist hierbei diejenige Konzentration der Phenoxyessigsäure, welche ein zuvor genau definiertes Pflanzenwachstum bewirkt. Die Konstante k, k', k'' und ρ wurden mit einem Clary DE-60 Computer bestimmt.

In diesen Arbeiten wird das Fundament quantitativer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) gesehen, welche ganz allgemein versuchen, Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung zu erfassen und quantitativ zu beschreiben (Böhm *et al.*, 2002). Zu den klassischen QSAR-Methoden zählt man heute die Hansch-Analyse und das Free-Wilson-Modell, welche beide im Jahr 1964 begründet wurden.

Ähnlich wie bereits 1962 für Phenoxyessigsäuren beschrieben, führten Hansch und Fujita (1964) Regressionsanalysen durch, welche sie ρ - σ - π -Analysen nannten, um den Einfluss von Substituenten auf die biologische Wirkung zu untersuchen. Hierbei testeten sie die Wirkung verschiedener Benzoesäure-Derivate auf Mückenlarven, von Phenolen auf gram-positive und -negative Bakterien, von Phenylethylphosphat-Insektiziden auf Stubenfliegen, von Thyroxin-Derivaten auf Nager, Diethylaminoethylbenzoaten auf Meerschweinchen und kanzerogenen Verbindungen auf Mäuse. Das von ihnen entwickelte mathematische Modell zur Beschreibung der Zusammenhänge zwischen biologischer Aktivität und chemischer Struktur ließ sich auf die untersuchten Substanzklassen und Wirkweisen anwenden und wird seitdem als Hansch-Analyse be-

zeichnet:

$$\log \frac{1}{C} = -k_1(\log P)^2 + k_2 \log P + k_3 \sigma + \dots k \quad (1.6)$$

C ist hierbei diejenige Konzentration, die einen bestimmten biologischen Effekt hervorruft. Die Punkte \dots deuten an, dass neben der Lipophilie oder den elektronischen Eigenschaften, welche durch P bzw. σ berücksichtigt werden, auch weitere Parameter wie die Polarisierbarkeit, sterische Effekte etc. verwendet werden können. Die Koeffizienten $k_1, k_2, k_3, \dots k$ werden mittels Regressionsanalyse bestimmt (Böhm *et al.*, 2002).

Free und Wilson (1964) postulierten, dass Struktur-Aktivitäts-Beziehungen einer Serie chemisch analoger Verbindungen durch folgendes Modell beschrieben werden können:

$$\log \frac{1}{C} = \sum_i a_i + \mu \quad (1.7)$$

Ihr Modell beruht auf der Annahme, dass die unsubstituierte Ausgangsverbindung einen bestimmten Beitrag, μ , zur biologischen Wirkung liefert, welcher durch additive Beiträge verschiedener Substituenten, a_i , ergänzt wird (Böhm *et al.*, 2002).

Im Rahmen der klassischen QSAR-Methoden wird zwar beispielsweise die unterschiedliche Position der Substituenten berücksichtigt, jedoch spielt die Raumstruktur der Moleküle insgesamt eine untergeordnete Rolle. Im Unterschied dazu beruhen 3D-QSAR-Methoden auf Kenngrößen, die aus der Raumstruktur abgeleitet werden können, und haben zumeist das Ziel, Bindungsaffinitäten zu bestimmen.

Von Cramer *et al.* (1988) wurde mit der CoMFA-Methode (*comparative molecular field analysis*, vergleichende molekulare Feld-Analyse) das erste 3D-QSAR-Verfahren etabliert. Das Grundprinzip dieser Methode beruht darauf, dass die biologischen Eigenschaften mit Feld-Eigenschaften der Moleküle im Raum korreliert werden (Kubinyi, 1994).

Im Bereich der Arzneimittelforschung spielen QSAR-Studien heutzutage vor allem beim Prozess der Leitstrukturoptimierung eine wichtige Rolle (Böhm *et al.*, 2002). Darüber hinaus können diese Methoden im Rahmen der Zulassung von Chemikalien zum Einsatz kommen, um toxische Wirkeigenschaften vorherzusagen bzw. abzuschätzen und letztlich die Zahl erforderlicher Tierversuche zu minimieren (Fent, 2003).

1.1.2 Parameter zur Beschreibung von biologischer Wirkung und physikochemischen Eigenschaften

QSAR-Studien haben das Ziel, Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung quantitativ zu beschreiben. Um dies zu ermöglichen, sind Parameter notwendig, welche die Struktur einer Verbindung und ihre Wirkung im biologischen System in Form reiner Zahlenwerte beschreiben. QSAR-Studien werden in der Regel mit Verbindungen einer chemisch einheitlichen Serie durchgeführt, welche sich strukturell nur in den Substituenten unterscheiden, und alle am gleichen Target angreifen. Zur Beschreibung der chemischen Struktur können daher stellvertretend

die physikochemischen Eigenschaften der Substituenten genutzt werden. Verschiedene Substituenten-Konstanten wurden definiert, tabellarisch zusammengefasst und somit für Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zugänglich gemacht (Hansch und Leo, 1979). Die biologische Wirkung einer chemischen Substanz wird durch eine Konzentration charakterisiert, welche einen definierten biologischen Effekt hervorruft und experimentell bestimmt wird. Tabelle 1.1 liefert eine Übersicht möglicher Parameter zur Beschreibung der biologischen Wirkung und chemischen Struktur, welche im Rahmen von QSAR-Studien genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten zur Charakterisierung der chemischen Struktur die elektronischen Eigenschaften sowie die Lipophilie der Substituenten und zur Beschreibung der biologischen Wirkung die kinetischen Parameter einer enzymatischen Reaktion verwendet werden. Nachfolgend sollen diese Größen daher genauer vorgestellt werden.

Die elektronischen Eigenschaften eines Substituenten in *meta*- oder *para*-Position einer aromatischen Verbindung werden durch die Hammett-Konstante σ charakterisiert, welche folgendermaßen definiert ist (Hansch und Leo, 1979):

$$\sigma = \log K_X - \log K_H \quad (1.8)$$

K_H ist hierbei die Ionisationskonstante von Benzoesäure bei 25 °C in Wasser und K_X die Ionisationskonstante eines in *meta*- oder *para*-Position substituierten Benzoesäure-Derivats unter identischen experimentellen Bedingungen. Elektronenziehende Substituenten stabilisieren das Carboxylat-Anion, welches entsteht, wenn Benzoesäure ein Proton abgibt und begünstigen somit die Ionisation. In diesem Falle ist K_X größer als K_H und es resultiert eine positive Hammett-Konstante. Umgekehrt erschweren elektronenschiebende Substituenten die Abgabe eines Protons und Bildung des Carboxylat-Anions. K_X ist dann kleiner als K_H und σ nimmt einen negativen Wert an. Somit haben Substituenten, die stärker elektronenziehend sind als ein Wasserstoff, positive σ -Werte und Substituenten, die stärker elektronenschiebend sind als Wasserstoff, negative Hammett-Konstanten.

Die Hansch'sche Hydrophobiekonstante π , deren Definition bereits in Formel (1.4) angegeben wurde, beschreibt, ob ein beliebiger Substituent im Vergleich zu einem Wasserstoff die Lipophilie eines Moleküls erhöht oder erniedrigt (Hansch und Leo, 1979). Erhöht der Substituent die Lipophilie einer Verbindung, so bevorzugt diese das organische Kompartiment, der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der substituierten Verbindung ist größer als der der unsubstituierten Verbindung und π nimmt einen positiven Wert an. Die Hansch'sche Hydrophobiekonstante kann ferner genutzt werden, um die Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten neuer Verbindungen zu berechnen, sofern die Lipophilie des Grundgerüsts sowie aller Substituenten bekannt ist (Böhm *et al.*, 2002).

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion ist definiert als Veränderung der Substrat- bzw. Produktkonzentration je Zeiteinheit. Besteht ein hyperboler Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit V und Substratkonzentration

Chemische Struktur ^[a]		Biologische Wirkung ^[b]	
Parameter	Charakterisierte Eigenschaft	Parameter	Definition
Hammett-Konstante (σ)	elektronenziehend bzw. elektronenschiebend	Hemmkonstante (K_i)	Inhibitorkonzentration, die eine Halbierung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion bewirkt ^[c]
Hansch-Konstante (π)	Lipophilie	Michaelis-Menten-Konstante (K_M)	Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit ^[c]
Taft-Konstante (E_s)	sterische Effekte	<i>Dosis letalis 50</i> (LD_{50})	Dosis, bei welcher 50 % der Versuchstiere sterben ^[d]
Molrefraktion (MR)	Polarisierbarkeit	inhibitorische Konzentration (IC_{50})	Ligandkonzentration, bei der die Aktivität eines Proteins auf die Hälfte abgesunken ist ^[e]

Tabelle 1.1: Beispiele für Parameter zur Beschreibung der chemischen Struktur bzw. biologischen Wirkung von chemischen Verbindungen im Rahmen von QSAR-Studien

[a] Von Hansch und Leo (1979) für zahlreiche Substituenten tabellarisch zusammengefasst, [b] experimentell zu bestimmen, [c] nach Löffler (2007), [d] nach Mutschler (2012), [e] nach Böhm *et al.* (2002)

on S , kann die Kinetik der enzymatischen Reaktion mithilfe des Michaelis-Menten-Modells beschrieben werden:

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{S + K_M} \quad (1.9)$$

Charakteristische Größen dieses Modells sind die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} sowie die Michaelis-Menten-Konstante K_M . K_M gibt die Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, und ist ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat, wobei ein geringer K_M -Wert eine hohe Affinität anzeigt und umgekehrt (Löffler, 2007).

1.2 Molybdoenzyme

1.2.1 Einführung

Das Element Molybdän (Mo) mit der Ordnungszahl 42 zählt zu den d-Block-Metallen. Hier stellt es das einzige essentielle 4d-Metall dar, wobei es in Form von Molybdat vom Organismus aufgenommen wird. Molybdän selbst ist biologisch inaktiv, jedoch wesentlicher Bestandteil der Cofaktoren von Molybdoenzymen, welche von essentieller Bedeutung im Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoff-Stoffwechsel von Lebewesen sind (Mendel und Bittner, 2006).

Mehr als 50 Molybdoenzyme, zumeist bakteriellen Ursprungs, wurden bisher identifiziert. Im aktiven Zentrum ist Molybdän an ein Pterin-Gerüst gebunden, wobei die Kombination beider Bestandteile den Molybdäncofaktor (Moco) ergibt. Eine Ausnahme bildet lediglich die bakterielle Nitrogenase. Diese enthält einen FeMo-Cofaktor, der aus MoFe_3S_3 und Fe_4S_3 verbunden über drei Sulfidbrücken besteht, und katalysiert die Umwandlung von molekularem Stickstoff zu Ammoniak.

Eukaryotische Molybdoenzyme werden anhand der Struktur des Moco in zwei Klassen eingeteilt (s. Abbildung 1.1):

Xanthinoxidase-Familie	Sulfitoxidase-Familie
Xanthinoxidoreduktase	Sulfitoxidase
Aldehydoxidase	Nitratreduktase
Pyridoxaloxidase	mARC
Nicotinathydroxylase	

Allgemein katalysieren Molybdoenzyme die Übertragung eines Sauerstoffatoms zwischen Molybdän und Substrat, gekoppelt mit einer zwei-Elektronen-Oxidation bzw. Reduktion des Molybdäns, wobei die Oxidationsstufe des Molybdäns zwischen +IV und +VI variiert. Je nach Enzym kann das Substrat hierbei sowohl organischer als auch anorganischer Natur sein (Bernhardt, 2011). Mit Ausnahme von mARC und der pflanzlichen Sulfitoxidase weisen alle eukaryotischen Molybdoenzyme neben dem Molybdäncofaktor weitere Redoxzentren wie etwa Häm-, FAD- oder Fe-S-Domänen auf (s. Abbildung 1.2).

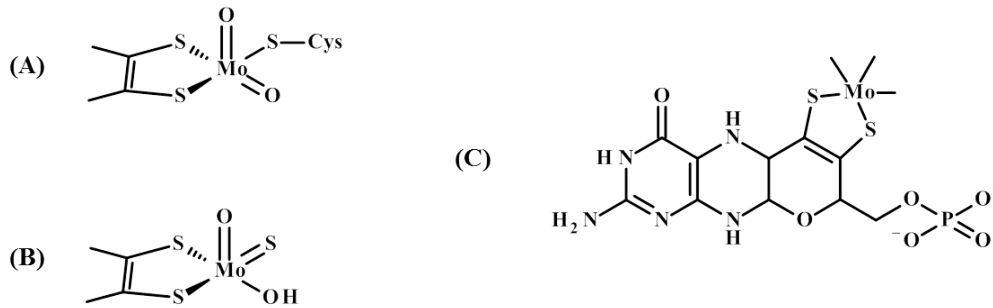


Abbildung 1.1: Strukturelle Unterschiede zwischen dem Molybdäncofaktor (C) der Sulfitoxidase-Familie (A) und Xanthinoxidase-Familie (B)

Nach Havemeyer *et al.* (2011)

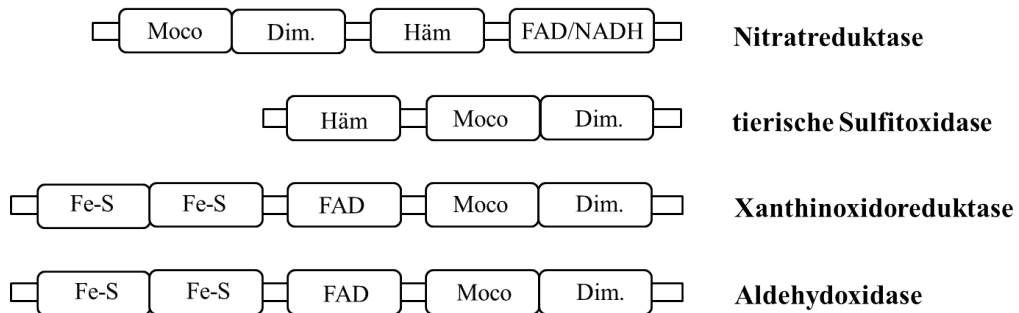


Abbildung 1.2: Domänenstruktur eukaryotischer Molybdoenzyme

Nach Mendel und Kruse (2012), Dim. = Dimerisierungsdomäne

Pyridoxaloxidase und Nicotinahydroxylase wurden bisher nur in *Drosophila melanogaster* (Warner und Finnerty, 1981) bzw. *Aspergillus nidulans* (Lewis *et al.*, 1978) beschrieben. Die Nitratreduktase spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Stickstoff-Assimilation und kommt daher nur in autotrophen Organismen wie Pflanzen, Algen und Pilzen vor. Die übrigen Vertreter wurden in allen bisher analysierten Eukaryoten detektiert.

Die Xanthinoxidoreduktase katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure und ist somit am Purin-Metabolismus beteiligt (Hille und Nishino, 1995). Die Aldehydoxidase katalysiert die Oxidation einer Vielzahl aromatischer und nichtaromatischer Heterocyclen und Aldehyde, wobei diese in die korrespondierenden Carbonsäuren überführt werden. Die Sulfitoxidase ist am Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren beteiligt und katalysiert hier die Oxidation von Sulfit zu Sulfat (Mendel und Bittner, 2006). Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) wurde kürzlich von Havemeyer *et al.* (2006) identifiziert und bildet gemeinsam mit Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase ein Enzymsystem, welches die Reduktion einer Vielzahl *N*-hydroxylierter bzw. *N*-oxygenierter Verbindungen wie etwa Amidoximen, *N*-Hydroxyguanidinen, Oximen oder *N*-Oxiden katalysiert (Gruenewald *et al.*, 2008; Jakobs *et al.*, 2014a).

1.2.2 Molybdäncofaktor

Johnson *et al.* (1980) charakterisierten den Molybdäncofaktor der Sulfitoxidase, Xanthinoxidoreduktase und Nitratreduktase und konnten zeigen, dass dieser in seiner aktiven Form aus der reduzierten Form eines Pterin-Gerüsts und Molybdän zusammengesetzt ist, was später mittels Kristallstrukturanalysen an Molybdoenzymen bestätigt wurde (Kisker *et al.*, 1997). Der Molybdäncofaktor ist oxidationsempfindlich und somit instabil (Stallmeyer *et al.*, 1999). Viele Arbeiten zur Aufklärung der Struktur wurden daher an Abbau- bzw. Oxidationsprodukten durchgeführt. Wird Moco aus einem Molybdoenzym freigesetzt, löst sich das Molybdän vom Pterin-Gerüst, welches oxidiert wird. Ohne ihren Molybdäncofaktor weisen Molybdoenzyme keine katalytische Aktivität auf (Mendel und Bittner, 2006).

Kristallstrukturanalysen zeigten, dass der Moco im Falle der Sulfitoxidase und Nitratreduktase nicht an der Oberfläche des Proteins, sondern im Inneren lokalisiert und für das Substrat durch eine Art Tunnel-Struktur zugänglich ist (Kisker *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2005). Im Falle von mARC wird dahingegen aufgrund erster Experimente von einer Lokalisation des Molybdäncofaktors an der Oberfläche des Proteins ausgegangen.

In allen bisher untersuchten Organismen erfolgt die Biosynthese des Molybdäncofaktors über einen konservierten Stoffwechselweg, der entsprechend der Bildung von PrecursorZ, MPT, MPT-AMP und Moco in vier Abschnitte untergliedert werden kann (s. Abbildung 1.3). Im Menschen sind sechs Genprodukte an der Katalyse beteiligt, welche entsprechend der MOCS-Nomenklatur (*molybdenum cofactor synthesis*) benannt sind (Stallmeyer *et al.*, 1999).

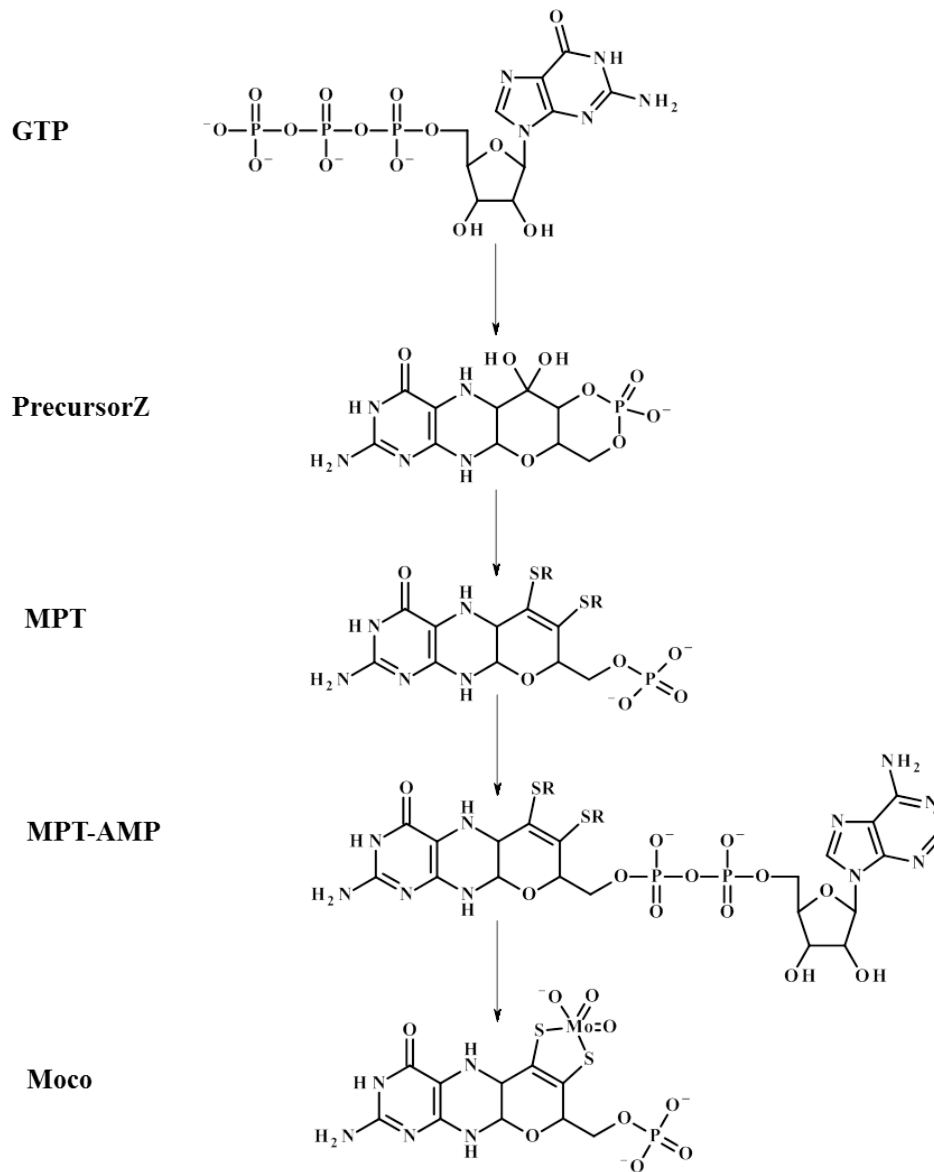


Abbildung 1.3: Biosynthese des eukaryotischen Molybdäncofaktors

Nach Mendel und Bittner (2006)

Die Liganden des Schwefels sind mit R gekennzeichnet, da bisher ungeklärt ist, in welchem Schritt Kupfer an das Dithiolat gebunden wird. GTP = Guanosintriphosphat, MPT = Molybdopterin, MPT-AMP = adenyliertes MPT, Moco = Molybdäncofaktor

Da der Molybdäncofaktor in ungebundener Form in wässriger Lösung extrem instabil ist, wird vermutet, dass innerhalb der Zelle kein freier Moco vorliegt, sondern dieser sofort nach seiner Biosynthese in das entsprechende Apoprotein eingebaut oder an ein Moco Carrierprotein (MCP) gebunden wird (Rajagopalan und Johnson, 1992; Mendel und Bittner, 2006). Ein solches MCP wurde im Bereich der Eukaryoten von Aguilar *et al.* (1992) für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben.

Unklar ist bisher, auf welche Weise der Einbau des Molybdäncofaktors ins Apoprotein erfolgt. Diskutiert wird, dass hierfür Chaperone oder Moco Carrierproteine verantwortlich sind (Mendel und Bittner, 2006). Entsprechende Chaperone wurden für einige bakterielle Molybdoenzyme beschrieben, etwa NarJ im Falle der Nitratreduktase aus *E. coli* (Blasco *et al.*, 1998) oder XDHC für die Xanthinoxidoreduktase aus *Rhodobacter capsulatus* (Ivanov *et al.*, 2003).

Während Molybdoenzyme aus der Familie der Sulfitoxidase direkt durch Einbau des Molybdäncofaktors ins Apoprotein aktiviert werden, ist bei Mitgliedern der Xanthinoxidase-Familie ein weiterer Schritt erforderlich. Während oder nach Einbau des Molybdäncofaktors erfolgt im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation die Koordination eines Sulfido-Liganden, dessen Anwesenheit essentiell ist für die Aktivität des Enzyms (Mendel und Bittner, 2006). Eine *in vitro* Behandlung des Enzyms mit Cyanid führt zum Verlust des Schwefels und folglich zur Inaktivierung. Durch Zugabe von Sulfid unter reduzierenden Bedingungen kann die Enzymaktivität wieder hergestellt werden (Massey und Edmondson, 1970). *In vivo* erfolgt der Einbau des für die Aktivität essentiellen Schwefels im Rahmen einer enzymatischen Reaktion, welche durch die Moco Sulfurase (ABA3 in Pflanzen bzw. HMCS im Menschen) katalysiert wird (Mendel und Kruse, 2012).

Die außerordentliche Bedeutung von Molybdoenzymen für den Menschen ist daran zu erkennen, dass eine Molybdäncofaktor-Defizienz, bedingt durch eine erbliche Störung mit einer Inzidenz unter 1:100.000, in der Regel bereits im frühen Kindesalter zum Tod führt (Mendel und Kruse, 2012). Ursachen einer solchen Defizienz sind Mutationen in den Genen MOCS1, MOCS2 und Gephyrin, deren Genprodukte essentielle Bedeutung für die Moco-Biosynthese haben (Reiss und Johnson, 2003).

Bei der Mehrzahl der Patienten besteht bereits im ersten Schritt der Moco-Biosynthese, der Bildung des PrecursorZ aus GTP, ein Defekt. Da PrecursorZ stabiler ist als der Molybdäncofaktor selbst und die nachfolgenden Schritte der Biosynthese nicht betroffen sind, konnte zunächst an einer Moco-defizienten Maus gezeigt werden, dass die regelmäßige Injektion von PrecursorZ zu einer deutlichen Verlängerung der Lebenszeit führt (Schwarz *et al.*, 2004). Von Veldman *et al.* (2010) wurde erstmals die erfolgreiche Behandlung eines betroffenen Patienten beschrieben, bei dem die Erkrankung im Alter von 6 Tagen diagnostiziert und eine Therapie mit PrecursorZ im Alter von 36 Tagen begonnen wurde.

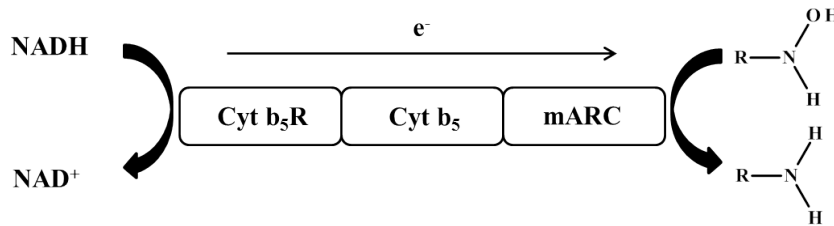


Abbildung 1.4: Das mARC-haltige, *N*-reduktive Enzymsystem

mARC: mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente, Cyt b₅: Cytochrom b₅, Cyt b₅R: Cytochrom b₅ Reduktase

1.3 mARC-Enzymsystem

1.3.1 Einführung

Das Molybdoenzym mARC bildet gemeinsam mit Cytochrom b₅ B und der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase 3 ein Enzymsystem, welches die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen unterschiedlicher Struktur katalysiert (s. Abbildung 1.4).

Die physiologische Bedeutung des Enzymsystems ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher beschrieben ist, dass das Enzymsystem an der Detoxifizierung *N*-hydroxylierter DNA-Basenanaloga beteiligt ist (Krompholz *et al.*, 2012). Kotthaus *et al.* (2011) konnten zeigen, dass die Reduktion von *N*^ω-Hydroxy-L-Arginin zu Arginin durch das mARC-Enzymsystem katalysiert wird, was auf regulatorische Funktionen im Rahmen der NO-Biosynthese hindeuten könnte. Ferner spielt das Enzymsystem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Amidoxim- oder *N*-Hydroxyguanidin-Prodrugs (Gruenewald *et al.*, 2008). Die rekombinante Herstellung aller drei Komponenten wurde etabliert und optimiert und ermöglicht heute die Durchführung von *in vitro* Biotransformationsstudien am humanen rekonstituierten Enzymsystem (Wahl *et al.*, 2010; Plitzko, 2010). Anhand von Knockdown-Studien konnte bestätigt werden, dass mARC, mitochondriales Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅ Reduktase 3 zur Katalyse der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in humanen Zellen erforderlich sind (Neve *et al.*, 2012; Plitzko *et al.*, 2013; Plitzko, 2014).

1.3.2 mARC

Von Havemeyer *et al.* (2006) wurde ein molybdänhaltiges Protein aus der äußeren mitochondrialen Membran der Schweineleber gereinigt und als bis dahin unbekanntes dritte Komponente eines *N*-reduktiven Enzymsystems identifiziert. Durch tryptischen Verdau und ESI-MS/MS wurde die Sequenz des Proteins analysiert und eine Übereinstimmung mit der Sequenz des putativen humanen Proteins Moco Sulfurase C-terminale Domäne 2 (NP_060368) detektiert. Aufgrund seiner Lokalisation und

katalytischen Fähigkeit wurde dieses Protein fortan als mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) bezeichnet.

Das humane Genom enthält zwei mARC-Gene, MOSC1 und MOSC2, welche auf Chromosom 1 (1q41) lokalisiert sind und eine hohe Sequenzidentität von 66 % bzw. Sequenzähnlichkeit von 80 % aufweisen (Wahl *et al.*, 2010). Diese codieren für mARC1, bestehend aus 337 Aminosäuren, bzw. mARC2, bestehend aus 335 Aminosäuren. Neben einer *N*-terminalen mitochondrialen Targeting-Sequenz wurden für beide Isoformen eine β -barrel-Domäne sowie eine MOSC-Domäne in der Nähe des C-Terminus vorhergesagt. Die MOSC-Domäne wurde *in silico* von Anantharaman und Aravind (2002) beschrieben und ist u.a. durch ein konserviertes Cystein charakterisiert, welches für die Koordination des Molybdäncofaktors an das Apoprotein essentiell ist (Ott *et al.*, 2014a; Giles *et al.*, 2014).

Wie der Name mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente bereits andeutet, wird von einer Lokalisation innerhalb der Mitochondrien bzw. assoziiert mit mitochondrialen Strukturen ausgegangen. Allerdings ist die subzelluläre Lokalisation noch nicht abschließend aufgeklärt (Hille *et al.*, 2011). So konnten Havemeyer *et al.* (2006) mARC2 aus der äußeren mitochondrialen Membran der Schweineleber isolieren, während Da Cruz *et al.* (2003) in der Maus die Lokalisation von mARC1 und mARC2 innerhalb der inneren mitochondrialen Membran beschreiben. Neben der mitochondrialen Lokalisation konnte mARC2 von Islinger *et al.* (2007) in Peroxisomen der Rattenleber und von Wiese *et al.* (2007) in Peroxisomen der Mäuseniere detektiert werden. Studien von Klein *et al.* (2012) an verschiedenen humanen Zelllinien führten zu dem Ergebnis, dass es sich bei mARC1 um ein Protein der äußeren mitochondrialen Membran mit $N_{(in)}-C_{(out)}$ -Orientierung handelt.

Die hepatische und extrahepatische Expression von mARC wurde von Krischkowski (2010) anhand verschiedener subzellulärer Fraktionen porcinen Ursprungs mittels Westernblot-Analyse untersucht. Zusätzlich wurden die *N*-reduktiven Aktivitäten der Fraktionen durch Inkubation verschiedener mARC-Substrate und nachfolgender Quantifizierung der Metabolite mittels HPLC-Analytik bestimmt. Insbesondere in den Fraktionen der Leber, Niere und Schilddrüse wurden hierbei hohe *N*-reduktive Aktivitäten ermittelt (Krompholz *et al.*, 2012).

Während die Beteiligung von mARC an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen durch das mARC-Enzymsystem, bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, bereits allgemein akzeptiert ist und anhand zahlreicher Studien beschrieben wurde, ist die physiologische Funktion von mARC noch weitestgehend unklar. Eine verminderte Expression von mARC2 in Gewebeproben von Patienten mit Kolonkarzinom konnte von Mikula *et al.* (2010) gezeigt werden, während von Malik *et al.* (2007) eine erhöhte Expression von mARC2 in der Niere diabetischer Ratten sowie in humanen mesangialen Zelllinien, die unter Hochglukose-Bedingungen kultiviert wurden, beschrieben wurde. Mit Fortschreiten der Differenzierung muriner 3T3-L1 Zellen zu ausgereiften Adipozyten konnten Neve *et al.* (2012) steigende mARC2-Spiegel detektieren. Diskutiert wird daher neben der Beteiligung von mARC an der Detoxifizierung mutagener Verbindungen wie *N*-hydroxylierten DNA-Basenanaloga,

ein Zusammenhang zwischen mARC und Diabetes sowie der Lipogenese.

Eine Verknüpfung von mARC mit dem Fett- und Energiestoffwechsel konnte anhand verschiedener Zellkulturstudien sowie Mausmodellen gezeigt werden (Jakobs, 2014; Jakobs *et al.*, 2014b) und steht in Einklang mit dem Phänotyp der kürzlich im Rahmen des *International Mouse Phenotyping Consortium* erstellten mARC2-Knockout-Maus, welche einen verminderten Körperfettanteil sowie erhöhte fettfreie Körpermasse aufweist (Brown und Moore, 2012).

1.3.3 Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ ist ein Häm-haltiges Elektronentransferprotein, welches an Prozessen beteiligt ist, die mit der Aufnahme bzw. Abgabe eines einzelnen Elektrons einhergehen. Strukturell gesehen handelt es sich um ein integrales Membranprotein mit cytosolisch aktiver Domäne und einem kurzen Membrananker, der posttranslational in die Zielmembranen eingefügt wird (Borgese *et al.*, 1993).

Das humane Genom beinhaltet zwei Gene, die für zwei verschiedene Isoformen codieren: Mitochondriales Cytochrom b₅ (Cytochrom b₅ B) liegt gebunden an der äußeren mitochondrialen Membran vor, während mikrosomales Cytochrom b₅ (Cytochrom b₅ A) am endoplasmatischen Retikulum gebunden ist. Durch alternatives Spleißen liefert das Gen, welches für die mikrosomale Isoform codiert, zusätzlich eine lösliche Form. Diese ist in den Erythrozyten lokalisiert und an der Reduktion von Methämoglobin beteiligt. Mikrosomales Cytochrom b₅ kann ein Elektron von der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase oder NADPH-Cytochrom P450 Reduktase aufnehmen und im Rahmen der Biosynthese verschiedener Lipide sowie im Reaktionszyklus von P450 Enzymen zur Verfügung stellen (Vergères und Waskell, 1995).

Von Neve *et al.* (2012) und Plitzko *et al.* (2013) wurde beschrieben, dass neben mARC und der Cytochrom b₅ Reduktase, mitochondriales, nicht aber mikrosomales Cytochrom b₅ von essentieller Bedeutung für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ist. Neve *et al.* (2012) konnten dies mittels siRNA-vermitteltem Knockdown in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten und Plitzko *et al.* (2013) in HEK-293-Zellen zeigen. Durch Vergleich der *N*-reduktiven Aktivitäten im rekonstituierten Dreikomponentensystem, bestehend aus mARC, Cytochrom b₅ Reduktase und Holocytochrom b₅ B sowie Apocytochrom b₅ B, konnte ferner die Beteiligung des Häms am Elektronentransport im mARC-Enzymsystem bestätigt werden (Plitzko *et al.*, 2013).

1.3.4 Cytochrom b₅ Reduktase

Cytochrom b₅ Reduktase ist ein FAD-haltiges Protein, welches Elektronen vom zwei-Elektronendonator NADH auf den ein-Elektronenakzeptor Cytochrom b₅ überträgt (Kimura *et al.*, 2003). Neben einer membrangebundenen Form, welche am endoplasmatischen Retikulum und der äußeren mitochondrialen Membran vorliegt, existiert eine lösliche Form, die in den Erythrozyten lokalisiert ist. Beide Formen stammen von einem Gen ab (Borgese *et al.*, 1993; Leroux *et al.*, 2001).

Strukturell unterscheiden sich membrangebundene und lösliche Form nur in einem Myristyl-Anker am *N*-Terminus, welcher im Falle der löslichen Form der Cytochrom b_5 Reduktase nicht vorhanden ist (Shirabe *et al.*, 1995). Die lösliche Isoform ist in den Erythrozyten lokalisiert und gemeinsam mit Cytochrom b_5 für die Reduktion von Methämoglobin verantwortlich (Leroux *et al.*, 2001), während die membrangebundene Isoform an der Desaturierung und Elongation von Fettsäuren (Oshino *et al.*, 1971; Keyes und Cinti, 1980), der Cholesterinbiosynthese (Reddy *et al.*, 1977) und der Oxidation von Xenobiotika beteiligt ist (Hildebrandt und Estabrook, 1971).

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen am mARC-Enzymsystem untersucht werden. Das mARC-Enzymsystem katalysiert die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen und ist essentiell für die Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs *in vivo*.

Ziel der Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen der chemischen Struktur der Substrate und dem Ausmaß der *N*-Reduktion aufzudecken, um so die rationale Entwicklung neuer Amidoxim-Prodrugs zu optimieren.

Anhand unterschiedlich substituierter Derivate des Modellsubstrates Benzamidoxim sollte zunächst der Einfluss des Substituenten auf die physikochemischen Eigenschaften der Amidoximfunktion, stellvertretend dargestellt durch die chemischen Verschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ und die Redoxpotentiale, sowie die kinetischen Parameter K_M und V_{\max} der enzymkatalysierten Reduktion ermittelt werden. Im nächsten Schritt sollte die enzymatische und elektrochemische Reduktion dieser Substrate verglichen werden. Ergänzt durch Studien zur Bestimmung des Redoxpotentials von mARC sollten so neue Erkenntnisse über den bisher hypothetischen Mechanismus der *N*-Reduktion des mARC-Enzymsystems gewonnen werden.

Die mARC-katalysierte *N*-Reduktion von zwei *N*-hydroxylierten Sulfonamiden, bei denen es sich um Entwicklungsprodukte aus dem Bereich der HNO-Donoren zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen handelt, sollte charakterisiert werden. Hierbei sollte analysiert werden, ob Ansätze für Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erkennen sind, welche bei der Substanzauswahl für breiter angelegte QSAR-Studien helfen und somit einen Beitrag bei der Entwicklung und Optimierung neuartiger HNO-Donoren liefern.

Ferner sollte untersucht werden, ob das mARC-Enzymsystem an der Reduktion aromatischer Nitro- bzw. Nitrosoverbindungen beteiligt ist.

2 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime

2.1 Einleitung

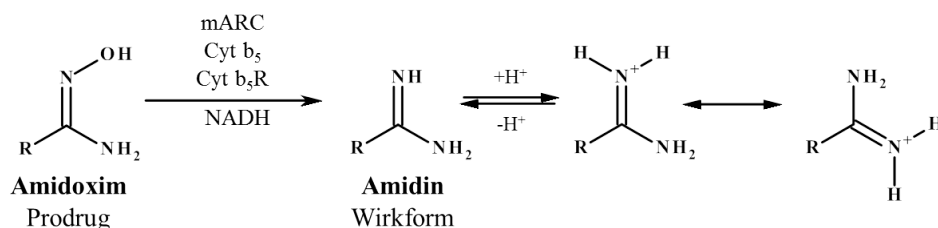
2.1.1 Amidoxim-Prodrugprinzip

Zahlreiche Arzneistoffe zur Therapie von Erkrankungen unterschiedlichster Bereiche wie etwa der afrikanischen Schlafkrankheit, Malaria, aber auch Krebserkrankungen weisen Amidinfunktionen auf (Soeiro *et al.*, 2013; Froriep *et al.*, 2013). Amidine sind stark basisch und liegen bei physiologischem pH-Wert protoniert vor (Albert *et al.*, 1948; Clement und Lopian, 2003). Somit können zwar starke Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen, protonierten Amidinfunktionen und beispielsweise negativ geladenen, deprotonierten Carboxylfunktionen innerhalb der Target-Strukturen erzielt werden, andererseits erschwert die positive Ladung der Amidin-Arzneistoffe die Aufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt und führt somit zu einer eingeschränkten oralen Bioverfügbarkeit.

Zur Förderung der Compliance und Vereinfachung der Pharmakotherapie ist die orale Gabe von Arzneistoffen häufig erwünscht. Um Arzneistoffe, die aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht ausreichend aus dem Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, oral bioverfügbar zu machen, können diese in Prodrugs überführt werden. Hierunter versteht man inaktive Vorstufen eines Arzneistoffes, die erst durch Bioaktivierung im Körper in die Wirkform überführt werden.

Amidin-haltige Arzneistoffe können mithilfe der Amidoxim-Prodrug Strategie in Prodrugs, welche eine orale Pharmakotherapie ermöglichen, überführt werden (Clement, 2002). Im Unterschied zu Amidinen liegen Amidoxime unter physiologischen Bedingungen nicht protoniert und somit ungeladen vor, da durch Einführung des elektronegativen Sauerstoffatoms die Basizität gesenkt wird. Amidoxime können daher bei oraler Gabe aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden.

Stellt das Amidoxim ein Substrat des mARC-Enzymsystems dar, erfolgt im Körper die Reduktion zur Amidin-Wirkform (s. Abbildung 2.1). Das Amidoxim-Prodrugprinzip wurde von Clement und Raether (1985) an Pentamidin etabliert und seitdem auf zahlreiche weitere Amidin-Arzneistoffe übertragen.

Abbildung 2.1: Amidoxim-Prodrugprinzip nach Havemeyer *et al.* (2011)

2.1.2 Zielsetzung

Seit der Identifizierung von mARC als dritter Komponente eines *N*-reduktiven Enzymsystems, bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, durch Havemeyer *et al.* (2006), wurde die Bioaktivierung zahlreicher, strukturell unterschiedlicher Amidoxim-Prodrugs sowohl anhand hepatischer Subfraktionen als auch am optimierten, rekonstituierten rekombinanten Enzymsystem untersucht (s. Abbildung 2.2) (Havemeyer *et al.*, 2011; Ott *et al.*, 2014a). Alle bisher in unserem Arbeitskreis getesteten Amidoxime wurden durch das mARC-Enzymsystem zu den korrespondierenden Amidinen reduziert, völlig unabhängig ihrer sonstigen strukturellen Beschaffenheit, wobei jedoch Unterschiede im Ausmaß der *N*-reduktiven Aktivität detektiert wurden (Gruenewald *et al.*, 2008; Friepp *et al.*, 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher an Derivaten des Modellsubstrates Benzamidoxim untersucht werden, ob für Reduktionen durch das mARC-Enzymsystem Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bestehen, welche für die rationale Entwicklung neuer Amidoxim-Prodrugs genutzt werden können (s. Abbildung 2.3).

Exemplarisch sollte der Einfluss der elektronischen Eigenschaften des Substituenten in *para*-Position auf die Reduktion getestet werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die elektronischen Eigenheiten der Substituenten tatsächlich eine Auswirkung auf die Amidoximfunktion bzw. deren physikochemischen Eigenschaften haben. Bereits beschrieben wurde eine Korrelation zwischen den Hammett-Konstanten der Substituenten, als Maß für die elektronischen Eigenschaften, und den chemischen Verschiebungen der Amin- und Oxim-Protonen im ^{15}N -NMR, welche letztlich die physikochemischen Eigenschaften der Amidoximfunktion repräsentieren (Girreser *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine entsprechende Korrelationsanalyse mit den chemischen Verschiebungen im ^1H -NMR durchgeführt werden, um die Beziehung zwischen elektronischen Eigenheiten der Substituenten und Physikochemie der Amidoximfunktion als Voraussetzung für Struktur-Aktivitäts-Beziehungen nochmals zu bestätigen.

Anschließend sollte die enzymatische Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime unter Verwendung des mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystems und der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber als Enzymquelle charakterisiert werden. Bei Vorliegen einer Michaelis-Menten-Kinetik

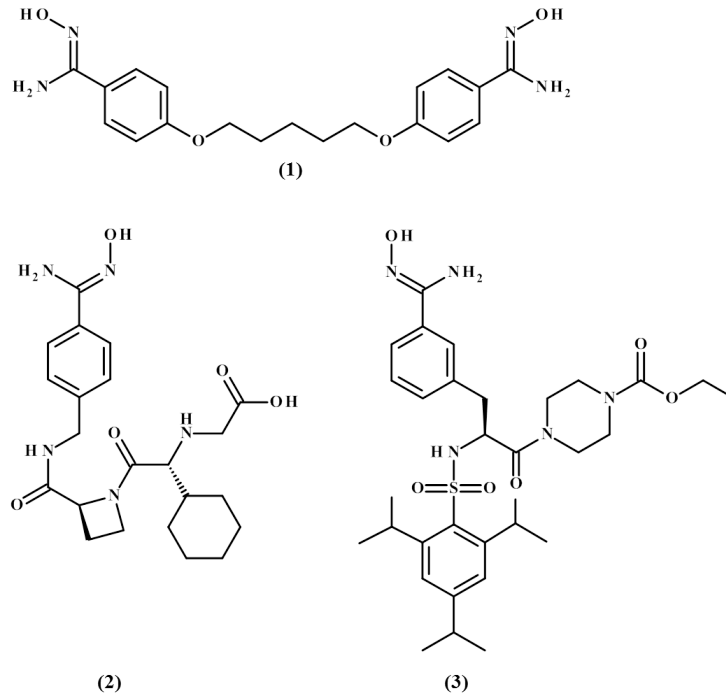
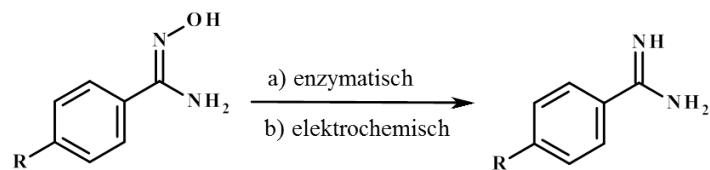


Abbildung 2.2: Beispiele für Amidoxim-Prodrugs

(1) Pentamidin-Diamidoxim, (2) *N*-Hydroxymelagatran, (3) Upamostat (Mesupron[®])

Abbildung 2.3: *N*-Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime

R: H, Br, Cl, CN, NO₂, CF₃, CH₃, OCH₃, NH₂, OH

sollten die enzymkinetischen Parameter bestimmt werden. Mittels Korrelationsanalyse sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Substituenten und den enzymkinetischen Parametern im Sinne von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen besteht.

Neben der enzymatischen Reduktion sollte auch die elektrochemische Reduktion der Verbindungen untersucht werden, um anschließend beide Reduktionswege miteinander zu vergleichen und möglicherweise neue Erkenntnisse über den Mechanismus der *N*-Reduktion zu erlangen. Hierfür sollten die Redoxpotentiale der Verbindungen mittels Differenzieller Puls-Voltammetrie bestimmt und der Einfluss des Substituenten auf die elektrochemische Reduktion anhand einer Korrelationsanalyse geprüft werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Materialien und Geräte

4-Trifluormethylbenzamidoxim und -amidin, 4-Methylbenzamidoxim und -amidin, 4-Aminobenzamidoxim und 4-Methoxybenzamidoxim wurden mir freundlicherweise von Dr. Lehmann (Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Berlin) zur Verfügung gestellt. 4-Brombenzamidoxim, 4-Chlorbenzamidoxim, 4-Cyanobenzamidoxim und 4-Nitrobenzamidoxim wurden im Arbeitskreis bereits für frühere Studien durch Umsetzung des jeweiligen Benzonnitrils mit Hydroxylamin synthetisiert (Girreser *et al.*, 2002). Die zugehörigen Benzamide wurden durch Basen-katalysierte Umsetzung der Benzonnitrile mit Ammoniumchlorid erhalten (Moss *et al.*, 1985). Alle weiteren *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamide, welche untersucht wurden, waren kommerziell erhältlich und sind ebenso wie die übrigen Materialien und Geräte in Kapitel 7 dieser Arbeit aufgeführt.

2.2.2 Gewinnung und Charakterisierung der Proteinquellen

2.2.2.1 Gewinnung der porcinen subzellulären Fraktionen

9000 *g*-Überstand (SL9000g), postnukleärer Überstand (SLPNS) und Mitochondrien (SLMt) wurden mittels Differential- und Dichtegradientenzentrifugationen aus porcinen Lebern gewonnen. Die Organe wurden hierfür von einer lokalen Schlachtereier (Schlachtereier Neidhard, Holtsee) bezogen und anhand im Arbeitskreis etablierter Protokolle bearbeitet (Clement *et al.*, 2005; Havemeyer *et al.*, 2006; Froriep, 2013).

2.2.2.2 Isolierung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion

Ausgehend von den Mitochondrien wurde die äußere mitochondriale Membranfraktion angereichert. Hierfür wurde die Swell-Disruption-Methode mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation nach de Kroon *et al.* (1997) verwendet, welche im Arbeitskreis modifiziert und optimiert wurde (Havemeyer *et al.*, 2006; Froriep, 2013).

2.2.2.3 Rekombinante Proteine des mARC-Enzymsystems

Die Klonierung, Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten humanen Proteine des mARC-Enzymsystems erfolgte im Arbeitskreis Mendel (Technische Universität Braunschweig) nach der Methode von Wahl *et al.* (2010). mARC1 (NP_073583) und mARC2 (NP_060368) wurden im *E. coli* Stamm TP1000 exprimiert und zur Aufreinigung mit einem *N*-terminalen His₆-tag versehen. Beide Proteine wurden *N*-terminal um das mitochondriale Targeting-Signal und somit 51 Aminosäuren im Falle von mARC1 und 50 Aminosäuren im Falle von mARC2 verkürzt.

Die Expression des mitochondrialen Cytochrom b₅ (NP_085056) und der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase 3 (NP_000389) erfolgte im *E. coli* Stamm DL41. Zur Aufreinigung wurde ein *N*-terminaler His₆-tag eingeführt. Die Proteine wurden um den hydrophoben Membrananker verkürzt. Bei Cytochrom b₅ umfasst diese Trunkierung C-terminal 27 Aminosäuren und bei der Cytochrom b₅ Reduktase *N*-terminal 23 Aminosäuren.

2.2.2.4 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der Enzymquellen wurde mit der BCA-Methode bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Hierfür wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 562 nm mit Rinderserumalbumin als Standard zur Kalibrierung.

2.2.2.5 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

Die Reinheit der isolierten Subfraktionen wurde mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und nachfolgendem Western Blot überprüft (Laemmli, 1970).

Folgende Puffer und Gele wurden für die SDS-PAGE verwendet:

Trenngelpuffer 4x, pH 8,8

90,9 g Tris-Base
2,0 g SDS
ad 500 ml *Aqua bidest.*

Sammelgelpuffer 4x, pH 6,8

30,3 g Tris-Base
2,0 g SDS
ad 500 ml *Aqua bidest.*

Trenngel (12,5 %)

4 ml *Aqua bidest.*
3 ml Trenngelpuffer 4x, pH 8,8
5 ml Acrylamid (Rotiphorese[®])
10 µl TEMED
80 µl APS-Lösung (10 % (m/v))

Sammelgel (4,5 %)

2,4 ml *Aqua bidest.*
1 ml Sammelgelpuffer 4x, pH 6,8
0,6 ml Acrylamid (Rotiphorese[®])
6 µl TEMED
25 µl APS-Lösung (10 % (m/v))

Kathodenpuffer

30,3 g Tris-Base
144,1 g Glycin
10,0 g SDS
ad 1000 ml *Aqua bidest.*

4x SDS-Ladepuffer

242 mg Tris-Base
800 mg SDS
4 ml Glycerin 86 %
2 ml β-Mercaptoethanol
2 mg Bromphenolblau
ad 10 ml *Aqua bidest.*

Die Proteinproben wurden mit *Aqua bidest.* auf einen einheitlichen Proteingehalt eingestellt. Drei Teile Proteinlösung wurden mit einem Teil 4x SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min im Wasserbad zur Hitzedenaturierung abgekocht und 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zur Detektion wurde der Molekulargewichtsmarker PageRuler[®] Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 100 V angelegt, welche nach Übertritt der Proteine vom Sammel- ins Trenngel für ca. eine Stunde auf 200 V erhöht wurde. Zur Western Blot-Analyse wurden folgende Puffer verwendet:

Transferpuffer

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

TBS-Puffer

20 mM Tris-Base pH 7,6
137 mM Natriumchlorid

TBST-Puffer

10 % TBS-Puffer (v/v)
0,1 % TWEEN[®] 20 (v/v)

M-TBST-Puffer

5 % Milchpulver (m/v) in TBST

Die Proteine wurden im *wet*-Verfahren auf PVDF-Membranen, welche auf Größe des Gels zugeschnitten waren, übertragen. Ausgehend von der Anodenseite wurden auf ein Vlies zwei Lagen Whatman-Papier, die Membran, das Gel, erneut zwei Lagen Whatman-Papier und ein Vlies gelegt und in einer entsprechenden Kassete eingespannt. Diese wurde ebenso wie ein auf -20 °C gekühltes Coolpack in den Tank eingesetzt, welcher mit Transferpuffer befüllt wurde. Zum Proteinübertrag wurde für zwei Stunden eine Spannung von 90 V angelegt.

Zur immunologischen Detektion wurden im ersten Schritt freie Bindungsstellen der Membran mit Milchpulver geblockt. Hierfür wurde die Membran eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur mit 5 % M-TBST inkubiert. Ebenfalls unter Schütteln wurde die Membran entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Verdünnungen in M-TBST) behandelt.

Folgende Primärantikörper wurden eingesetzt, wobei die verwendeten Verdünnungen bei jedem Versuch der entsprechenden Abbildung zu entnehmen sind:

- anti-GAPDH, Sigma, Taufkirchen, Wirt: Ziege
- anti-VDAC2, acris Antibodies GmbH, Herford, Wirt: Ziege
- anti-mARC1, Abgent, Oxfordshire, UK, Wirt: Kaninchen
- anti-mARC2, Sigma, Taufkirchen, Wirt: Kaninchen
- anti-Cyt b₅ B, Sigma, Taufkirchen, Wirt: Kaninchen
- anti-Cyt b₅R 3, acris Antibodies GmbH, Herford, Wirt: Ziege

Dann wurde die Membran dreimal für 10 min mit 10 ml TBST gewaschen und im nächsten Schritt eine Stunde mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper unter Schütteln inkubiert.

Folgende Sekundärantikörper (1:10.000 in M-TBST) wurden eingesetzt:

- anti-Kaninchen, Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK, Wirt: Ziege
- anti-Ziege, Jackson Immuno Research Laboratories, Suffolk, UK, Wirt: Esel

Es wurde nochmals dreimal mit TBST gewaschen. Abschließend wurde ECLTM Plus Western Blotting Detection Reagenz (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) gemäß Herstellerangaben zugegeben und die auftretende Chemielumineszenz durch Belichtung eines Fotofilms (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) dokumentiert.

2.2.2.6 Bestimmung des Molybdän-Gehalts von mARC

Der Molybdän-Gehalt der rekombinanten mARC-Proteine wurde mittels ICP-MS am Geologischen Institut der CAU Kiel im Arbeitskreis von Dr. Garbe-Schönberg bestimmt, wie von Plitzko (2010) und Kotthaus *et al.* (2011) beschrieben. Die Probenvorbereitung erfolgte allerdings ohne vorheriges Umpuffern (Ott, 2013). Hierfür wurden die Proteine zunächst mit Lagerpuffer pH 7,4 (25 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 % Glycerol (v/v)) auf einen Proteingehalt von 0,5 mg/ml verdünnt. 200 µl dieser Lösungen wurden mit 10 µl Indium (2,5 ppb) als internem Standard und 1790 µl 2 %iger (m/v) oberflächendestillierter Salpetersäure versetzt und durch einen 30 kDa Zentrifugalfilter filtriert (Amicon Ultra 0.5 Ultracel-PL Membrane, Millipore, Darmstadt). Das Filtrat wurde mittels PFA Micro-Nebulizer dem ICP-MS Gerät (Agilent Technologies, Böblingen) zugeführt und vermessen. Zur Kalibrierung wurde eine Single-Element Stock Lösung (Alfa Aesar, Karlsruhe) in den Konzentrationen 5 und 50 ppb eingesetzt. Die Richtigkeit der Methode wurde anhand internationaler Standardreferenzminerale (BIR-1 und BHVO-2) überprüft.

2.2.2.7 Bestimmung des Häm-Gehalts von Cytochrom b₅

Die Bestimmung des Häm-Gehalts erfolgte entsprechend der Methode von Estabrook und Werringloer (1978). Es wurde ein Differenzspektrum aus NADH-reduzierter und oxidierte Form des Proteins aufgenommen und die Differenz der Absorptionswerte bei 426 nm und 409 nm bestimmt. Zur Berechnung des Häm-Gehalts über das Lambert-Beersche Gesetz wurde der molare Absorptionskoeffizient der reduzierten Form des Cytochrom b₅ verwendet ($\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2.2.8 Häm-Saturierung von Cytochrom b₅

Die Saturierung des zuvor rekombinant hergestellten Cytochrom b₅ erfolgte nach einem Verfahren zur Inkorporation von Häm in Apocytochrom b₅ nach Mulrooney und Waskell (2000), welches von Plitzko *et al.* (2013) modifiziert wurde. Hierfür wurde

Cytochrom b_5 mit Aliquots einer Häminchlorid-Lösung versetzt. Nach jeder Zugabe wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich von 350 bis 500 nm aufgenommen. Die Häm-Saturierung wurde als abgeschlossen betrachtet, sobald der Soret Peak bei 413 nm, bedingt durch einen Überschuss an freiem, Tris-gebundenem Häm, in ein Plateau überging.

2.2.2.9 Bestimmung des FAD-Gehalts der Cytochrom b_5 Reduktase

Der FAD-Gehalt der Cytochrom b_5 Reduktase wurde photometrisch nach der Methode von Whitby (1953) bestimmt. Hierfür wurden die Proben mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 auf einen Proteingehalt von etwa 1,5 mg/ml eingestellt und 10 min im Wasserbad abgekocht. Nach Erkalten wurden die Proben 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand photometrisch bei 450 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade. Hierfür wurden FAD-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,01-0,1 $\mu\text{mol/ml}$ hergestellt und vermessen.

2.2.3 HPLC-Analytik

Folgendes System wurde zur HPLC-Analytik verwendet:

Pumpe	Waters 616 Pump
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Integrator	EZChrom Elite, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, United States)

Alle weiteren Parameter zur Beschreibung der HPLC-Methoden sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde stets durch einen Polyamidmembranfilter (0,45 μm , Sartorius AG, Göttingen) filtriert, bevor der organische Anteil (HPLC-Grade) zugegeben und das Gemisch für 15 min im Ultraschallbad entgast wurde.

2.2.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der jeweilige Metabolit in 10 verschiedenen Konzentrationen (0,25-500 μM) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 gelöst und per HPLC vermessen. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte ebenfalls im Konzentrationsbereich von 0,25-500 μM in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Hierbei enthielten alle Ansätze neben dem Metaboliten 50 μg hitzedenaturierte Mitochondrien der Schweineleber, 3 mM des jeweiligen Substrates, 1 mM NADH sowie 5 % DMSO (v/v) in einem Inkubationsvolumen von 150 μl . Es erfolgte zunächst eine 3-minütige Vorinkubation aller Komponenten mit Ausnahme des NADH bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Nach Zugabe des NADH wurde weitere 20 min inkubiert und anschließend mit 150 μl

eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Proben wurden 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände dann per HPLC analysiert.

2.2.3.2 Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin

Die Trennung von Benzamidoxim und Benzamidin sowie die Quantifizierung des Metaboliten Benzamidin wurde mittels der von Clement *et al.* (2005) beschriebenen Methode durchgeführt.

2.2.3.3 Trennung von 4-Chlorbenzamidoxim und 4-Chlorbenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Chlorbenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Nova Pak C18, 4 µm, 3,9 × 300 mm (Waters, Milford, United States) Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	20 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v), pH 4,0/ Acetonitril 80:20 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	15 min
Detektion	243 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Retentionszeiten	3,9 ± 0,1 min (4-Chlorbenzamidin) 7,1 ± 0,1 min (4-Chlorbenzamidoxim)

2.2.3.4 Trennung von 4-Brombenzamidoxim und 4-Brombenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Brombenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Nova Pak C18, 4 µm, 3,9 × 300 mm (Waters, Milford, United States) Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	20 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v), pH 6,0/ Acetonitril 70:30 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	8 min
Detektion	245 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Retentionszeiten	3,1 ± 0,1 min (4-Brombenzamidin) 5,8 ± 0,1 min (4-Brombenzamidoxim)

2.2.3.5 Trennung von 4-Nitrobenzamidoxim und 4-Nitrobenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Nitrobenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Nova Pak C18, 4 μm , 3,9 \times 300 mm (Waters, Milford, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	20 mM KH_2PO_4 , 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v), pH 4,0/ Acetonitril 85:15 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	15 min
Detektion	256 nm
Injektionsvolumen	10 μl
Retentionszeiten	3,7 \pm 0,1 min (4-Nitrobenzamidin) 8,1 \pm 0,1 min (4-Nitrobenzamidoxim)

2.2.3.6 Trennung von 4-Cyanobenzamidoxim und 4-Cyanobenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Cyanobenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Nova Pak C18, 4 μm , 3,9 \times 300 mm (Waters, Milford, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	20 mM KH_2PO_4 , 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v), pH 4,0/ Acetonitril 95:5 (v/v)
Flussrate	0,8 ml/min
Laufzeit	25 min
Detektion	244 nm
Injektionsvolumen	10 μl
Retentionszeiten	8,1 \pm 0,1 min (4-Cyanobenzamidin) 16,4 \pm 0,1 min (4-Cyanobenzamidoxim)

2.2.3.7 Trennung von 4-Trifluormethylbenzamidoxim und 4-Trifluormethylbenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Trifluormethylbenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Symmetry max RP, 4 µm, 4,6 × 250 mm (Phenomenex, Torrance, United States) Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	10 mM Natriumoctylsulfonat, 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0/ Acetonitril 72,5:27,5 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	23 min
Detektion	224 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Retentionszeiten	16,1 ± 0,1 min (4-Trifluormethylbenzamidin) 18,3 ± 0,1 min (4-Trifluormethylbenzamidoxim)

2.2.3.8 Trennung von 4-Methylbenzamidoxim und 4-Methylbenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Methylbenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Symmetry max RP, 4 µm, 4,6 × 250 mm (Phenomenex, Torrance, United States) Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	10 mM Natriumoctylsulfonat, 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,0/ Acetonitril 78,5:21,5 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	32 min
Detektion	242 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Retentionszeiten	17,3 ± 0,1 min (4-Methylbenzamidoxim) 23,6 ± 0,1 min (4-Methylbenzamidin)

2.2.3.9 Trennung von 4-Methoxybenzamidoxim und 4-Methoxybenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Methoxybenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Symmetry max RP, 4 μ m, 4,6 \times 250 mm (Phenomenex, Torrance, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	5 mM Natriumoctylsulfonat, 1 % Eisessig (v/v), 0,1 % Triethylamin (v/v), (pH nicht eingestellt)/ Acetonitril 80,5:19,5 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	30 min
Detektion	260 nm
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeiten	15,0 \pm 0,1 min (4-Methoxybenzamidoxim) 17,6 \pm 0,1 min (4-Methoxybenzamidin)

2.2.3.10 Trennung von 4-Aminobenzamidoxim und 4-Aminobenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Aminobenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Symmetry max RP, 4 μ m, 4,6 \times 250 mm (Phenomenex, Torrance, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	10 mM Natriumoctylsulfonat, 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0/ Acetonitril 85:15 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	30 min
Detektion	299 nm
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeiten	19,7 \pm 0,2 min (4-Aminobenzamidoxim) 24,8 \pm 0,3 min (4-Aminobenzamidin)

2.2.3.11 Trennung von 4-Hydroxybenzamidoxim und 4-Hydroxybenzamidin

Folgende Methode wurde zur Quantifizierung von 4-Hydroxybenzamidin entwickelt:

Stationäre Phase	Symmetry max RP, 4 μ m, 4,6 \times 250 mm (Phenomenex, Torrance, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	10 mM Natriumoctylsulfonat, 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0/ Acetonitril 85:15 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	32 min
Detektion	258 nm
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeiten	19,2 \pm 0,3 min (4-Hydroxybenzamidoxim) 23,6 \pm 0,4 min (4-Hydroxybenzamidin)

2.2.4 Stabilitäten und Löslichkeiten

2.2.4.1 Löslichkeiten der *para*-substituierten Benzamidoxime

Zur Überprüfung der Löslichkeit der *para*-substituierten Benzamidoxime unter Inkubationsbedingungen wurde für jedes Substrat in zwei Parallelansätzen folgendermaßen vorgegangen:

150 μ l einer 6 mM Lösung des Substrats in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 mit 5 % (v/v) DMSO wurden 11 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. 75 μ l des Überstands wurden mit 75 μ l Methanol versetzt und per HPLC vermessen. Zur Beurteilung der Löslichkeit wurde jeweils zum Vergleich eine 3 mM Lösung des Substrats in Acetonitril/*Aqua bidest.* 1:1 (v/v) hergestellt und per HPLC vermessen.

2.2.4.2 Stabilitäten der *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamide

Zur Überprüfung der Stabilität der Verbindungen bei Raumtemperatur wurde in zwei Parallelansätzen jeweils wie folgt verfahren:

3 mM Substrat bzw. 25 μ M Metabolit wurden in 20 mM MES-Puffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) gelöst und im Autosampler der HPLC bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Ansätze wurden nach 0, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden mit der jeweiligen HPLC-Analytik vermessen.

2.2.5 Zusammensetzung der *in vitro* Biotransformationsansätze

2.2.5.1 Inkubationen mit rekombinanten Enzymen

2.2.5.1.1 Ermittlung der optimalen Stöchiometrie von mARC, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase im *in vitro* Biotransformationsansatz

Jeder Inkubationsansatz enthielt insgesamt 80 pmol Cofaktor in einem Volumen von 75 µl, wobei die Verhältnisse von Moco (mARC1 bzw. mARC2) zu Häm (Cytochrom b₅) und FAD (Cytochrom b₅ Reduktase) variiert wurden (1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 Teile Moco zu Verhältnissen von 1000:1, 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 Häm zu FAD). 3 mM Benzamidoxim in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 wurde mit den Proteinen in den entsprechenden Verhältnissen bei 37 °C im Schüttelwasserbad für 3 min vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde die Inkubation gestartet und nach 20 min durch Zugabe von 75 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden 5 min geschüttelt und 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Ansätze per HPLC vermessen, wobei abweichend zu den übrigen Versuchen 40 µl injiziert wurden.

2.2.5.1.2 Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Das jeweilige Substrat wurde mit 3,75 µg Protein mARC1 bzw. mARC2, 37,5 pmol Häm (Cytochrom b₅) und 3,75 pmol FAD (Cytochrom b₅ Reduktase) in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 für 3 min im 37 °C Schüttelwasserbad vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde die Inkubation gestartet und nach unterschiedlichen Zeiten durch Hinzufügen von 75 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Proben wurden anschließend 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände per HPLC analysiert. Das Inkubationsvolumen betrug jeweils 75 µl, jeder Ansatz enthielt 5 % (v/v) DMSO und wurde doppelt pipettiert. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Protein durchgeführt.

Die bei Inkubationen mit mARC1 verwendeten Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Substituent	Substrat- konzentration (mM)	Inkubationszeiten (min)
H	8	3, 6, 9, 12, 15, 30, 45
NH ₂	10	3, 6, 9, 12, 15, 30, 45
NO ₂	6	2, 4, 6, 8, 10, 15, 30
CH ₃ , OCH ₃ , OH, CF ₃ , Cl, Br, CN	8	2, 4, 6, 8, 10, 15, 30

Bei allen Inkubationen mit mARC2 wurde das Substrat in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Untersucht wurden folgende Inkubationszeiten:

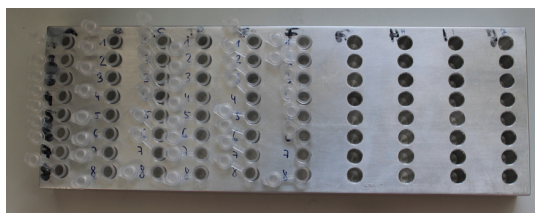


Abbildung 2.4: Selbstgebauter Metallständer zur parallelen Inkubation aller Verbindungen

Substituent	Inkubationszeiten (min)
H, CF ₃	3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 60
CH ₃ , OCH ₃ , OH, NH ₂ , Cl, Br, CN, NO ₂	2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 30

2.2.5.1.3 Bestimmung der Substratabhängigkeit

Das jeweilige Substrat in entsprechender Konzentration wurde zunächst mit 3,75 µg Protein mARC1 bzw. mARC2, 37,5 pmol Häm (Cytochrom b₅) und 3,75 pmol FAD (Cytochrom b₅ Reduktase) in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 für 3 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und nach 8 min mit 75 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Jeder Ansatz enthielt 5 % (v/v) DMSO, das Inkubationsvolumen betrug 75 µl. Als Kontrollansatz diente jeweils ein Ansatz ohne Protein. Nach dem Abstoppen wurde 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände per HPLC vermessen.

Alle Verbindungen wurden unter Verwendung eines im Arbeitskreis selbstgebauten Metallständers (s. Abbildung 2.4) parallel inkubiert, wobei diese Bestimmung insgesamt sechsmal durchgeführt wurde. Die enzymkinetischen Parameter wurden mithilfe von SigmaPlot ermittelt (SigmaPlot 11.0; SPSS Science, Chicago, IL). Folgende Substratkonzentrationen wurden eingesetzt:

Inkubationen mit mARC1:

Substituent	Substratkonzentrationen (mM)
H, CH ₃ , OCH ₃ , NH ₂ , Br, CF ₃	0,06; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0
Cl, CN	0,13; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0
NO ₂	0,06; 0,13; 0,25; 0,38; 0,75; 3,0; 6,0
OH	0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0

Inkubationen mit mARC2:

Substituent	Substratkonzentrationen (mM)
H, CH ₃ , OCH ₃ , NH ₂ , Br, CF ₃ , Cl, CN, NO ₂ OH	0,06; 0,13; 0,25; 0,50; 1,0; 3,0; 6,0
	0,02; 0,03; 0,06; 0,13; 0,50; 1,0; 3,0

2.2.5.2 Inkubationen mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion

2.2.5.2.1 Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Das jeweilige Substrat wurde in einer Konzentration von 3 mM mit 5 µg Protein in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 für 3 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde die Inkubation gestartet und nach unterschiedlichen Zeiten durch Hinzufügen von 150 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Proben wurden anschließend 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände per HPLC analysiert. Das Inkubationsvolumen betrug jeweils 150 µl, alle Ansätze enthielten 5 % (v/v) DMSO und wurden doppelt pipettiert. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Protein durchgeführt. Folgende Inkubationszeiten wurden untersucht:

Substituent	Inkubationszeiten (min)
H	5, 15, 20, 30, 45, 60, 120
CH ₃	5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 63, 120
OCH ₃	5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90
NO ₂	5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60
OH	5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 100
Cl, Br	5, 15, 20, 30, 45, 60, 120
NH ₂ , CF ₃ , CN	5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120

2.2.5.2.2 Bestimmung der pH-Abhängigkeit

Alle Inkubationen wurden in Mehrkomponentenpuffer nach Ellis und Morrison (1982), bestehend aus 50 mM Essigsäure, 50 mM MES und 100 mM TRIS-Base, durchgeführt. Hierfür wurden zunächst zehn verschiedene Pufferlösungen mit pH-Werten im Bereich von 4,0 bis 8,0 durch Zugabe von 1 M Salzsäure bzw. 1 M Natriumhydroxid-Lösung hergestellt, wobei die Ionenstärke der Lösungen durch Zugabe entsprechender Volumina einer 0,5 M Natriumchlorid-Lösung ausgeglichen wurde. Anschließend wurden 3 mM des jeweiligen Substrats in Mehrkomponentenpuffer mit 5 µg Protein 3 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde

die Inkubation gestartet. Das Inkubationsvolumen betrug 150 μ l, jeder Inkubationsansatz enthielt 5 % (v/v) DMSO. Nach 20 min wurde die Inkubation durch Zugabe von 150 μ l eisgekühltem Methanol abgestoppt. Alle Ansätze wurden 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände per HPLC vermessen. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Protein durchgeführt.

2.2.5.2.3 Bestimmung der Substratabhängigkeit

Das jeweilige Substrat wurde zunächst in verschiedenen Konzentrationen mit 2,5 μ g Protein in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 für 3 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und nach 15 min mit 75 μ l eisgekühltem Methanol abgestoppt. Jeder Ansatz enthielt 5 % (v/v) DMSO, das Inkubationsvolumen betrug 75 μ l. Als Kontrollansatz diente jeweils ein Ansatz ohne Protein. Nach dem Abstoppen wurde 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände per HPLC vermessen.

Alle Verbindungen wurden unter Verwendung des in Abbildung 2.4 gezeigten Metallständers parallel inkubiert, wobei diese Bestimmung insgesamt sechsmal durchgeführt wurde. Die enzymkinetischen Parameter wurden mithilfe von SigmaPlot ermittelt (SigmaPlot 11.0; SPSS Science, Chicago, IL). Folgende Substratkonzentrationen wurden eingesetzt:

Substituent	Substratkonzentrationen (mM)
H, CH ₃ , OCH ₃ , NH ₂ , Br, CF ₃ , Cl, OH	0,016; 0,031; 0,063; 0,13; 0,25; 1,0; 3,0
NO ₂ , CN	0,063; 0,13; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0

2.2.6 Cyclische Voltammetrie und Differentielle Puls-Voltammetrie

Die Versuche zur Charakterisierung der elektrochemischen Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis Kurz (Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Albert-Ludwig-Universität, Freiburg) durchgeführt. Es wurde eine Drei-Elektroden-Anordnung bestehend aus einer hängenden Quecksilber Tropfelektrode (Metrohm Multi-Mode-Elektrode) als Arbeitselektrode, einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3 M KCl, +210 mV *vs.* NHE) und einem Platindraht als Gegenelektrode sowie einem Metrohm 797 VA Computrace Potentiostaten verwendet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur unter Stickstoff durchgeführt. Zur Bestimmung der Redoxpotentiale mittels Differentieller Puls-Voltammetrie wurden, je nach Löslichkeit, 1 mM Lösungen oder 1:10 Verdünnungen gesättigter Lösungen der *para*-substituierten Benzamidoxime in 0,5 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 eingesetzt. Vor jeder Messung wurden die Lösungen 5 min mit Stickstoff gespült, um gelösten Sauerstoff vollständig zu verdrängen.

2.2.7 Elektrolyse von Benzamidoxim mit nachfolgender HPLC-Analytik

Die Elektrolyse von Benzamidoxim wurde in einer coulometrischen Zelle von Princeton Applied Research durchgeführt, welche mit einem Quecksilber-Pool als Arbeitselektrode, Ag/AgCl (3 M KCl) als Referenzelektrode und einem Platindraht als Gegenelektrode ausgestattet war (s. Abbildung 2.5). 20 ml einer 0,5 mM Benzamidoximlösung in 0,5 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 wurden mit Stickstoff gespült, dann wurde 45 min bei -1,2 V *vs.* NHE im chronoamperometrischen Messmodus elektrolysiert. Nach 0, 10, 30 und 45 min wurden jeweils 250 µl Probe gezogen und unter Verwendung folgender Parameter per HPLC analysiert:

Stationäre Phase	Kinetex C18, 5 µm, 4,6 × 250 mm (Phenomenex Inc., Aschaffenburg) Vorsäule: C18, 3 × 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	20 mM K ₂ HPO ₄ , 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v), pH 4,0/ Acetonitril 95:5 (v/v)
Flussrate	0,6 ml/min
Detektion	229 nm
Injektionsvolumen	20 µl
Retentionszeiten	10,9 min (Benzamidin) 11,7 min (Benzamidoxim)



Abbildung 2.5: Experimenteller Aufbau der verwendeten Elektrolyse-Zelle

2.2.8 ^1H -NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden an einem Bruker Avance III 300 NMR-Spektrometer aufgenommen, wobei die Puls-Programme des Herstellers verwendet wurden. Die *para*-substituierten Benzamidoxime wurden in DMSO- d_6 gelöst (je zwischen 0,5 und 1,0 mg in 0,6 ml) und bei 300 K und 300 MHz vermessen. Als interner Standard diente DMSO- d_5 ($\delta = 2,50$ ppm).

2.2.9 Statistik

Die ermittelten kinetischen Parameter K_M und V_{\max} (s. 2.2.5.1.3 und 2.2.5.2.3) wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung und mittels Nalimov Test auf Ausreißer geprüft (Lozán und Kausch, 2004; Streck, 2004). Zur Durchführung linearer und multipler linearer Regressionsanalysen mittels SigmaPlot wurden die Hammett-Konstanten (σ) nach March (1985) und die Hansch'schen Hydrophobiekonstanten (π) nach Hansch und Leo (1979) verwendet.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Charakterisierung der Enzymquellen

Eine Zielsetzung dieses Kapitels bestand darin, den Einfluss des Substituenten in *para*-Position des Modellssubstrates Benzamidoxim auf die enzymatische *N*-Reduktion zu untersuchen. Voraussetzung hierfür waren somit vergleichbare Versuchsbedingungen für die Charakterisierung der Reduktion aller Verbindungen. Daher wurden alle Inkubationen mit einer einheitlichen Proteincharge äußerer mitochondrialer Membranfraktion bzw. der rekombinanten Proteine des mARC-Enzymsystems durchgeführt, welche durch Zusammenfügen mehrerer kleiner Chargen erhalten wurden.

2.3.1.1 Subzelluläre Fraktionen der Schweineleber

Es wurden drei Chargen Mitochondrien aus insgesamt fünf Schweinelebern gewonnen. Ausgehend von diesen Chargen wurde jeweils die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV) angereichert. Abschließend wurden alle Chargen gepoolt und diese Gesamtcharge-OMV nachfolgend für alle Inkubationen verwendet (Proteingehalt: 1,96 mg/ml).

Die Reinheit und Identität der Subfraktionen wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Westernblot-Analyse untersucht (s. Abbildung 2.6). Um den Erfolg der Subfraktionierung zu überprüfen, wurden Westernblot-Analysen mit den Markerproteinen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und VDAC (*voltage dependent anion channel*) durchgeführt. GAPDH spielt eine wichtige Rolle bei der Glykolyse und ist vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert (Tristan *et al.*, 2011), während VDAC in der äußeren mitochondrialen Membran zu finden ist. Hier kontrolliert VDAC den

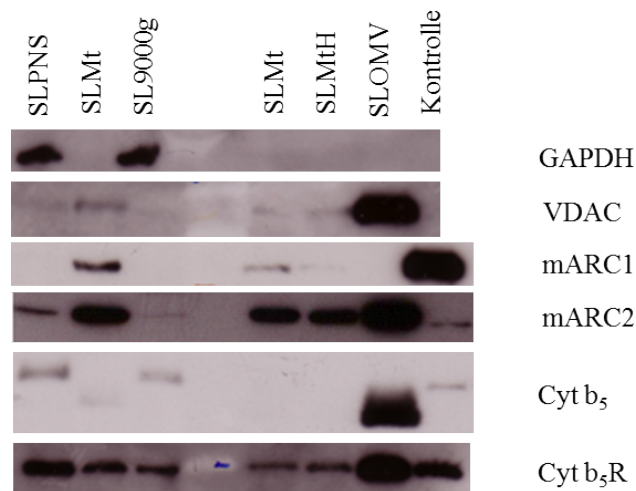


Abbildung 2.6: Westernblot-Analyse der subzellulären hepatischen Fraktionen

Folgende Proteinmengen und Primärantikörper-Verdünnungen wurden verwendet:
links = SLPNS, SLMt, SL9000g; rechts = SLMt, SLMtH, SLOMV; Kontrolle = jeweiliges rekombinantes Protein; GAPDH, VDAC: 12 µg links bzw. 6 µg rechts, Primärantikörper 1:1000; mARC1: 20 µg links bzw. 5 µg rechts, 0,05 µg mARC1, anti-mARC1 1:1000; mARC2: 10 µg links bzw. 5 µg rechts, 0,05 µg mARC2, anti-mARC2 1:10.000; Cyt b₅: 20 µg links bzw. 5 µg rechts, 0,001 µg Cyt b₅, anti-Cyt b₅ 1:1000; Cyt b₅R: 20 µg links bzw. 10 µg rechts, 0,1 µg Cyt b₅R, anti-Cyt b₅R 1:1000

Ein- und Austritt mitochondrialer Metabolite und ist an der Regulation der Apoptose beteiligt (Shoshan-Barmatz und Ben-Hail, 2012).

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass GAPDH in den Fraktionen des postnukleären Überstandes und im 9000 *g*-Überstand angereichert ist, während in den mitochondrialen Fraktionen kein GAPDH detektiert wurde. Für VDAC ist eine Anreicherung in den Mitochondrien und das stärkste Signal in der äußeren mitochondrialen Membranfraktion zu erkennen. Somit wurde die Identität der äußeren mitochondrialen Membranfraktion und die Reinheit der gewonnenen Subfraktionen sichergestellt.

Sowohl für mARC1 als auch für mARC2 ist eine Anreicherung in den Mitochondrien gegenüber postnukleärem Überstand und 9000 *g*-Überstand zu erkennen. mARC2 lieferte im Unterschied zu mARC1 die stärkste Bande in der äußeren mitochondrialen Membranfraktion. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Krischkowski (2014), welche die zusätzliche Lokalisation von mARC1 im Intermembranenraum porciner Lebermitochondrien beschreiben.

Des Weiteren ist zu erkennen, dass auch die zur *N*-Reduktion essentiellen Komponenten des mARC-Enzymsystems Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase in der gewonnenen Charge der äußeren mitochondrialen Membranfraktion enthalten sind und diese somit zur Durchführung von Biotransformationsstudien geeignet war.

2.3.1.2 Rekombinante Proteine des mARC-Enzymsystems

Es wurden jeweils mehrere Chargen der rekombinanten Proteine gepoolt, um alle Biotransformationsstudien mit einer einheitlichen Charge durchführen zu können und so möglichst identische Versuchsbedingungen für alle Substrate, welche hinsichtlich ihrer *N*-Reduktion durch das mARC-Enzymsystem verglichen werden sollten, zu gewährleisten.

In *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem rekonstituierten rekombinanten Enzymsystem werden die Komponenten mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase entsprechend ihres Gehalts an Molybdän, Häm bzw. FAD eingesetzt (Plitzko, 2010). Für Apocytochrom b_5 wurde von Mulrooney und Waskell (2000) eine Methode zur Inkorporation von Häm beschrieben. Diese wurde von Plitzko *et al.* (2013) modifiziert und kann neben der Inkorporation von Häm ins Apoprotein auch zur Steigerung des Häm-Gehalts des rekombinant hergestellten Holoproteins genutzt werden.

Cytochrom b_5 wird bei Inkubationen mit dem rekonstituierten rekombinanten Enzymsystem entsprechend des Häm-Gehalts eingesetzt. Die Umsatzrate gibt an, wieviel Metabolit pro Zeiteinheit und Menge an Gesamtprotein im Inkubationsansatz gebildet wird. Somit ermöglicht die Saturierung mit Häm eine Einsparung an Protein bzw. Erhöhung der Umsatzrate. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine Charge an Cytochrom b_5 verwendet, die zuvor mit Häm saturiert wurde. Folgende Protein- und Cofaktorgehalte wurden für die erhaltenen Gesamtchargen an rekombinanten Proteinen bestimmt:

	Proteingehalt	Cofaktorgehalt
mARC1	8,7 mg/ml	8,7 nmol Mo/mg Protein
mARC2	9,1 mg/ml	9,0 nmol Mo/mg Protein
Cyt b_5	1,7 mg/ml	20,7 nmol Häm/mg Protein
Cyt b_5 R	9,4 mg/ml	46,3 nmol FAD/mg Protein

2.3.2 HPLC-Analytik

Zur Trennung der *para*-substituierten Benzamidoxime von ihren korrespondierenden Benzamidin-Metaboliten, DMSO und NADH wurden HPLC-Methoden entwickelt (s. Kapitel 2.2.3). Eine Übersicht der relevanten Signale liefern die repräsentativen Chromatogramme in den Abbildungen 2.7 bis 2.15.

Im Chromatogramm der Trennung von 4-Methoxybenzamidoxim und -benzamidin (s. Abbildung 2.13) wurde neben DMSO und NADH, mit Retentionszeiten kleiner 5 min, ein zusätzliches Signal bei einer Retentionszeit von etwa 10 min detektiert. Weitere HPLC-Analysen zeigten, dass dieses auf eine Verunreinigung des 4-Methoxybenzamidoxims zurückzuführen war. Die Vermutung, dass es sich hierbei um das entsprechende Amid handelt, ein häufiges Nebenprodukt der Synthese *para*-substituierter Benzamidoxime, wurde per HPLC-, MS- und $^1\text{H-NMR}$ -Analyse bestätigt (Daten nicht

gezeigt). Anhand der Flächen im HPLC-Chromatogramm wurde ermittelt, dass diese Charge 4-Methoxybenzamidoxim etwa 11 % 4-Methoxybenzamid enthält. Hierfür wurde die Fläche des Amidsignals auf die Summe der Flächen der Amid- und Amidoximsignale bezogen. Der Gehalt der Verunreinigung wurde bei Verwendung der Substanz in Biotransformationsstudien rechnerisch nicht berücksichtigt.

Zur Validierung der HPLC-Methoden wurde die Kalibrierung und Wiederfindung der *para*-substituierten Benzamide bestimmt. Die Ergebnisse der Kalibrierungen, welche zur Quantifizierung der Metabolite im Rahmen der durchgeführten Biotransformationsstudien genutzt wurden, sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Substituent	Bestimmungsbereich (μM)	Richtigkeit (%) (Bestimmungsbereich)	Richtigkeit (%) (Bestimmungsgrenze)	R²
Cl	0,25-500	102 \pm 5	105	1,0000
Br	0,25-500	96 \pm 14	100	0,9962
NO ₂	0,25-500	94 \pm 7	89	0,9982
CN	0,5-500	94 \pm 7	89	0,9998
CF ₃	0,5-500	102 \pm 2	107	1,0000
CH ₃	1-500	101 \pm 3	95	0,9999
OCH ₃	0,5-500	100 \pm 3	102	0,9999
NH ₂	0,5-500	101 \pm 4	90	0,9999
OH	0,5-500	99 \pm 2	102	0,9996

Mithilfe der erhaltenen Kalibriergeraden wurden die Wiederfindungen bestimmt:

Substituent	Bestimmungsbereich (μM)	Wiederfindung (%) (Bestimmungsbereich)	Wiederfindung (%) (Bestimmungsgrenze)	R²
Cl	1-500	114 \pm 2	117	1,0000
Br	5-500	111 \pm 3	114	0,9997
NO ₂	1-500	105 \pm 10	82	0,9998
CN	1-500	105 \pm 9	117	0,9989
CF ₃	0,5-500	106 \pm 7	91	0,9994
CH ₃	1-500	111 \pm 5	119	0,9989
OCH ₃	0,5-500	112 \pm 12	79	0,9995
NH ₂	1-500	109 \pm 5	116	0,9981
OH	5-500	110 \pm 4	119	0,9997

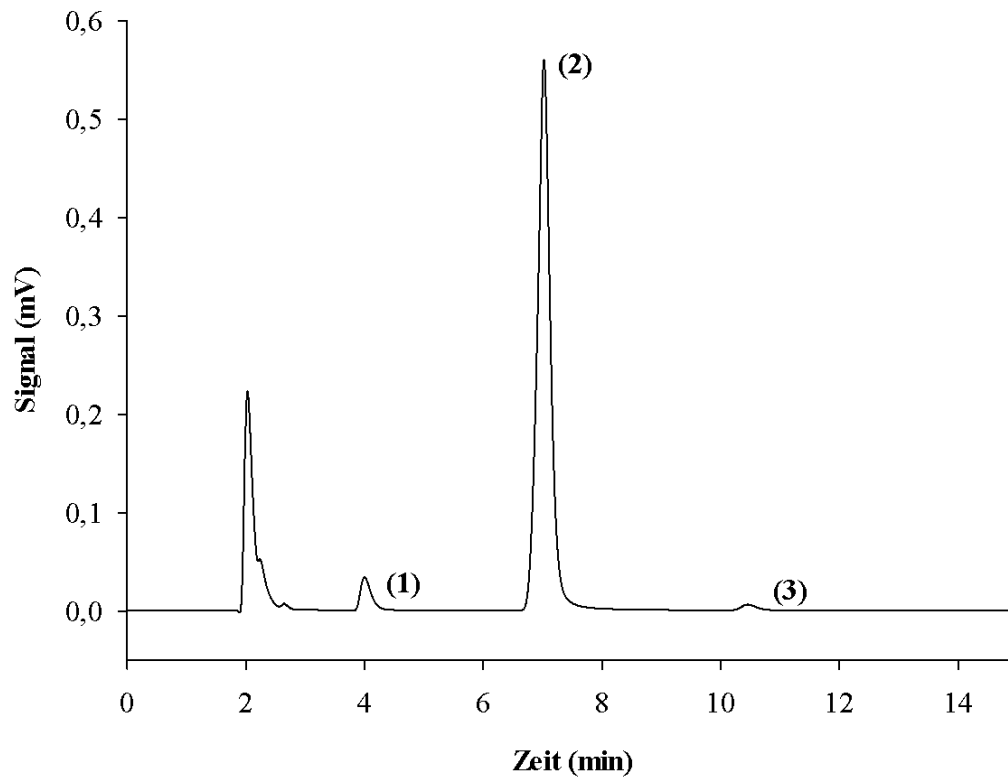


Abbildung 2.7: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Chlorbenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Chlorbenzamidoxim, 53 μ M 4-Chlorbenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 2,5 μ g Protein (OMV) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Chlorbenzamidin, (2) 4-Chlorbenzamidoxim, (3) nicht näher charakterisierte Verunreinigung

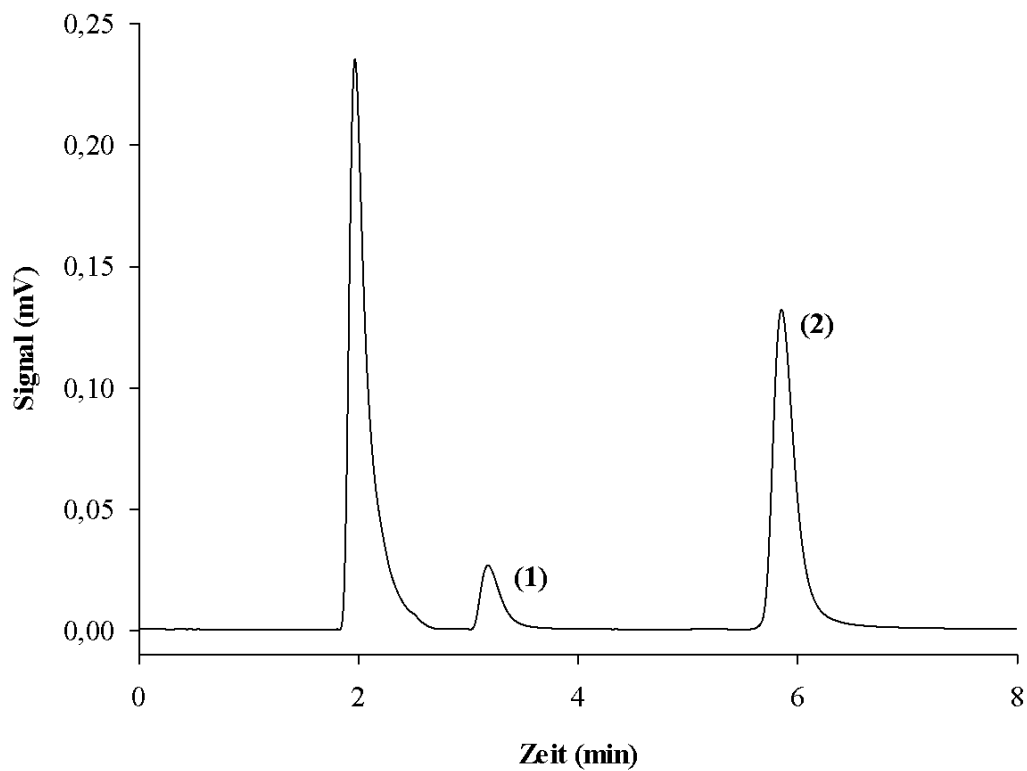


Abbildung 2.8: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Brombenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Brombenzamidoxim, 68 μ M 4-Brombenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 2,5 μ g Protein (OMV) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Brombenzamidin, (2) 4-Brombenzamidoxim

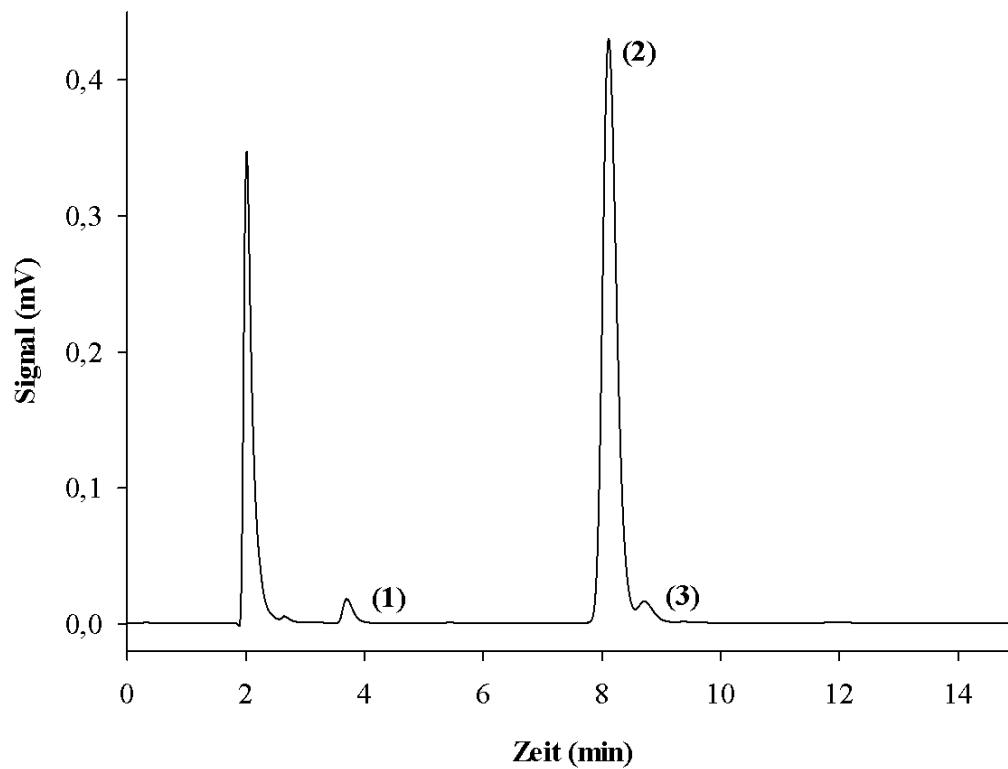


Abbildung 2.9: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Nitrobenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Nitrobenzamidoxim, 31 μ M 4-Nitrobenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 2,5 μ g Protein (OMV) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Nitrobenzamidin, (2) 4-Nitrobenzamidoxim, (3) nicht näher charakterisierte Verunreinigung

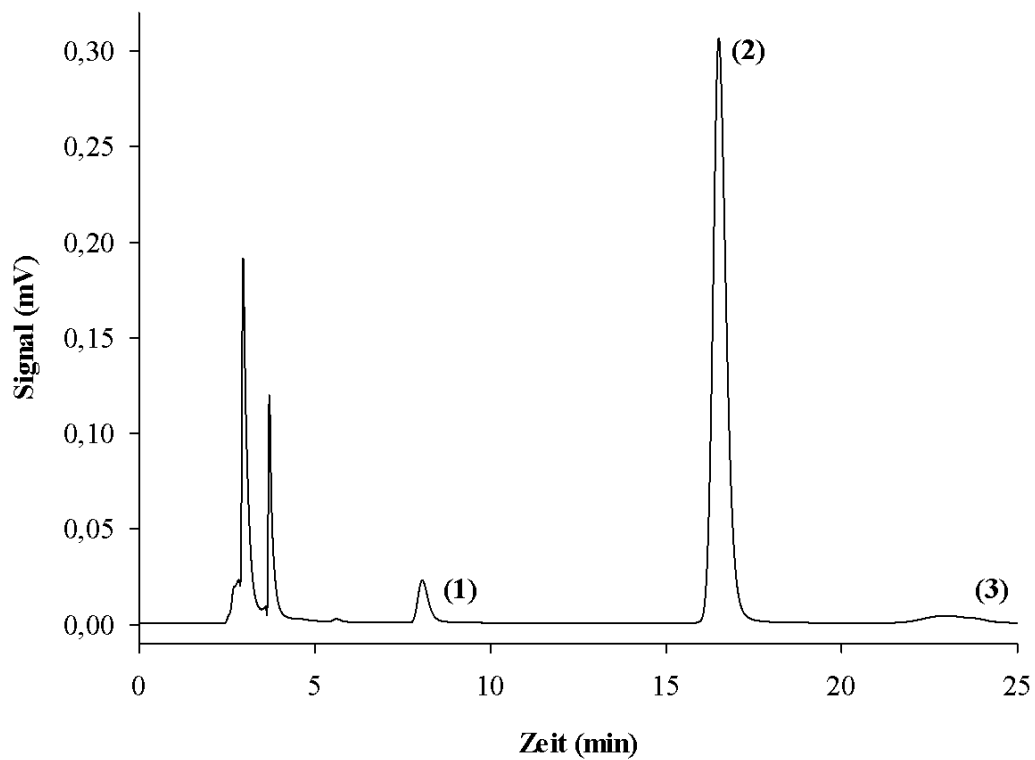


Abbildung 2.10: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Cyanobenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Cyanobenzamidoxim, 54 μ M 4-Cyanobenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 2,5 μ g Protein (OMV) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Cyanobenzamidin, (2) 4-Cyanobenzamidoxim, (3) nicht näher charakterisierte Verunreinigung

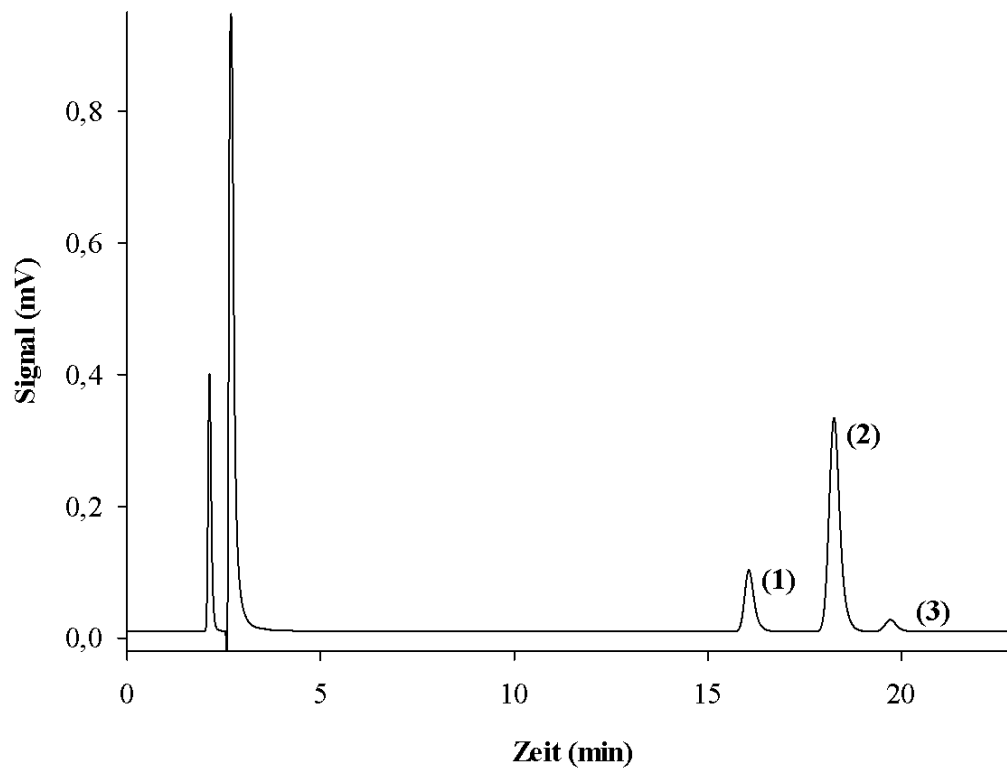


Abbildung 2.11: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Trifluormethylbenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Trifluormethylbenzamidoxim, 250 μ M 4-Trifluormethylbenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Trifluormethylbenzamidin, (2) 4-Trifluormethylbenzamidoxim, (3) nicht näher charakterisierte Verunreinigung

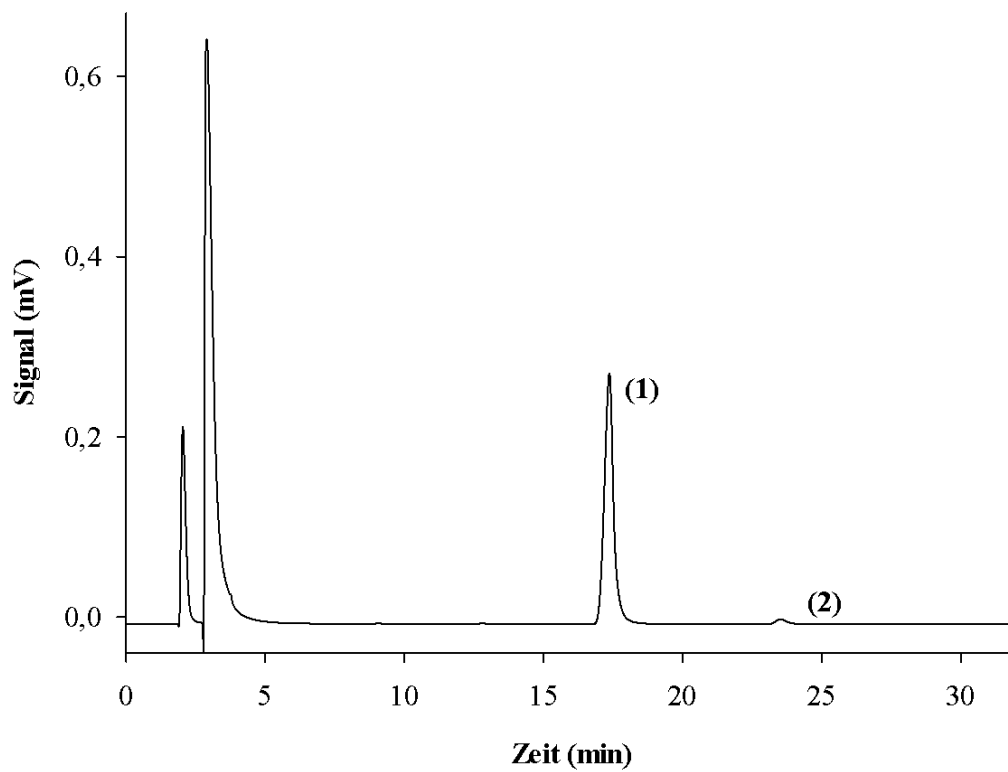


Abbildung 2.12: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Methylbenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Methylbenzamidoxim, 80 μ M 4-Methylbenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 2,5 μ g Protein (OMV) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Methylbenzamidoxim, (2) 4-Methylbenzamidin

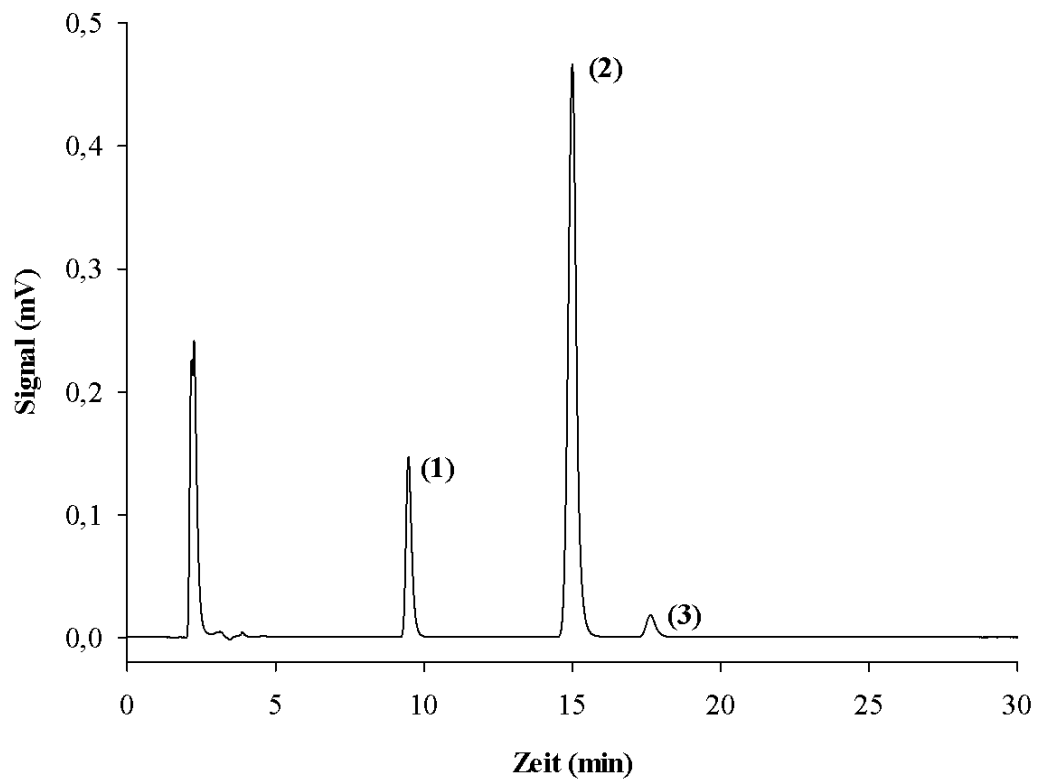


Abbildung 2.13: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Methoxybenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Methoxybenzamidoxim, 54 μ M 4-Methoxybenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 2,5 μ g Protein (OMV) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Methoxybenzamid, (2) 4-Methoxybenzamidoxim, (3) 4-Methoxybenzamidin

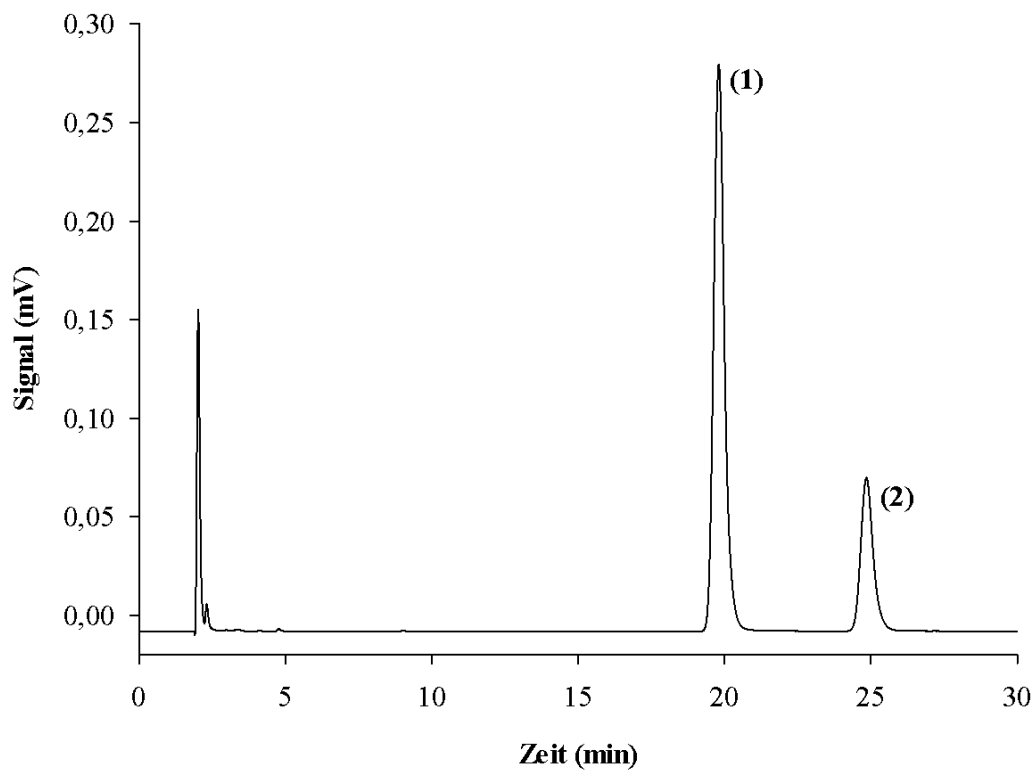


Abbildung 2.14: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Aminobenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Aminobenzamidoxim, 500 μ M 4-Aminobenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Aminobenzamidoxim, (2) 4-Aminobenzamidin

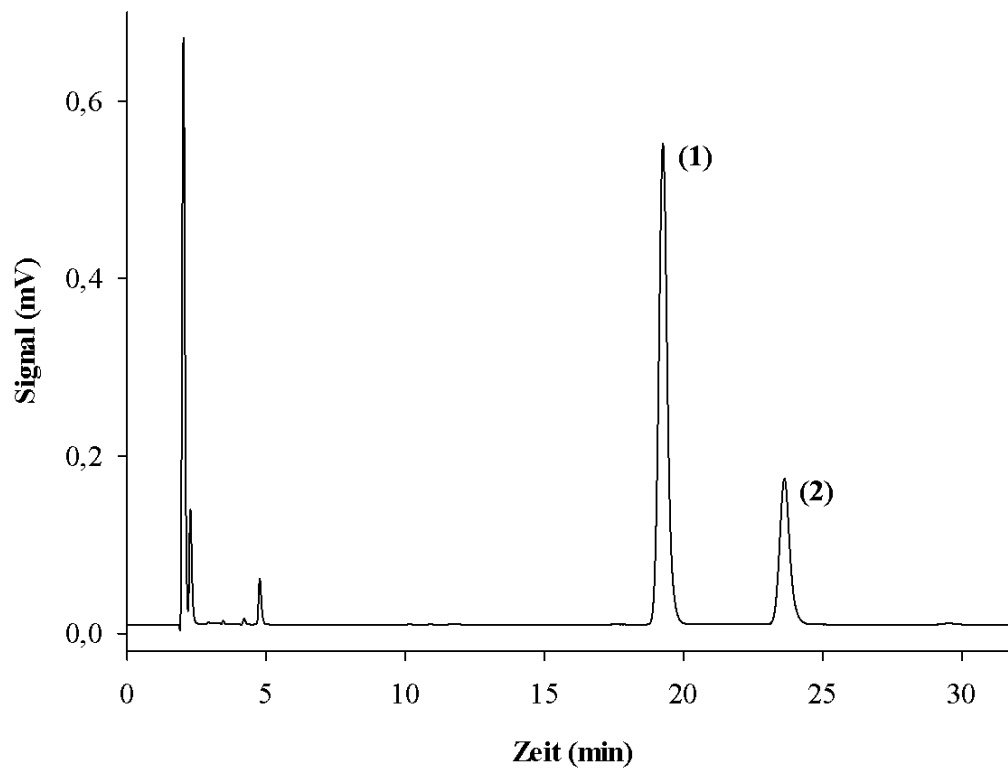


Abbildung 2.15: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Hydroxybenzamidoxim und -benzamidin

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Hydroxybenzamidoxim, 500 μ M 4-Hydroxybenzamidin, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Hydroxybenzamidoxim, (2) 4-Hydroxybenzamidin

Substituent	Löslichkeit (%)
OCH ₃	85
NH ₂	92
OH	93
Cl	94
CH ₃	95
NO ₂	97
CN	98
Br	102
CF ₃	104
H	104

Tabelle 2.1: Löslichkeiten der *para*-substituierten Benzamidoxime unter Inkubationsbedingungen

Folgende Inkubationsbedingungen wurden simuliert: 6 mM Substrat in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 mit 5 % (v/v) DMSO, 150 µl Inkubationsvolumen, 3 min Vorinkubation und 8 min Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad (s. 2.2.4.1). Die prozentuale Löslichkeit ist auf eine Lösung des Substrates in Acetonitril/*Aqua bidest.* bezogen.

2.3.3 Stabilitäten und Löslichkeiten

2.3.3.1 Löslichkeiten der *para*-substituierten Benzamidoxime unter Inkubationsbedingungen

Um die Löslichkeit der *para*-substituierten Benzamidoxime unter Inkubationsbedingungen beurteilen zu können, wurden Lösungen der Verbindungen hergestellt und per HPLC analysiert. Die erhaltenen Signalflächen wurden mit denen von Referenzlösungen der Verbindungen in Acetonitril/*Aqua bidest.* 1:1 (v/v) verglichen. Die Löslichkeit der Referenzlösung wurde zur Auswertung gleich 100 % gesetzt. Für alle Verbindungen war eine ausreichende Löslichkeit (> 85 %) unter Inkubationsbedingungen gewährleistet (s. Tabelle 2.1).

2.3.3.2 Stabilitäten der *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamide

Um zu überprüfen, ob die in *in vitro* Biotransformationsstudien zu untersuchenden Substrate und Metabolite für eine Quantifizierung mittels HPLC-Analytik, welche je nach Laufzeit der Methode und Anzahl der Proben mehrstündige Analysedauern aufweist, geeignet sind, wurde die Stabilität der Verbindungen bei Raumtemperatur im Autosampler der HPLC-Anlage untersucht. Keine der Verbindungen zeigte Anzeichen einer Instabilität oder Zersetzung (s. Abbildungen 2.16 und 2.17).

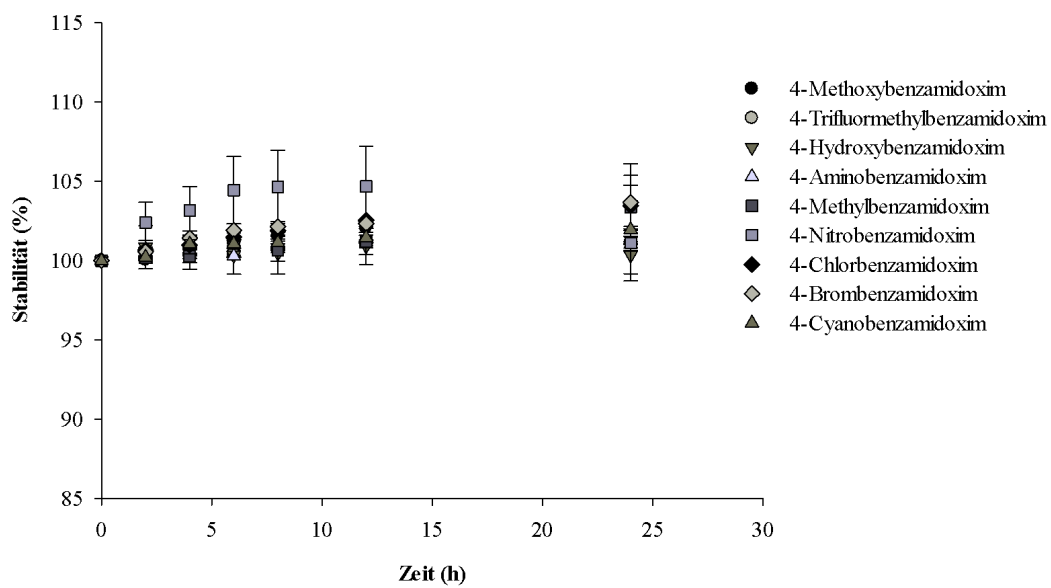


Abbildung 2.16: Stabilitäten der *para*-substituierten Benzamidoxime bei Raumtemperatur

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen, die einfach vermessen wurden. 3 mM Lösungen der Verbindungen in 20 mM MES-Puffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) wurden per HPLC analysiert.

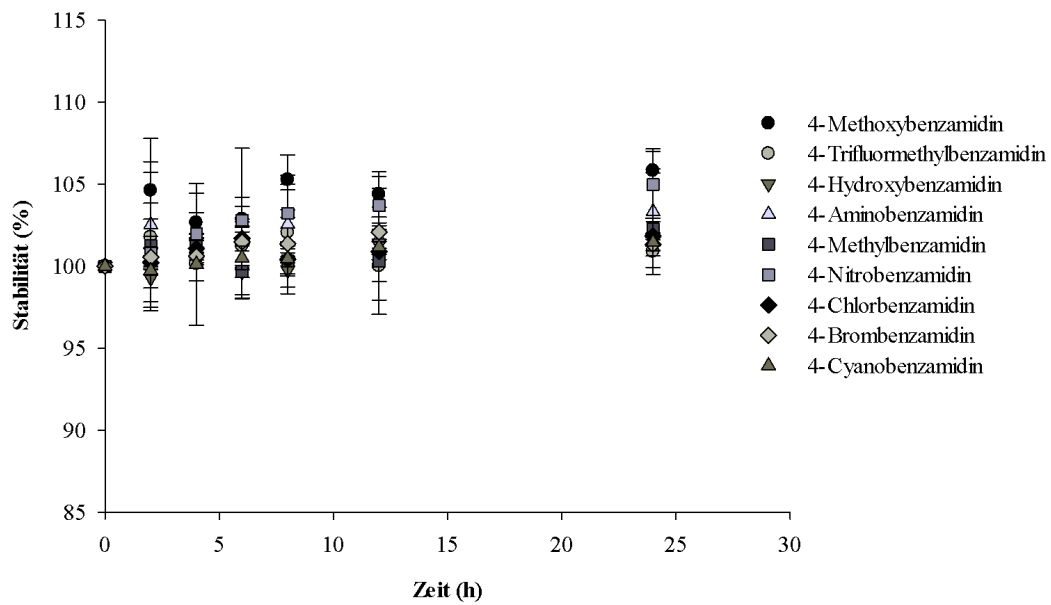


Abbildung 2.17: Stabilitäten der *para*-substituierten Benzamidine bei Raumtemperatur

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen, die einfach vermessen wurden. 25 μ M Lösungen der Verbindungen in 20 mM MES-Puffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) wurden per HPLC analysiert.

2.3.4 *N*-Reduktion durch das rekombinante mARC-Enzymsystem

2.3.4.1 Ermittlung der optimalen Stöchiometrie von mARC, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase

Ziel dieses Vorversuches war es, zu ermitteln in welchem Verhältnis die Komponenten des mARC-Enzymsystems in *in vitro* Biotransformationsstudien einzusetzen sind, um möglichst hohe Umsatzraten zu erhalten. Die entsprechenden Proteinmengen werden hierbei über den Molybdän-, Häm- bzw. FAD-Gehalt von mARC, Cytochrom b₅ und der Cytochrom b₅ Reduktase berechnet.

Für Biotransformationsstudien mit einem Inkubationsvolumen von 150 µl und 160 pmol Gesamtcofaktor wurde von Krompholz (2013) aufbauend auf den Arbeiten von Plitzko (2010) ein optimales Verhältnis von 10:10:1 für mARC1 bzw. mARC2 zu Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase ermittelt. Da in dieser Arbeit eine Vielzahl an Substraten im Sinne von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen untersucht werden sollte, war eine Verkleinerung des Inkubationsvolumens und die damit verbundene Einsparung an Proteinen erstrebenswert. Die optimale Stöchiometrie der Komponenten des mARC-Enzymsystems wurde daher für mARC1 und mARC2 exemplarisch an Benzamidoxim in einem Inkubationsvolumen von 75 µl und 80 pmol Gesamtcofaktor bestimmt. Die von Krompholz untersuchten Verhältnisse von Cytochrom b₅ zu Cytochrom b₅ Reduktase 1:1 oder 10:1 und mARC in Anteilen von 0-100 wurden erweitert (s. Abbildung 2.18).

Es konnte gezeigt werden, dass auch bei Verkleinerung des Inkubationsvolumens und Reduktion der Proteinmengen sowohl für mARC1 als auch mARC2 die höchsten Umsatzraten bei einem Verhältnis von 10:10:1 für mARC zu Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase erhalten werden. Auch bei Einsatz der Komponenten im Verhältnis 100:100:1 resultierten hohe Konzentrationen Benzamidin und somit hohe *N*-reduktive Aktivitäten. Sehr hohe oder geringe Anteile einer Komponente, entsprechend 100 oder 1000 bzw. 0,01 oder 0,001 Teile, führten zu einer so starken Erniedrigung der *N*-Reduktion, dass teilweise kein Benzamidin mehr detektiert wurde.

		mARC1						
		→						
		1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001
Cyt b ₅ :Cyt b ₅ R	1000:1	37 %	11 %	ND	ND	4 %	ND	ND
	100:1	16 %	99 %	13 %	4 %	3 %	3 %	3 %
	10:1	ND	55 %	100 %	19 %	3 %	3 %	3 %
	1:1	ND	3 %	76 %	82 %	7 %	ND	ND
	1:10	ND	8 %	7 %	ND	ND	5 %	ND
	1:100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1:1000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1:1000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

		mARC2						
		→						
		1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001
Cyt b ₅ :Cyt b ₅ R	1000:1	ND	2 %	ND	ND	ND	ND	ND
	100:1	ND	63 %	28 %	2 %	ND	ND	ND
	10:1	ND	36 %	100 %	32 %	ND	ND	ND
	1:1	ND	1 %	21 %	48 %	2 %	ND	ND
	1:10	ND	ND	ND	1 %	ND	ND	ND
	1:100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1:1000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1:1000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Abbildung 2.18: N-Reduktion von Benzamidoxim in Abhängigkeit vom Verhältnis von mARC1 bzw. mARC2 zu Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.5.1.1 beschrieben. Benzamidin wurde mittels HPLC-Analytik quantifiziert und die höchste erhaltene Konzentration 100 % gesetzt. ND = nicht detektierbar

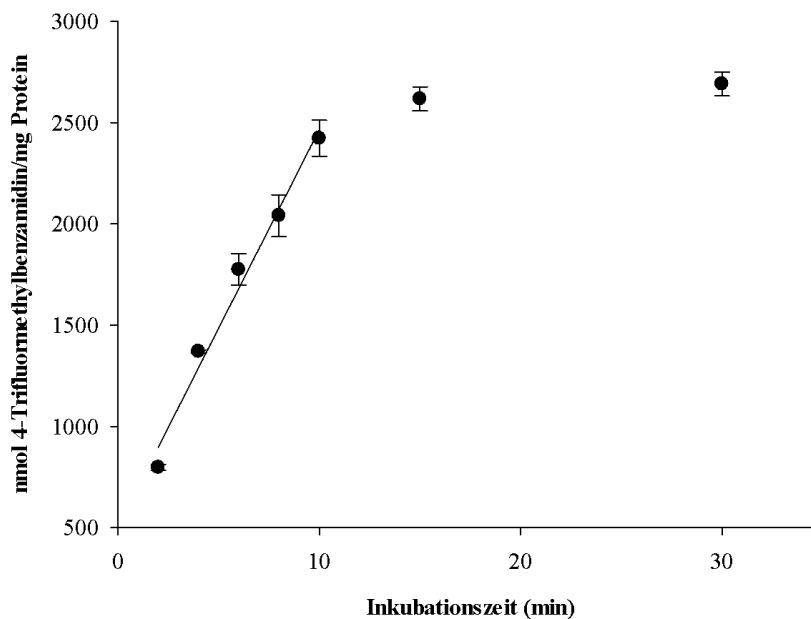


Abbildung 2.19: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von 4-Trifluormethylbenzamidoxim durch das rekombinante mARC1-haltige Enzymsystem

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.5.1.2 beschrieben. Inkubiert wurden Parallelansätze, die doppelt vermessen wurden. Die Reduktion verlief über 10 min zeitlinear ($R^2 = 0,9820$).

2.3.4.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Reduktion

Die *N*-Reduktion unterschiedlich substituierter Benzamidoxime durch das mARC-Enzymsystem sollte untersucht und anhand der Umsatzraten verglichen werden. Die Umsatzrate wird als Stoffmenge pro Zeiteinheit und Menge Protein angegeben. Daher ist es erforderlich, eine Inkubationszeit zu wählen, die in den zeitlinearen Bereich der *N*-Reduktion fällt.

Die *N*-Reduktion aller untersuchten *para*-substituierten Benzamidoxime war unter den gewählten Versuchsbedingungen sowohl für mARC1 als auch mARC2 über mindestens 8 min linear abhängig von der Inkubationszeit. Bei den nachfolgend durchgeführten Inkubationen zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde daher eine Inkubationszeit von 8 min gewählt. Exemplarisch ist der Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von 4-Trifluormethylbenzamidoxim durch das mARC1-haltige Enzymsystem gezeigt (Abbildung 2.19).

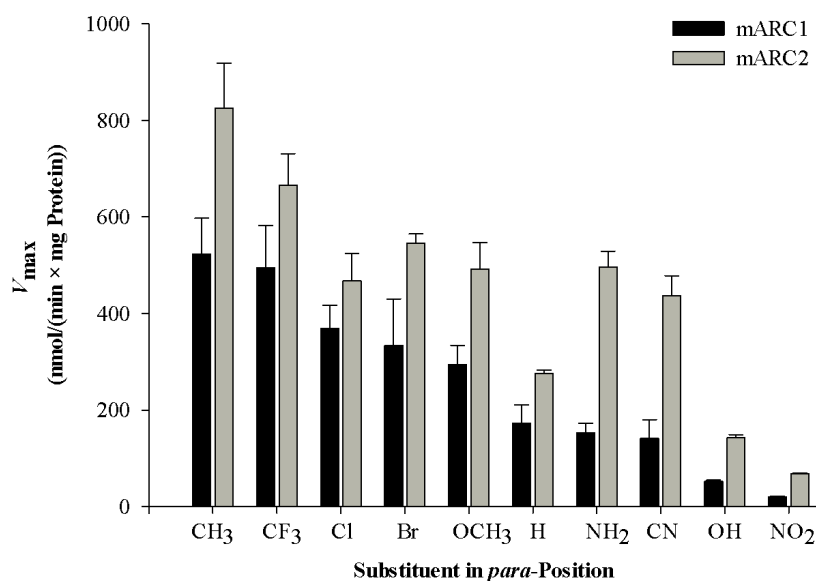


Abbildung 2.20: V_{\max} -Werte der Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime durch das rekombinante mARC-Enzymsystem

V_{\max} -Werte wurden mittels SigmaPlot ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens vier Bestimmungen (sechs Bestimmungen wurden durchgeführt, Ausreißer nach Nalimov wurden nicht berücksichtigt, s. Tabelle 2.2). Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und deren Aufarbeitung ist in Kapitel 2.2.5.1.3 beschrieben.

2.3.4.3 Einfluss der Substratkonzentration auf die enzymatische Reduktion und Ermittlung der kinetischen Parameter

Es sollte untersucht werden, ob der Substituent in *para*-Position des Modellsubstrates Benzamidoxim die *N*-Reduktion durch das mARC-Enzymsystem beeinflusst. Anhand der enzymkinetischen Parameter sollte geprüft werden, ob Zusammenhänge zwischen Ausmaß der *N*-Reduktion und physikochemischen Eigenschaften der Substituenten im Sinne von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bestehen, welche bei der rationalen Entwicklung neuer Amidoxim-Prodrugs genutzt werden können.

Alle untersuchten *para*-substituierten Benzamidoxime wurden sowohl durch das mARC1- als auch mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem zu den korrespondierenden Benzamidinen umgesetzt, wobei sämtliche Inkubationen unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Die höchsten Umsetzungsraten wurden sowohl für mARC1 als auch mARC2 für die Methylverbindung detektiert, während die Nitroverbindung jeweils die niedrigsten Umsetzungsraten lieferte (s. Abbildung 2.20).

Substituent	mARC1		mARC2	
	$V_{\max}^{[a]}$	K_M (mM)	$V_{\max}^{[a]}$	K_M (mM)
CH ₃	523 ± 74 ^[b]	0,79 ± 0,33 ^[b]	825 ± 93 ^[b]	0,51 ± 0,24 ^[b]
CF ₃	495 ± 87 ^[b]	2,28 ± 0,82 ^[b]	666 ± 65 ^[b]	1,32 ± 0,22 ^[b]
Cl	351 ± 36 ^[c]	1,69 ± 0,36 ^[c]	468 ± 56 ^[b]	0,51 ± 0,16 ^[b]
Br	313 ± 91 ^[b]	0,61 ± 0,21 ^[b]	546 ± 19 ^[b]	0,63 ± 0,10 ^[b]
OCH ₃	283 ± 37 ^[c]	0,57 ± 0,17 ^[b]	487 ± 59 ^[b]	0,34 ± 0,06 ^[b]
H	161 ± 30 ^[b]	0,52 ± 0,17 ^[b]	275 ± 8 ^[b]	0,80 ± 0,14 ^[b]
NH ₂	154 ± 21 ^[c]	0,64 ± 0,24 ^[c]	497 ± 37 ^[b]	0,62 ± 0,12 ^[c]
CN	129 ± 31 ^[b]	1,00 ± 0,27 ^[b]	437 ± 41 ^[b]	0,53 ± 0,13 ^[b]
OH	52 ± 3 ^[b]	0,10 ± 0,02 ^[b]	142 ± 7 ^[b]	0,17 ± 0,02 ^[b]
NO ₂	20 ± 2 ^[b]	0,11 ± 0,02 ^[b]	68 ± 1 ^[c]	0,08 ± 0,02 ^[c]

Tabelle 2.2: Enzymkinetische Parameter der Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime durch das mARC1- bzw. mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.5.1.3 beschrieben. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichungen aus sechs Bestimmungen.

[a] V_{\max} (nmol/(min × mg Protein)), [b] Mittelwerte ± Standardabweichungen aus fünf Bestimmungen, da ein Ausreißer nach Nalimov vorlag (Streck, 2004), [c] Mittelwert ± Standardabweichung aus vier Bestimmungen, da zwei Ausreißer nach Nalimov vorlagen (Streck, 2004).

Alle Reaktionen wiesen eine Michaelis-Menten-Kinetik auf. Exemplarisch gezeigt ist der Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion durch das mARC-haltige Enzymsystem am Beispiel von 4-Methylbenzamidoxim, 4-Nitrobenzamidoxim und Benzamidoxim (s. Abbildung 2.21). Die enzymkinetischen Parameter wurden mittels SigmaPlot bestimmt (s. Tabelle 2.2).

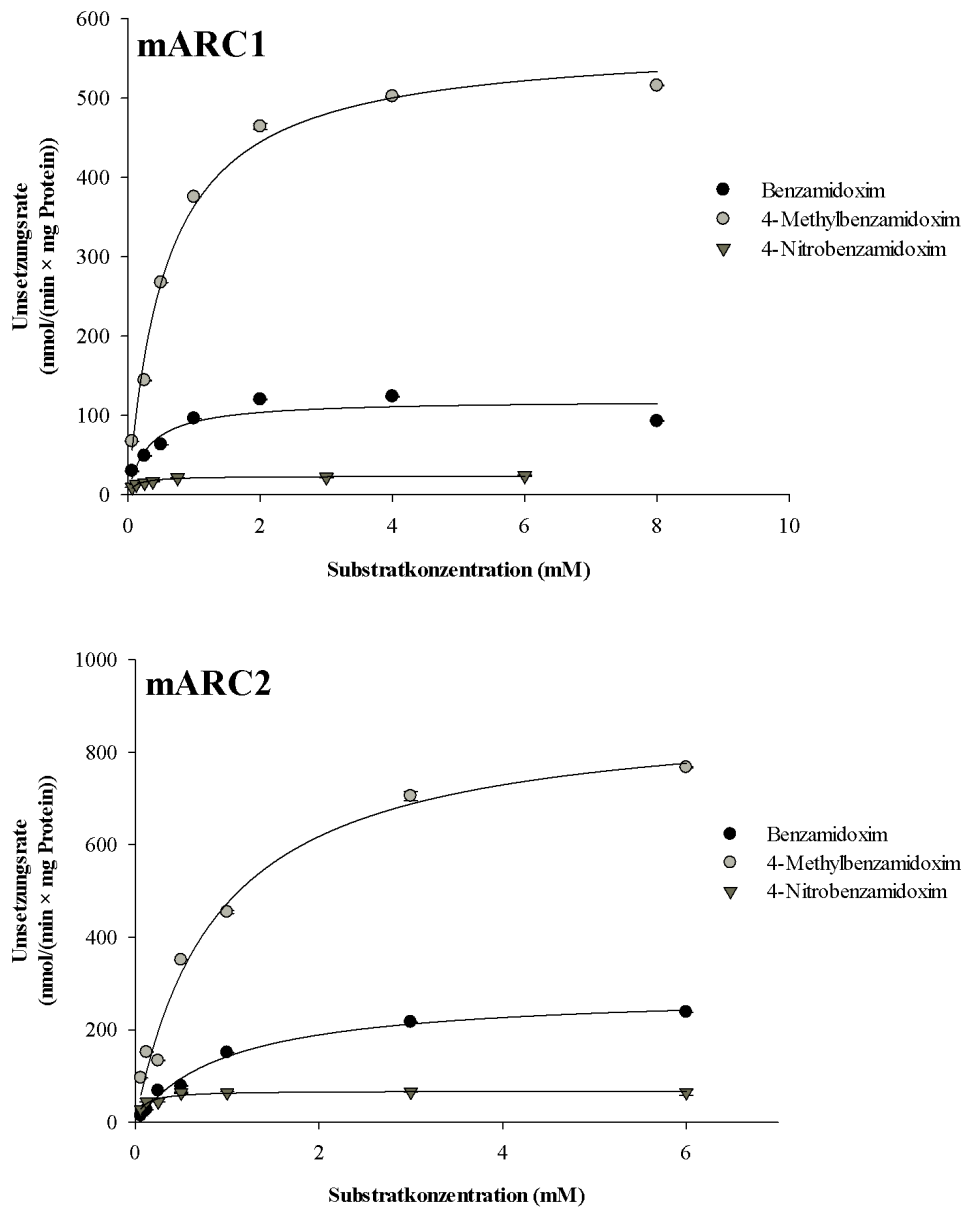


Abbildung 2.21: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von Benzamidoxim, 4-Methylbenzamidoxim und 4-Nitrobenzamidoxim durch das rekombinante mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und deren Aufarbeitung ist in Kapitel 2.2.5.1.3 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von je einem Inkubationsansatz, der doppelt vermessen wurde.

2.3.5 *N*-Reduktion durch die äußere mitochondriale Membranfraktion

Die enzymatische Reduktion unterschiedlich substituierter Benzamidoxime durch das mARC-Enzymsystem sollte zum einen mit den humanen rekombinanten Proteinen und zum anderen mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber charakterisiert werden, um Proteine verschiedener Spezies sowie beide Isoenzyme zu testen. Für die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber wurde daher im Folgenden ebenso wie für die rekombinanten Proteine der Einfluss der Inkubationszeit und der Substratkonzentration auf die enzymatische Reduktion untersucht. Die enzymkinetischen Parameter wurden anschließend mithilfe von SigmaPlot ermittelt. Zusätzlich wurde exemplarisch für diese Enzymquelle auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Reduktion analysiert.

2.3.5.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die enzymatische Reduktion

Die *N*-Reduktion aller untersuchten *para*-substituierten Benzamidoxime verlief bei Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion als Enzymquelle über mindestens 15 min linear abhängig von der Inkubationszeit. Für alle weiteren Untersuchungen wurde daher eine Inkubationszeit von 15 min gewählt. Exemplarisch gezeigt ist der Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von 4-Aminobenzamidoxim (s. Abbildung 2.22).

2.3.5.2 Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Reduktion

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime wurde exemplarisch unter Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber als Enzymquelle untersucht. Für entsprechende Biotransformationsstudien wurde ein pH-Optimum im leicht Sauren bei etwa pH 6 ermittelt. Daher wurde bei allen Inkubationen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, Puffer mit einem pH-Wert von 6,0 verwendet. In Abbildung 2.23 ist die Abhängigkeit der Reduktion von 4-Nitrobenzamidoxim vom pH-Wert des Inkubationsansatzes dargestellt. Auch bei physiologischen pH-Werten treten umfangreiche Umsetzungen auf.

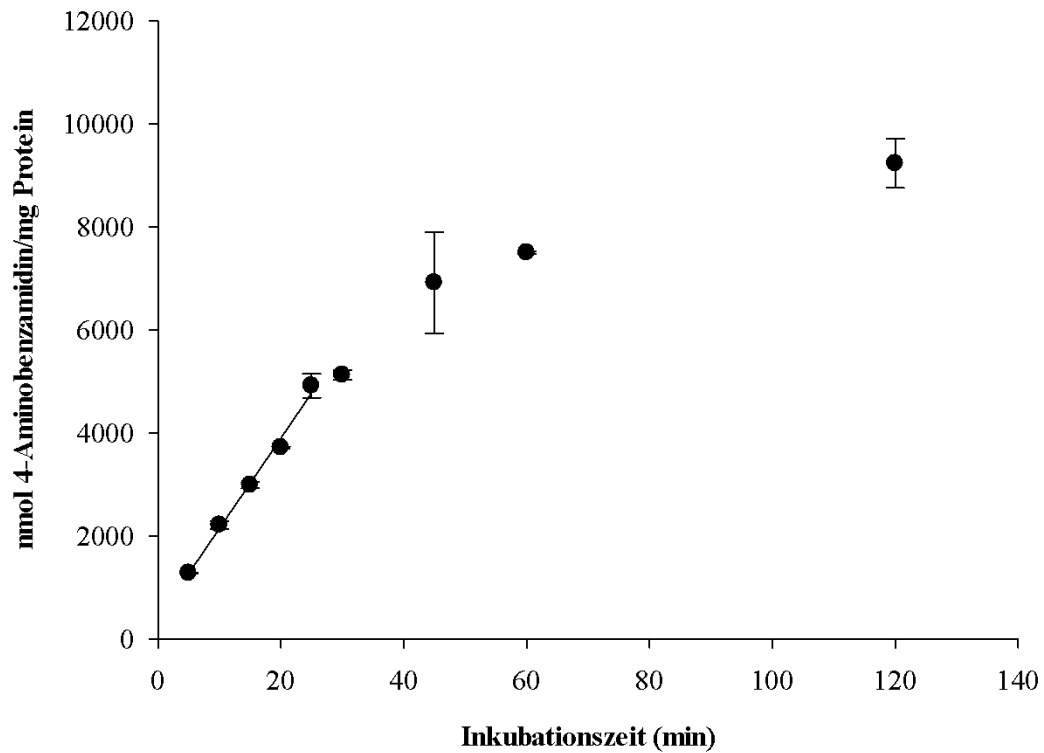


Abbildung 2.22: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von 4-Aminobenzamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.5.2.1 beschrieben. Inkubiert wurden Parallelansätze, die doppelt vermessen wurden. Die Reduktion verlief über 25 min zeitlinear ($R^2 = 0,9925$).

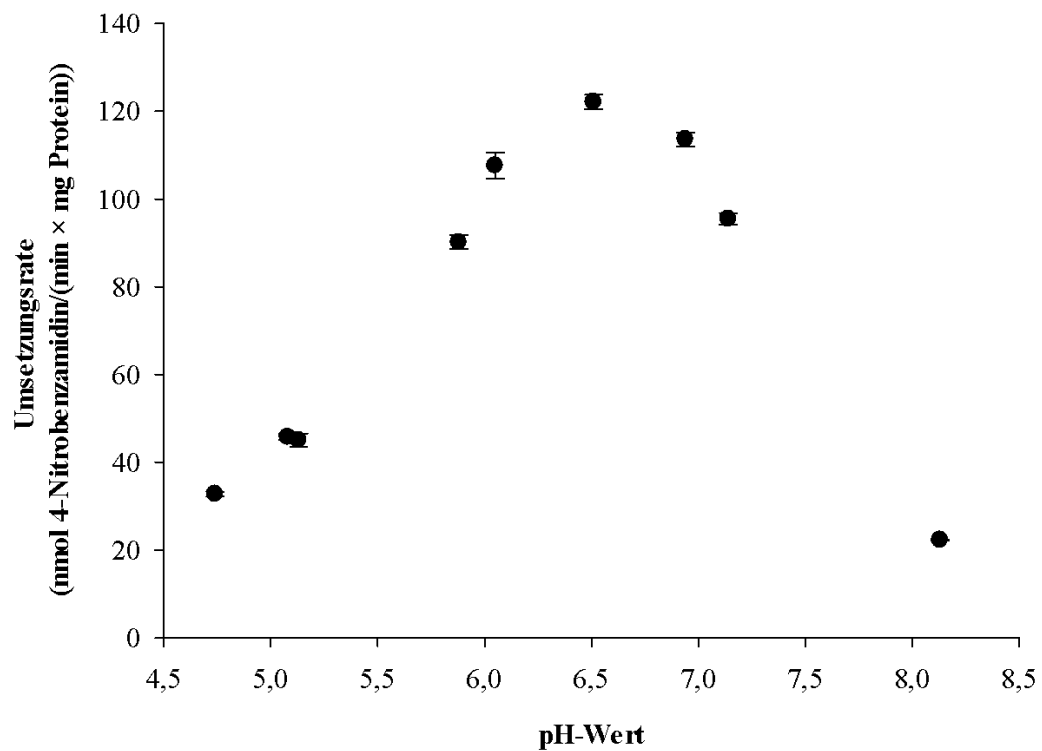


Abbildung 2.23: Einfluss des pH-Wertes auf die Reduktion von 4-Nitrobenzamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.5.2.2 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Inkubationsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Substituent	$V_{\max}^{[a]}$	K_M (mM)
CH ₃	353 ± 31 ^[c]	0,100 ± 0,017 ^[c]
CF ₃	256 ± 18 ^[b]	0,157 ± 0,040 ^[b]
Cl	220 ± 20	0,087 ± 0,017
Br	246 ± 17 ^[b]	0,066 ± 0,009 ^[b]
OCH ₃	237 ± 10 ^[b]	0,083 ± 0,017 ^[b]
H	208 ± 24 ^[b]	0,066 ± 0,016 ^[b]
NH ₂	252 ± 31 ^[c]	0,073 ± 0,004 ^[c]
CN	240 ± 12 ^[b]	0,240 ± 0,051 ^[b]
OH	232 ± 28 ^[b]	0,098 ± 0,007 ^[b]
NO ₂	166 ± 3 ^[c]	0,258 ± 0,036 ^[c]

Tabelle 2.3: Enzymkinetische Parameter der Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 2.2.5.2.3 beschrieben. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichungen aus sechs Bestimmungen.

[a] V_{\max} (nmol/(min × mg Protein)), [b] Mittelwerte ± Standardabweichungen aus fünf Bestimmungen, da ein Ausreißer nach Nalimov vorlag (Streck, 2004), [c] Mittelwert ± Standardabweichung aus vier Bestimmungen, da zwei Ausreißer nach Nalimov vorlagen (Streck, 2004).

2.3.5.3 Einfluss der Substratkonzentration auf die enzymatische Reduktion und Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Inkubation aller *para*-substituierten Benzamidoxime, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber führte zur Bildung der entsprechenden Benzamidin-Metabolite, welche mittels HPLC-Analytik detektiert und quantifiziert wurden. Die enzymatische Reduktion aller Verbindungen war abhängig von der Substratkonzentration und folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die enzymkinetischen Parameter K_M und V_{\max} wurden mittels SigmaPlot ermittelt (s. Tabelle 2.3). Der höchste V_{\max} -Wert wurde für 4-Methylbenzamidoxim und der geringste V_{\max} -Wert für 4-Nitrobenzamidoxim erhalten (s. Abbildung 2.24). Abbildung 2.25 zeigt einen Vergleich der Substratabhängigkeiten von 4-Methylbenzamidoxim, 4-Nitrobenzamidoxim und Benzamidoxim.

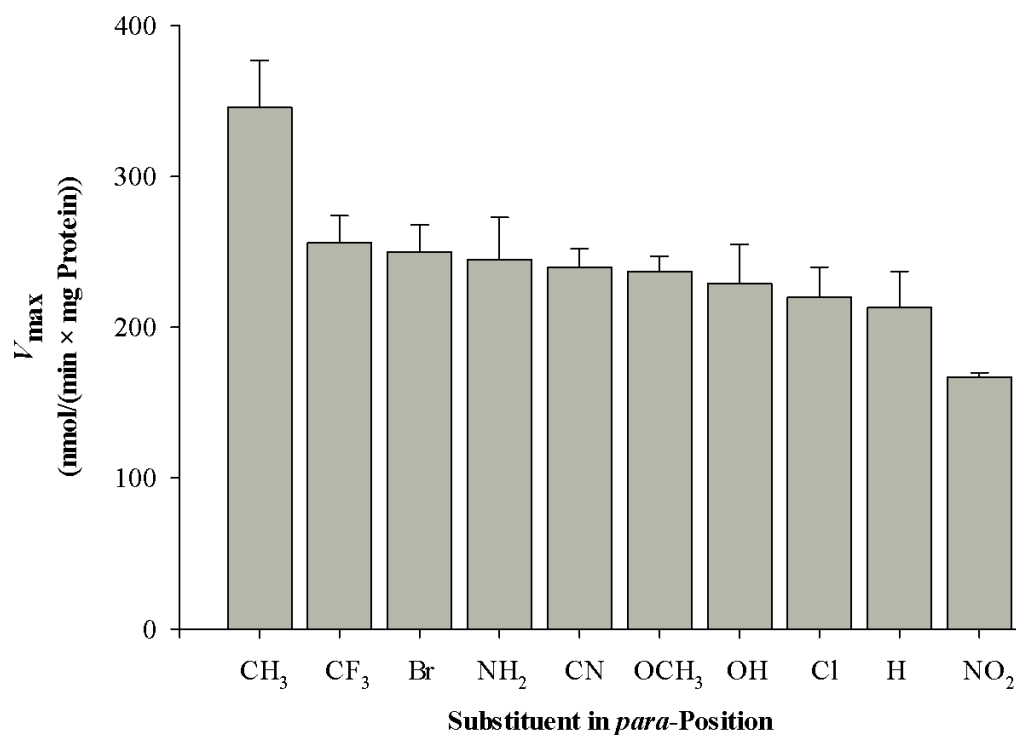


Abbildung 2.24: V_{\max} -Werte der Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber

V_{\max} -Werte wurden mittels SigmaPlot ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens fünf Bestimmungen (sechs Bestimmungen wurden durchgeführt, Ausreißer nach Nalimov wurden nicht berücksichtigt, s. Tabelle 2.3). Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und deren Aufarbeitung ist in Kapitel 2.2.5.2.3 beschrieben.

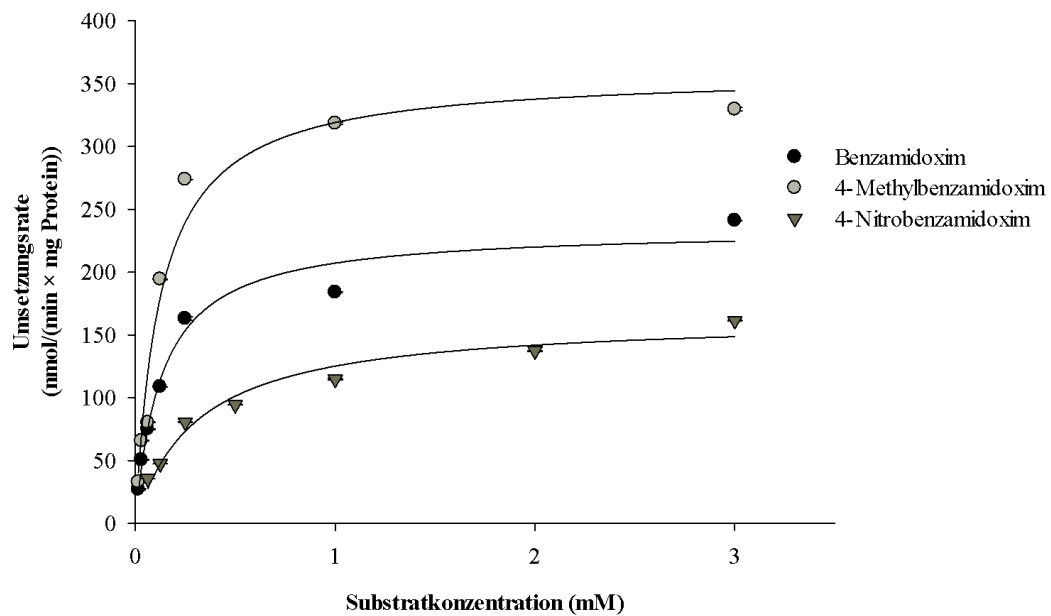


Abbildung 2.25: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von Benzamidoxim, 4-Methylbenzamidoxim und 4-Nitrobenzamidoxim durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und deren Aufarbeitung ist in Kapitel 2.2.5.2.3 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von je einem Inkubationsansatz, der doppelt per HPLC vermessen wurde.

2.3.6 Charakterisierung der elektrochemischen Reduktion von Benzamidoxim

Der Einfluss des Substituenten in *para*-Position von Benzamidoxim auf die elektrochemische Reduktion sollte durch Bestimmung der Redoxpotentiale untersucht und mit den Ergebnissen der enzymatischen Reduktion verglichen werden. In Vorversuchen wurde zunächst die elektrochemische Reduktion der unsubstituierten Verbindung (Benzamidoxim) näher charakterisiert.

2.3.6.1 Cyclische Voltammetrie

Das Cyclische Voltammogramm von Benzamidoxim in Abbildung 2.26 zeigt zwei irreversible Reduktionen bei -1,2 V und -1,4 V (alle Potentiale in dieser Arbeit sind gegenüber der Normalwasserstoffelektrode (NHE) angegeben). Um diese Potentiale, welche weit im negativen Spannungsbereich liegen, detektieren zu können, musste eine Quecksilber Arbeitselektrode verwendet werden. Bei Arbeitselektroden aus anderen Materialien wie Platin oder Glaskohlenstoff würde die Entwicklung von Wasserstoff in diesen Potentialbereichen stören, während Quecksilber eine besonders hohe Überspannung für die Protonenreduktion aufweist (Bard und Faulkner, 2000).

2.3.6.2 Differentielle Puls-Voltammetrie

Die Analyse von Benzamidoxim mittels Differentieller Puls-Voltammetrie lieferte ebenso wie die Cyclische Voltammetrie zwei Reduktionssignale im weit negativen Potentialbereich. Eine Erhöhung der Benzamidoxim-Konzentration führte zu einem Anstieg des kathodischen Stromflusses (s. Abbildung 2.27) und bestätigte somit, dass die detektierten Signale durch die Reduktion von Benzamidoxim bedingt sind.

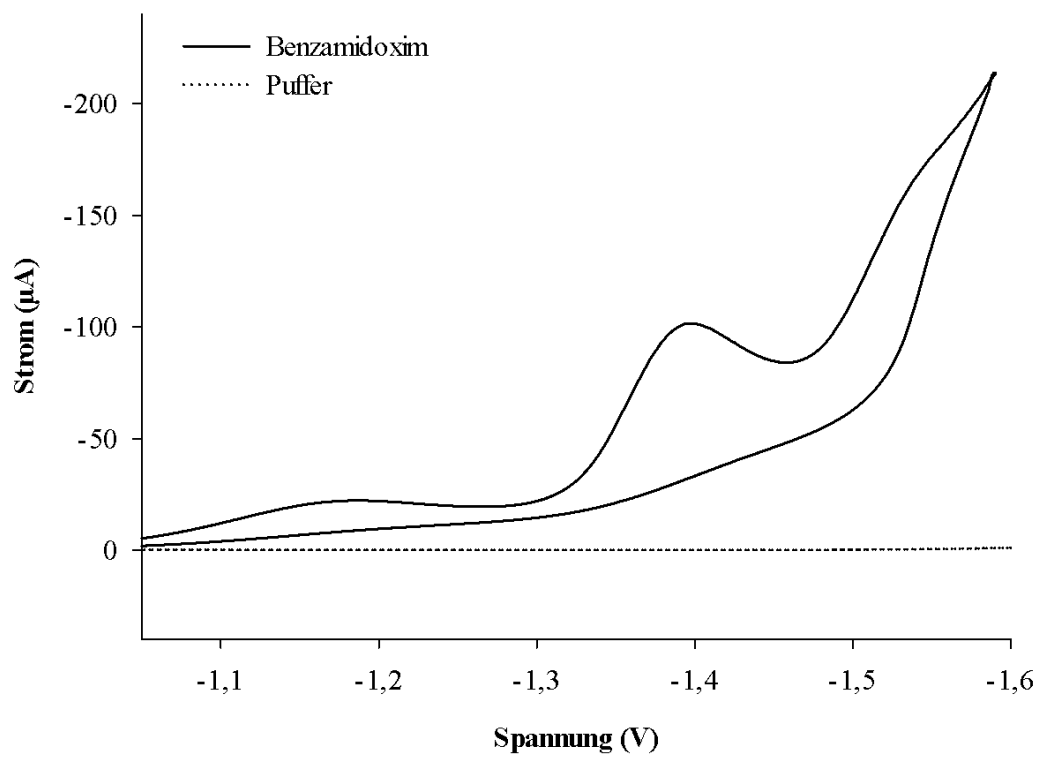


Abbildung 2.26: Cyclisches Voltammogramm der Reduktion von Benzamidoxim

Dargestellt ist die Reduktion von 5,5 mM Benzamidoxim in 500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 bei einer Scangeschwindigkeit von 100 mV s^{-1} .

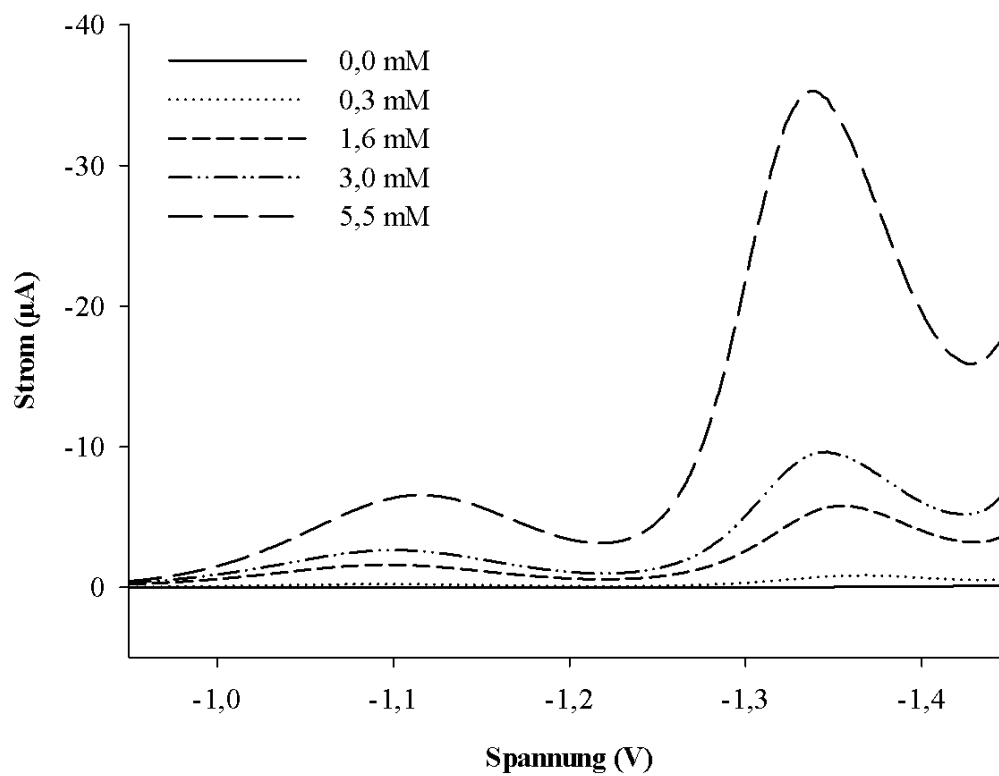


Abbildung 2.27: Differenzielles Puls-Voltammogramm der Reduktion von Benzamidoxim

Dargestellt ist die Reduktion von Benzamidoximlösungen unterschiedlicher Konzentration in 500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0.

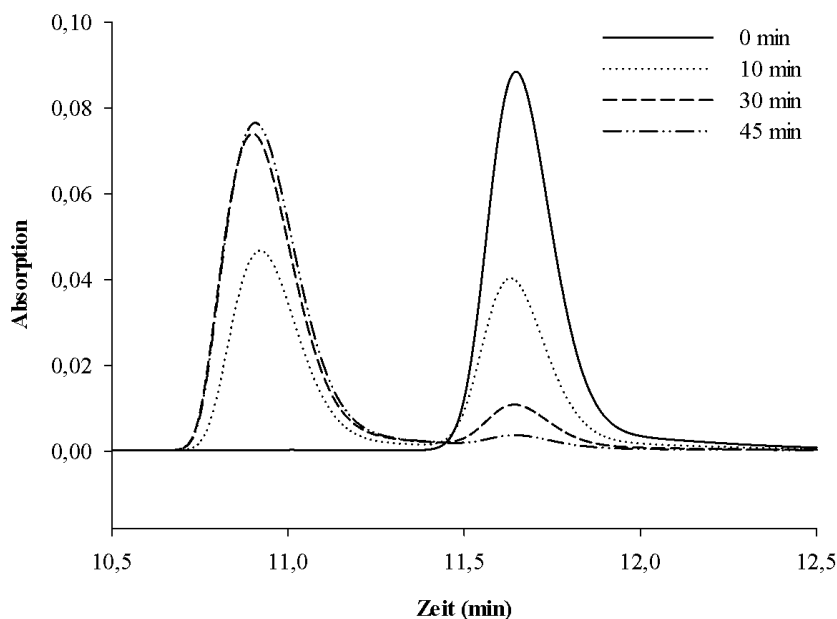


Abbildung 2.28: Repräsentativer Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms nach Elektrolyse von Benzamidoxim zur Überprüfung der Identität des Reduktionsproduktes

Die Bedingungen der Elektrolyse sowie die HPLC-Methode sind in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Nach Elektrolysedauern zwischen 0 und 45 min wurden Proben gezogen und per HPLC analysiert. Retentionszeiten: Benzamidin 10,9 min, Benzamidoxim 11,7 min.

2.3.6.3 Elektrolyse

In der Cyclischen Voltammetrie zeigte Benzamidoxim zwei irreversible Reduktionen bei -1,2 V und -1,4 V. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um die Reduktion zu Benzamidin handelt, wurde Benzamidoxim bei -1,2 V elektrolysiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde dem Reaktionsansatz eine Probe entnommen und die Identität des Reduktionsproduktes mittels HPLC überprüft.

Im Verlauf der Elektrolyse wurde ein neues Signal detektiert, das per HPLC-Vergleichsmessung tatsächlich dem Reaktionsprodukt Benzamidin zugeordnet werden konnte. Die Fläche dieses Signals nahm mit steigender Dauer der Elektrolyse zu (s. Abbildung 2.28). Somit wurde bestätigt, dass es sich bei -1,2 V um die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin handelt.

Bei einer Retentionszeit von 3,9 min wurde ein weiteres Signal detektiert, dessen Fläche mit steigender Dauer der Elektrolyse zunahm. Dieses erschien auch bei der zur Kontrolle durchgeführten Elektrolyse einer reinen Pufferlösung im Chromatogramm (s. Abbildungen 2.29 und 2.30). Benzamidoximlösungen, die nicht zur Elektrolyse in die elektrochemische Zelle überführt, sondern sofort per HPLC vermessen wurden, zeigten dieses Signal nicht. Daher wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um eine Nebenreaktion der zur Elektrolyse verwendeten Pufferlösung und nicht um ein weiteres Reduktionsprodukt von Benzamidoxim handelt.

Anhand von Benzamidoxim konnte somit gezeigt werden, dass die Reduktion der Amidoximfunktion in zwei Schritten erfolgt, wobei bei -1,2 V Benzamidoxim zu Benzamidin reduziert wird. Bei -1,4 V könnte durch weitere Reduktion eine instabile Verbindung, möglicherweise ein Diamin, gebildet werden. Diese könnte nachfolgend zersetzt werden, was eine Erklärung für die Irreversibilität der beobachteten Reduktionen liefert.

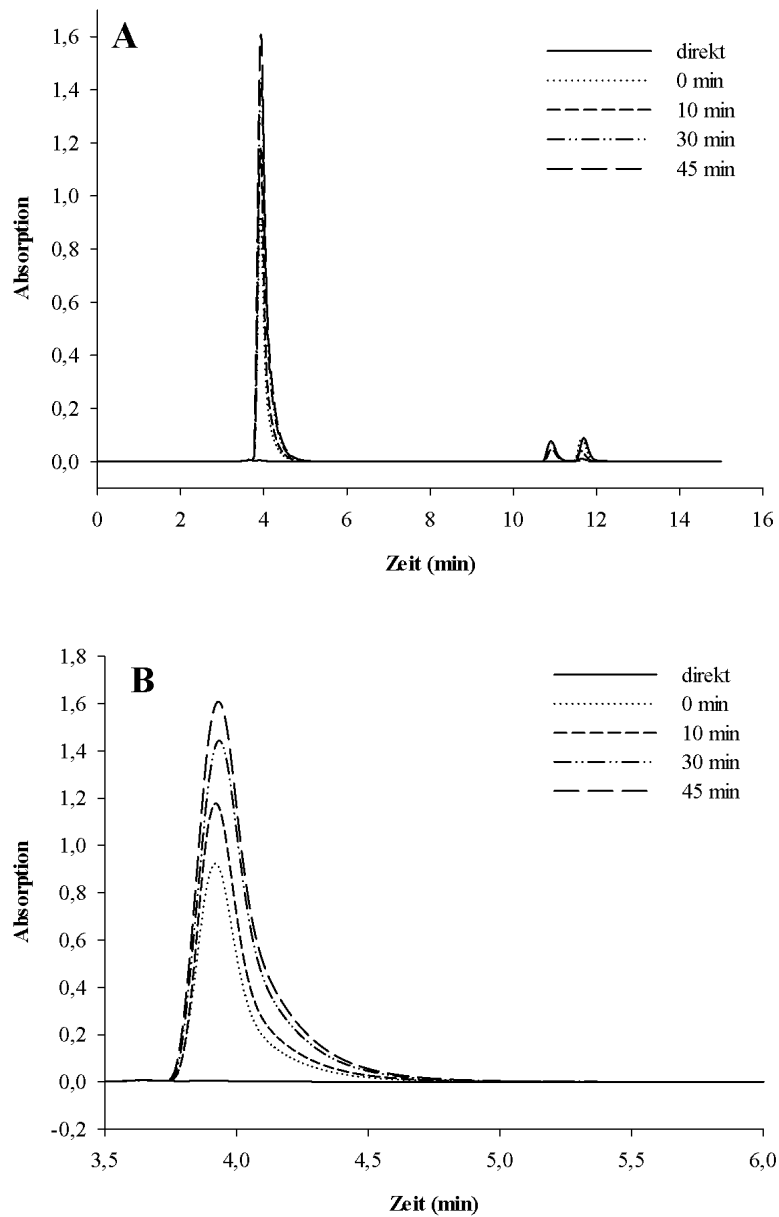


Abbildung 2.29: HPLC-Chromatogramm nach Elektrolyse von Benzamidoxim zur Analyse des Peaks bei 3,9 min (A)

Die Bedingungen der Elektrolyse sowie die HPLC-Methode sind in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Nach Elektrolysedauern zwischen 0 und 45 min wurden Proben gezogen und per HPLC analysiert. Direkt: HPLC-Analyse ohne vorherigen Kontakt der Lösung mit der elektrochemischen Zelle. (B) Vergrößerung des relevanten Ausschnitts des Chromatogramms (A)

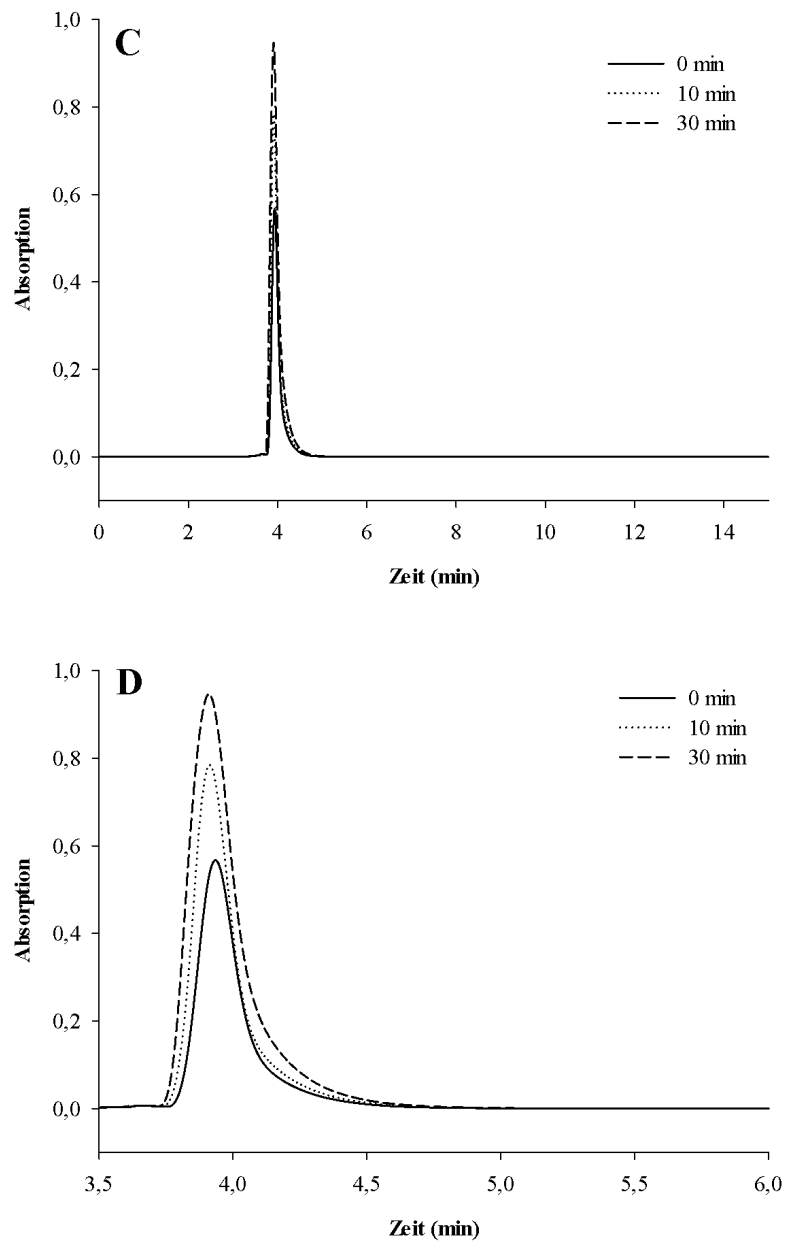


Abbildung 2.30: HPLC-Chromatogramm nach Elektrolyse von Kaliumphosphatpuffer zur Analyse des Peaks bei 3,9 min (C)

Die Bedingungen der Elektrolyse sowie die HPLC-Methode sind in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Nach Elektrolysedauern zwischen 0 und 45 min wurden Proben gezogen und per HPLC analysiert. (D) Vergrößerung des relevanten Ausschnitts des Chromatogramms (C)

Substituent	E_{red1} (V)	E_{red2} (V)
CN	-0,81	-0,95
Br	-0,97	-1,24
CF ₃	-0,99	-1,17
Cl	-1,01	-1,26
CH ₃	-1,08	-1,44
H	-1,09	-1,36
OCH ₃	-1,09	-1,42
NO ₂	-1,10	-1,35
NH ₂	-1,10	-1,36
OH	-1,17	-1,49

Tabelle 2.4: Redoxpotentiale *para*-substituierter Benzamidoxime

Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Alle Potentiale sind gegenüber NHE angegeben.

2.3.7 Bestimmung der Redoxpotentiale *para*-substituierter Benzamidoxime mittels Differentieller Puls-Voltammetrie

Für alle Verbindungen wurden mittels Differentieller Puls-Voltammetrie zwei Reduktionssignale im Potentialbereich von etwa -0,8 V bis -1,5 V detektiert (s. Tabelle 2.4).

Für 4-Nitro- und 4-Aminobenzamidoxim wurden identische Redoxpotentiale ermittelt. Abweichend von den übrigen Verbindungen zeigte 4-Nitrobenzamidoxim im Voltammogramm aber zusätzlich ein drittes Reduktionssignal bei etwa 0 V (s. Abbildung 2.31). Vermutlich handelt es sich hierbei um die Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe. In elektrochemischen Experimenten mit 4-Nitrobenzamidoxim würde somit bei Potentialen kleiner 0 V zuerst 4-Aminobenzamidoxim gebildet, was eine Erklärung dafür liefert, dass für die elektronisch eigentlich stark verschiedenen Nitro- und Aminoverbindungen identische Redoxpotentiale detektiert wurden.

Somit wurden für alle untersuchten *para*-substituierten Benzamidoxime zwei Signale, bedingt durch die Reduktion der Amidoximfunktion, erhalten. Sowohl für E_{red1} als auch E_{red2} unterscheiden sich die Potentiale der unterschiedlich substituierten Verbindungen um bis zu 500 mV, was einen deutlichen Hinweis auf den Einfluss des Substituenten auf die elektrochemische Reduktion liefert.

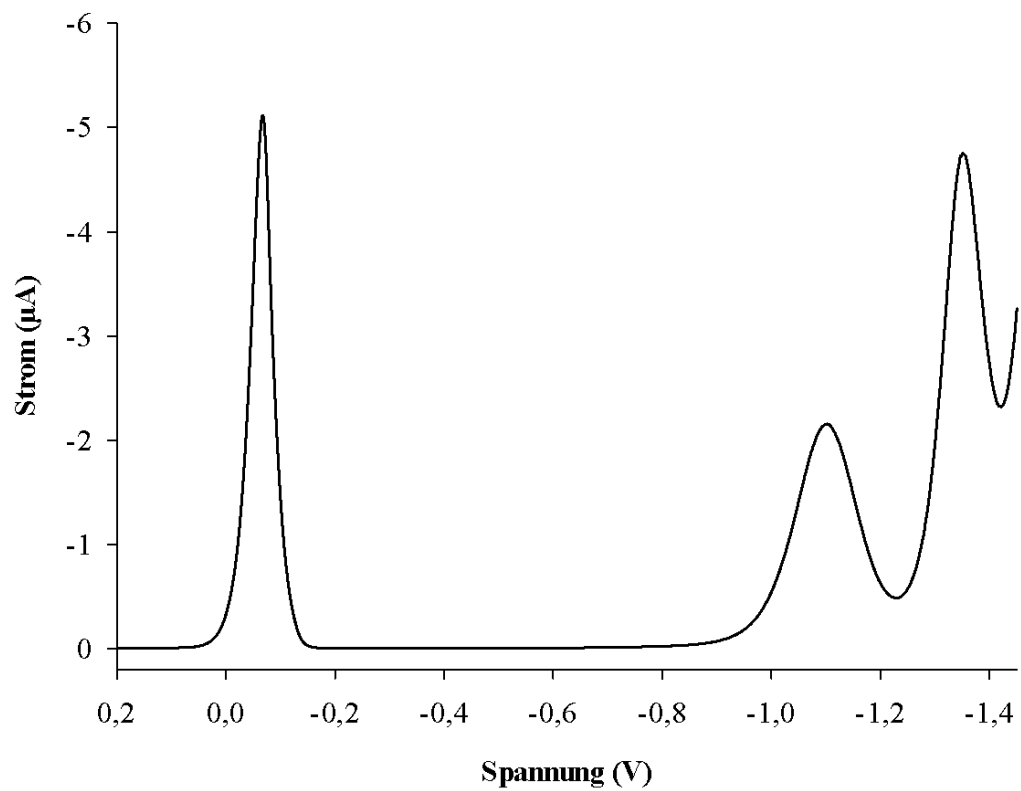


Abbildung 2.31: Differentielles Puls-Voltammogramm der Reduktion von 4-Nitrobenzamidoxim

Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 2.2.6 beschrieben.

2.3.8 ¹H-NMR-Spektroskopie *para*-substituierter Benzamidoxime

Um zu überprüfen, ob die physikochemischen Eigenschaften der Amidoximfunktion der untersuchten Benzamidoxim-Derivate durch den Substituenten in *para*-Position beeinflusst werden, wurden zunächst die chemischen Verschiebungen (δ) der Oxim- und Amin-Protonen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie in DMSO-*d*₆ bestimmt (s. Kapitel 2.2.8):

Substituent	σ	$\delta(\text{NOH})$ (ppm)	$\delta(\text{NH}_2)$ (ppm)
NH ₂	-0,57	9,16	5,49
OH	-0,38	9,33	5,61
OCH ₃	-0,28	9,43	5,70
CH ₃	-0,14	9,50	5,72
H	0,00	9,60	5,78
Cl	0,24	9,71	5,85
Br	0,26	9,72	5,85
CF ₃	0,53	9,90	5,96
CN	0,70	10,01	5,99
NO ₂	0,81	10,12	6,05

Anschließend wurde mittels SigmaPlot eine Korrelationsanalyse zwischen den chemischen Verschiebungen und den Hammett-Konstanten (σ) der entsprechenden Substituenten nach March (1985) durchgeführt (Konfidenzintervalle, P = 0,95):

	Zusammenhang	R ²
Amin-Protonen	$\delta(\text{NH}_2) = (0,37 \pm 0,02)\sigma + (5,76 \pm 0,01)$	0,976 (n = 10)
Oxim-Protonen	$\delta(\text{NOH}) = (0,65 \pm 0,01)\sigma + (9,57 \pm 0,01)$	0,993 (n = 10)

Sowohl für die Oxim- als auch die Amin-Protonen wurden Regressionsgeraden mit linearem Verlauf erhalten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ein Zusammenhang zwischen den physikochemischen Verhältnissen der Amidoximfunktion, repräsentiert durch die chemischen Verschiebungen, und den elektronischen Eigenschaften der Substituenten in *para*-Position, repräsentiert durch die Hammett-Konstanten, besteht.

Die Regressionsgerade der Oxim-Protonen verläuft mit einer Steigung von 0,65 steiler als die der Amin-Protonen mit einer Steigung von nur 0,37. Der Einfluss des Substituenten ist somit bei den Oxim-Protonen stärker ausgeprägt als bei den Amin-Protonen.

2.3.9 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Ziel der Arbeiten in diesem Kapitel war es, den Einfluss des Substituenten auf die mARC-katalysierte enzymatische Reduktion und die elektrochemische Reduktion *para*-

Enzym	Zusammenhang	R ²
OMV	$\log V_{\max}/K_M = -(0,48 \pm 0,11)\sigma + (3,41 \pm 0,05)$	0,611 (n = 9) ^[a]
mARC1	$\log V_{\max}/K_M = -(0,49 \pm 0,10)\sigma + (2,59 \pm 0,04)$	0,701 (n = 9) ^[a]
mARC2	ND	
OMV	$\log V_{\max}/K_M = -(0,50 \pm 0,07)\sigma + (0,22 \pm 0,05)\pi + (3,38 \pm 0,03)$	0,878 (n = 9) ^[a]

Tabelle 2.5: Einfluss des Substituenten auf die enzymatische Reduktion

Zur Korrelationsanalyse wurden die unter 2.3.4.3 und 2.3.5.3 bestimmten kinetischen Parameter verwendet, wobei Ausreißer nach Nalimov für K_M bzw. V_{\max} ausgeschlossen wurden. Konfidenzintervalle, $P = 0,95$, ND = nicht detektierbar, [a] 4-Aminobenzamidoxim wurde nicht berücksichtigt.

substituierter Benzamidoxime zu untersuchen, beide Reduktionswege zu vergleichen und mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufzuklären.

Hierfür wurden Korrelationsanalysen mittels SigmaPlot durchgeführt. Bei der enzymatischen Reduktion wurden die unter 2.3.4.3 und 2.3.5.3 ermittelten kinetischen Parameter K_M und V_{\max} und bei der elektrochemischen Reduktion die unter 2.3.7 bestimmten Redoxpotentiale als abhängige Variablen eingesetzt. Als unabhängige Variablen wurden die Hammett-Konstanten (σ) nach March (1985), als Maß für die elektronischen Eigenschaften der Substituenten, sowie die Hansch'schen Hydrophobie-Konstanten (π), als Maß für den Beitrag des Substituenten zur Gesamtlipophilie des Moleküls, verwendet (Hansch und Leo, 1979).

2.3.9.1 Einfluss des Substituenten auf die enzymatische Reduktion

Für die äußere mitochondriale Membranfraktion und das mARC1-haltige rekombinante Enzymsystem konnte mittels Korrelationsanalyse eine Abhängigkeit des Parameters $\log V_{\max}/K_M$ von der Hammett-Konstante (σ) detektiert werden (s. Tabelle 2.5).

Die negativen Steigungen der erhaltenen Regressionsgeraden sagen aus, dass elektroenschiebende Substituenten wie die Methylgruppe mit negativem σ die *N*-Reduktion begünstigen und elektronenziehende Substituenten wie die Nitrogruppe mit positivem σ diese erschweren. Mit Steigungen von nur 0,49 (mARC1) bzw. 0,48 (OMV) scheint diese Beeinflussung jedoch relativ schwach zu sein, wofür auch die geringen R²-Werte von nur 0,701 (mARC1) bzw. 0,611 (OMV) sprechen. In beiden Fällen wurde die Aminoverbindung von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen, da sie abweichendes Verhalten bei der *N*-Reduktion zeigte. Für mARC2 konnte mittels Korrelationsanalyse kein Zusammenhang zwischen den enzymkinetischen Parametern und Hammett-Konstanten detektiert werden.

Für keine der verwendeten Enzymquellen wurde mittels linearer Regressionsanalyse eine Abhängigkeit des Parameters $\log V_{\max}/K_M$ von der Hydrophobie-Konstante nach Hansch detektiert.

Zusammenhang	R ²
$E_{red1} = (0,26 \pm 0,04)\sigma - (1,06 \pm 0,02)$	0,845 (n = 8) ^[a]
$E_{red2} = (0,44 \pm 0,04)\sigma - (1,34 \pm 0,02)$	0,929 (n = 8) ^[a]

Tabelle 2.6: Einfluss des Substituenten auf die elektrochemische Reduktion

Zur Korrelationsanalyse wurden die unter 2.3.7 bestimmten Redoxpotentiale verwendet. Konfidenzintervalle, P = 0,95, [a] 4-Nitrobenzamidoxim und 4-Aminobenzamidoxim wurden nicht berücksichtigt.

Die Erweiterung von der linearen zur multiplen linearen Regressionsanalyse lieferte für die OMV, wiederum unter Ausschluss der Aminoverbindung, eine Abhängigkeit des Parameters $\log V_{\max}/K_M$ von Hammett- und Hansch-Konstante. Diese sagt aus, dass elektronenschiebende Substituenten mit negativem σ und lipophile Substituenten mit positivem π die N-Reduktion begünstigen. Das Bestimmtheitsmaß liegt mit 0,878 höher als bei der zuvor beschriebenen Abhängigkeit des Parameters $\log V_{\max}/K_M$ von der Hammett-Konstante. Die Kombination mehrerer physikochemischer Parameter der Substituenten scheint somit eher geeignet, Unterschiede in der Reduktion zu erklären, als die Betrachtung nur einer Eigenschaft wie der elektronischen Verhältnisse.

2.3.9.2 Einfluss des Substituenten auf die elektrochemische Reduktion

Die elektrochemische Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime, charakterisiert durch die mittels Differentieller Puls-Voltammetrie bestimmten Redoxpotentiale, zeigte eine lineare Abhängigkeit von den elektronischen Eigenschaften der Substituenten, repräsentiert durch die Hammett-Konstante (σ) (s. Tabelle 2.6).

Wie unter 2.3.7 beschrieben, verlief die elektrochemische Reduktion in zwei Stufen, so dass für jede Verbindung zwei Redoxpotentiale ermittelt wurden. Für beide Reduktionsschritte wurde eine Regressionsgerade mit linearem Verlauf erhalten ($R^2 = 0,845$ für E_{red1} bzw. $R^2 = 0,929$ für E_{red2}). Die positive Steigung beider Geraden sagt aus, dass elektronenziehende Substituenten mit positivem σ die Aufnahme von Elektronen und somit die Reduktion begünstigen.

4-Nitrobenzamidoxim musste von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen werden, da aufgrund der Reduktion der Nitrogruppe bei etwa 0 V keine Bestimmung des Redoxpotentials von 4-Nitrobenzamidoxim mittels Differentieller Puls-Voltammetrie möglich war (s. Kapitel 2.3.7). Ebenso wurde 4-Aminobenzamidoxim nicht berücksichtigt, da die ermittelten Redoxpotentiale abweichendes Verhalten gegenüber den Übrigen zeigten (s. Tabelle 2.4).

2.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen durch das humane, rekonstituierte rekombinante mARC-Enzymsystem bzw. durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber untersucht. Neben der enzymatischen Reduktion wurden die Redoxpotentiale der Verbindungen bestimmt, um die elektrochemische Reduktion zu charakterisieren und erstmals beide Reduktionswege miteinander zu vergleichen.

Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der enzymatischen Reduktion verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime nicht durch die elektronischen Eigenschaften der Substituenten oder deren Lipophilie bedingt sind. Im Unterschied dazu konnte per Korrelationsanalyse eine Beeinflussung der elektrochemischen Reduktion durch die elektronischen Eigenheiten des Substituenten ermittelt und somit ein Unterschied zwischen beiden Reduktionswegen aufgezeigt werden.

In vorherigen Studien von Karhan (2002) wurde bereits die Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime charakterisiert und der Einfluss des Substituenten analysiert, allerdings wurden hierbei Mikrosomen bzw. ein rekonstituiertes System, bestehend aus CYP2D, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, welche aus der Schweineleber gereinigt wurden, als Enzymquellen eingesetzt. Anders als in Arbeiten von Clement und Zimmermann (1988), welche eine Begünstigung der *N*-Oxidation *para*-substituierter Benzamide durch elektronenschiebende Substituenten im mikrosomalen System beschreiben, zeigen die Ergebnisse von Karhan, dass Unterschiede in der *N*-Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime durch Mikrosomen nicht durch die elektronischen Eigenschaften der Substituenten zu erklären sind. Für das rekonstituierte System konnte Karhan eine Begünstigung der enzymatischen Umsetzung durch elektronenschiebende Substituenten ermitteln.

Erst 2006 wurde mARC als dritte Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase identifiziert und die Lokalisation in der äußeren mitochondrialen Membran gezeigt (Havemeyer *et al.*, 2006). Die rekombinante Herstellung aller drei Komponenten des Enzymsystems und der Einsatz im rekonstituierten System bei *in vitro* Biotransformationsstudien wurde seitdem etabliert (Wahl *et al.*, 2010; Plitzko, 2010). Die erneute Charakterisierung der Reduktion der von Karhan untersuchten Substrate, erweitert um 4-Aminobenzamidoxim, 4-Hydroxybenzamidoxim und 4-Trifluormethylbenzamidoxim, konnte somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit am optimierten Enzymsystem durchgeführt werden.

Alle untersuchten *para*-substituierten Benzamidoxime wurden sowohl durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber als auch das humane mARC1- bzw. mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem zu den korrespondierenden Benzamidinen umgesetzt, wobei alle Reduktionen einer Michaelis-Menten-Kinetik folgten. Bei allen drei Enzymquellen wurden die höchsten V_{\max} -Werte für die Methyl- und die geringsten für die Nitroverbindung detektiert. Hierbei unterschieden sich die Umsetzungen beider Substrate bei Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion nur um den Faktor 2, während beim rekombinanten Enzymsystem deutliche

Unterschiede (Faktor 26 bei mARC1, Faktor 12 bei mARC2) vorlagen.

Für OMV und mARC1 lieferte die lineare Korrelationsanalyse eine Beziehung zwischen $\log V_{\max}/K_M$ und der Hammett-Konstante, welche aussagt, dass elektronenschiebende Substituenten die *N*-Reduktion begünstigen und elektronenziehende diese erschweren. Die multiple lineare Regressionsanalyse erweiterte diese Aussage im Falle der OMV dahingehend, dass neben den elektronenschiebenden Eigenschaften des Substituenten auch eine hohe Lipophilie des Substituenten die Reduktion begünstigt.

Allerdings waren die Steigungen der erhaltenen Regressionsgeraden ebenso wie die R^2 -Werte gering und deuten darauf hin, dass die detektierten Unterschiede in der *N*-Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime vermutlich nicht durch die elektronischen Eigenschaften der Substituenten oder deren Lipophilie bedingt sind. Bei der Entwicklung neuer Amidoxim-Prodrugs könnten diese Eigenschaften somit zumindestens hinsichtlich der Bioaktivierung vernachlässigt werden.

Von Cerdá *et al.* (1985) wurde am Beispiel von Ethandiamidoxim bereits die elektrochemische Reduktion der Amidoximfunktion beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese erstmals anhand von Benzamidoxim sowohl mittels Cyclischer Voltammetrie als auch Differentieller Puls-Voltammetrie analysiert, wobei mit beiden Methoden zwei Reduktionsschritte detektiert wurden. Durch Elektrolyse mit nachfolgender HPLC-Analytik konnte gezeigt werden, dass es sich beim ersten Schritt um die Reduktion der Amidoxim- zur Amidinfunktion handelt. Beim zweiten Schritt könnte es sich um die Reduktion bis zum Diamin handeln, was durch weitere Experimente zu klären ist und im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden konnte.

Anders als für die enzymatische Reduktion, konnte für die elektrochemische Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime mittels Korrelationsanalyse ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Redoxpotentialen und Hammett-Konstanten der Substituenten detektiert werden. Im Falle beider Reduktionsschritte begünstigten elektronenziehende Substituenten die Elektronenaufnahme, während elektronenschiebende Substituenten diese erschweren und entsprechend negativere Redoxpotentiale bedingen.

Für alle untersuchten *para*-substituierten Benzamidoxime wurden Redoxpotentiale im weit negativen Potentialbereich zwischen -0,81 V und -1,49 V ermittelt. Für die enzymatische Reduktion hatten Havemeyer *et al.* (2011) einen Mechanismus in Analogie zur Nitratreduktase postuliert. Hierbei wird davon ausgegangen, dass NADH Elektronen liefert und diese über die Cytochrom b_5 Reduktase zunächst auf Cytochrom b_5 , von dort auf den Molybdäncofaktor und anschließend auf das Substrat übertragen werden. Daher waren für die *para*-substituierten Benzamidoxime als mARC-Substrate Redoxpotentiale zu erwarten, die oberhalb des Potentials von -310 mV *vs.* NHE für NADH liegen (Carlson und Miller, 1985).

Ein möglicher Grund für die Unterschiede zwischen enzymatischer und elektrochemischer Reduktion und die unerwartet negativen Potentiale ist, dass die Bedingungen an der Oberfläche der Quecksilberelektrode bei der Untersuchung der elektrochemischen Reduktion der Verbindungen in wässriger Lösung offenbar nicht die Bedingungen der enzymatischen Reduktion widerspiegeln.

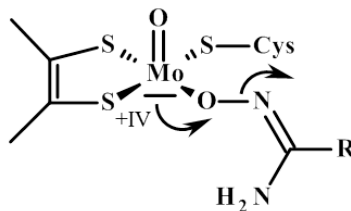


Abbildung 2.32: Koordinative Bindung zwischen Mo^{IV} im aktiven Zentrum von mARC und Substrat

Aus dem hypothetischen Mechanismus der enzymatischen Reduktion nach Havemeyer *et al.* (2011)

Im enzymatischen System wird davon ausgegangen, dass eine koordinative Bindung zwischen deprotoniertem Substrat und Mo^{IV} des Molybdäncofaktors im aktiven Zentrum von mARC gebildet wird (s. Abbildung 2.32) (Havemeyer *et al.*, 2011; Giles *et al.*, 2014). Diese könnte die Reduktion stark begünstigen und erklären, warum für die freien Substrate in Lösung Redoxpotentiale unterhalb von -310 mV detektiert wurden, obwohl NADH im enzymatischen System als Elektronendonator fungiert. Der Einfluss der koordinativen Bindung scheint im Falle der enzymatischen Reduktion stärker zu sein als der Einfluss der elektrochemischen Eigenschaften der Substituenten. Dies könnte erklären, warum ein eindeutiger Zusammenhang zwischen elektrochemischer, nicht aber enzymatischer Reduktion und den Hammett-Konstanten detektiert wurde.

Um die Unterschiede beider Reduktionswege detaillierter aufzuklären, sind weitere Experimente nötig. So ist der Mechanismus der enzymatischen mARC-katalysierten Reduktion bisher von hypothetischem Charakter, eine endgültige Beurteilung steht noch aus. Die tatsächliche Bedeutung der koordinativen Bindung zwischen Mo^{IV} und dem Substrat könnte durch Versuche mit Mo^{IV} -Modellverbindungen bestätigt werden. Hierbei sollte getestet werden, ob eine entsprechende Modellverbindung Benzamidoxim zu Benzamidin reduzieren kann, obwohl die Modellverbindung ein positiveres Redoxpotential als Benzamidoxim aufweist.

Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der enzymatischen Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime vermutlich weder durch die elektronischen Eigenschaften der Substituenten noch deren Lipophilie bedingt sind. Allerdings wurden nur zehn Verbindungen untersucht, welche sich lediglich in *para*-Position unterscheiden. In weiteren Studien könnten *meta*-substituierte Derivate oder solche, die aliphatische Ketten unterschiedlicher Länge aufweisen, eingesetzt werden, um beispielsweise auch sterische Effekte zu testen.

Die Kristallstruktur von mARC ist bisher nicht aufgeklärt. Aufgrund erster Versuche wird derzeit vermutet, dass der Molybdäncofaktor an der Oberfläche des Proteins vorliegt und somit auch für größere Substratmoleküle gut zugänglich sein müsste. Sobald neue Erkenntnisse über die Struktur von mARC vorliegen, sollten daher zusätz-

lich 3D-QSAR-Analysen durchgeführt werden, um die rationale Entwicklung neuer Amidoxim-Prodrugs zu optimieren.

2.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal seit der Identifizierung von mARC im Jahre 2006 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der mARC-katalysierten Reduktion unter Verwendung des optimierten, rekonstituierten rekombinanten Enzymsystem sowie der OMV untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass weder die elektronischen Eigenschaften der Substituenten in *para*-Position des Modellsubstrates Benzamidoxim noch deren Lipophilie für Unterschiede in der enzymatischen Reduktion verantwortlich sind. Somit können diese Eigenschaften zumindest hinsichtlich der Bioaktivierung bei der Entwicklung neuer Amidoxim-Prodrugs vernachlässigt werden.

Erstmals wurden die Redoxpotentiale *para*-substituierter Benzamidoxime bestimmt und gezeigt, dass elektronenziehende Substituenten die elektrochemische Reduktion zum korrespondierenden Benzamidin erleichtern, während elektronenschiebende Substituenten diese erschweren.

Die Gründe für Unterschiede der elektrochemischen und enzymatischen Reduktion sollten in weiterführenden Studien näher untersucht werden, wobei hierbei insbesondere die Rolle der koordinativen Bindung zwischen Molybdäncofaktor und Substrat im enzymatischen System geprüft werden sollte.

3 Bestimmung des Redoxpotentials von mARC1

3.1 Einleitung

3.1.1 Methoden der Proteinelektrochemie

Erste Versuche zur Proteinelektrochemie wurden bereits 1930 an Quecksilbertropfenelektroden durchgeführt (Heyrovský und Babička, 1930). Bei der Untersuchung wässriger Lösungen, welche humanes Serum enthielten, wurde bei -1,6 V ein wellenförmiger Anstieg des Stroms beobachtet, der nicht durch eine Reduktion der im Serum vorhandenen Metallkationen erklärt werden konnte. Durch Zugabe von Ammoniumionen ließ sich dieser Effekt verstärken. Es konnte aufgeklärt werden, dass das im Serum enthaltene Albumin die elektrochemische Wasserstoffentwicklung katalysiert und so für das Auftreten des zuvor unerklärlichen wellenförmigen Stromanstiegs verantwortlich war.

In den Anfängen der Proteinelektrochemie wurden zunächst Proteine, welche in der elektrochemischen Zelle gelöst vorlagen, analysiert. 1962 wurde erstmals ein Modell beschrieben, bei dem das Enzym zwischen zwei Membranen auf der Elektrodenoberfläche aufgebracht war (Clark und Lyons, 1962). Ausgehend von diesen Arbeiten wurden später Biosensoren, etwa zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels, entwickelt (Wang, 2008).

Betso *et al.* (1972) führten elektrochemische Studien mit Hämproteinen durch und diskutierten den Einfluss der Adsorption von Proteinen an der Elektrodenoberfläche auf das elektrochemische Verhalten. 1977 konnte erstmals ein reversibler Elektronentransfer zwischen Cytochrom c und einer Elektrode gezeigt werden. Yeh und Kuwana (1977) detektierten mittels Cyclischer Voltammetrie und Differentieller Puls-Voltammetrie eine diffusionskontrollierte, reversible Reaktion an einer Indiumoxid-elektrode, während von Eddowes und Hill (1977) ein quasi-reversibler ein-Elektronenprozess in Anwesenheit von 4,4'-Bipyridin an einer Goldelektrode beschrieben wurde. Fortan wurde in 4,4'-Bipyridin die erste Verbindung gesehen, die als Art Brücke zwischen Elektrode und Protein fungieren kann, so die Orientierung des Proteins beeinflusst und einen Elektronentransfer ermöglicht.

In Folge wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um die Adsorption von Proteinen auf Elektroden unterschiedlicher Materialien zu optimieren. Seitdem wurden zahlreiche Proteine, welche einen oder auch mehrere Cofaktoren enthalten, mittels direkter Proteinelektrochemie charakterisiert, wie etwa Myoglobin (King und Hawkrode, 1987) und Hämoglobin (Scheller *et al.*, 2005) sowie Katalase, Sulfitoxidase

oder Theophyllinoxidase (Ferapontova *et al.*, 2005).

In den Jahren um 1970-1980 wurden in Russland von Berezin *et al.* erste Arbeiten zur Bioelektrokatalyse, der Beschleunigung elektrochemischer Reaktionen in Anwesenheit von Enzymen, durchgeführt (Varfolomeev *et al.*, 1977; Suprun *et al.*, 2014). Seitdem wurde die direkte Bioelektrokatalyse an zahlreichen Cofaktor-haltigen Enzymen, etwa der Häm-haltigen Meerrettichperoxidase (Ferapontova, 2004) oder Alkoholdehydrogenase (Ikeda *et al.*, 1993), beschrieben.

Von Bedeutung bei der direkten Proteinelektrochemie ist insbesondere die Stabilität und Orientierung des Enzyms, welches an der Elektrodenoberfläche immobilisiert vorliegt (Ferapontova, 2004). Kommt es zur Denaturierung des Proteins oder ist die sterische Anordnung auf der Elektrode ungünstig, ist kein Elektronentransport zwischen Elektrode und aktivem Zentrum des Enzyms möglich und es läuft keine Bioelektrokatalyse ab.

Verschiedene Methoden zur Modifikation der Elektrodenoberfläche wurden entwickelt, um Einfluss auf die Orientierung des Proteins zu nehmen. Beispielsweise können *self-assembled monolayer* (SAM) an Goldelektroden durch Chemisorption zwischen der Thiolkomponente eines Alkanthiols und der Goldoberfläche aufgebaut werden (Scheller *et al.*, 2002). Diese werden auch als Membran-mimetische Systeme bezeichnet, da sie den Aufbau physiologischer Membranen und somit die natürliche Umgebung membrangebundener Enzyme in physiologischen Systemen imitieren (Ferapontova und Gorton, 2005). Durch Verwendung von Alkanthiolen, welche neben der Thiolstruktur zusätzlich positiv oder negativ geladene funktionelle Gruppen aufweisen, kann die Wechselwirkung negativ bzw. positiv geladener Proteine mit der Elektrodenoberfläche verstärkt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Modifikation der Elektrodenoberfläche stellen Carbonbasierte Nanomaterialien wie Nanotubes oder Nanopartikel dar. Diese können adsorbiert an der Elektrodenoberfläche oder eingebettet in einem Mehrkomponentenfilm vorliegen. Durch Kombination der rigiden Strukturen der Nanopartikel und flexiblen Strukturen der Proteine kann die Distanz des Elektronentransfers verringert und die elektroaktive Oberfläche vergrößert werden (Opallo und Bilewicz, 2011).

Heutzutage werden sowohl Methoden der direkten als auch Mediator-vermittelten Proteinelektrochemie genutzt, da beide Verfahren Vor- und Nachteile aufweisen (Bernhardt, 2011).

Bei der direkten Proteinelektrochemie wird das Protein als dünner Film an der Elektrodenoberfläche immobilisiert, während Substrat und Produkt einer enzymatischen Reaktion in Lösung vorliegen und diffundieren können. Erfolgt ein Elektronentransfer zwischen Elektrode, immobilisiertem Enzym und Substrat, so tritt ein katalytischer Stromfluss auf und die kinetischen Parameter der Reaktion können kalkuliert werden (Heering *et al.*, 1998).

Die Mediator-vermittelte Proteinelektrochemie kann in verschiedene Kategorien untergliedert werden. Enzym und Mediator können in Lösung vorliegen, das Enzym kann immobilisiert sein, während der Mediator sich in Lösung befindet oder sowohl Enzym als auch Mediator liegen immobilisiert an der Arbeitselektrode vor (Bernhardt, 2006).

Als Mediatoren werden häufig verschiedene Benzo-, Naphto- oder Anthrachinone eingesetzt (Meckstroth *et al.*, 1981).

Die Mediator-vermittelte Proteinelektrochemie bietet sich insbesondere dann an, wenn ein Protein keine ausreichende Stabilität zur Immobilisierung auf der Arbeitselektrode aufweist oder keine optimale Orientierung, welche den Elektronentransfer zwischen Elektrode und Enzym ermöglicht, erzielt werden kann. Die experimentelle Durchführung ist insgesamt leichter zu bewerkstelligen, allerdings ist eine größere Menge an Protein erforderlich und die theoretische Auswertung der Kinetik ist aufgrund des Mediators als Zwischeninstanz komplex (Bernhardt, 2011).

3.1.2 Proteinelektrochemie an Molybdoenzymen sowie Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase

An Molybdoenzymen wurden sowohl mittels direkter als auch Mediator-vermittelter Proteinelektrochemie zahlreiche Studien durchgeführt (Bernhardt, 2011). Eine Übersicht der Redoxpotentiale der Xanthinoxidoreduktase, Aldehydoxidase, aber auch Sulfitoxidase und Nitratreduktase unterschiedlicher Spezies wurde von Hille (1996) erstellt. Folgende Tabelle bietet einen Überblick über die den Molybdäncofaktor betreffenden Potentiale (in mV):

Enzym	Mo ^{VI} /Mo ^V	Mo ^V /Mo ^{IV}
Xanthinoxidoreduktase (Buttermilch)	-345	-315
Xanthinoxidoreduktase (Hühnerleber)	-357	-337
Aldehydoxidase (Kaninchenleber)	-359	-351
Sulfitoxidase (Hühnerleber)	38	-239
Nitratreduktase (<i>Spinacia oleracea</i>)	2	-6
Nitratreduktase (<i>Chlorella vulgaris</i>)	15	-25

Bei der Nitratreduktase handelt es sich um ein Molybdoenzym aus der Klasse der Sulfitoxidase-Familie, welches hinsichtlich Struktur, Funktion und Regulation bereits ausführlich charakterisiert wurde (Campbell, 1999). Im Rahmen der Katalyse erfolgt ein Elektronentransfer, welcher mit der Reduktion bzw. Oxidation der innerhalb der Proteinstruktur enthaltenen Cofaktoren FAD, Häm und Moco einhergeht.

Die Redoxpotentiale dieser prosthetischen Gruppen wurden zunächst anhand der assimilatorischen Nitratreduktase aus *Chlorella vulgaris* bzw. *Spinacia oleracea* mittels potentiometrischer Titration bestimmt, wobei eine Kombination aus Circular dichroismus, Vis- und EPR-Spektroskopie sowie diverse Mediatoren verwendet wurden (Kay *et al.*, 1988, 1989). Für beide Enzyme wurden ähnliche Potentiale ermittelt, woraus geschlossen wurde, dass in beiden Systemen die Umgebung der Cofaktoren vergleichbar ist.

Von Campbell (1999) wurden die Ergebnisse mehrerer Studien (Barber *et al.*, 1997; Campbell, 1996; Hille, 1996; Ratnam *et al.*, 1995, 1997; Solomonson und Barber, 1990; Trimboli *et al.*, 1996) zur Bestimmung der Redoxpotentiale der Cofaktoren mit

unterschiedlichen Methoden sowohl am Holoenzym als auch in proteolytischen bzw. rekombinanten Fragmenten der Nitratreduktase folgendermaßen zusammengefasst:

- -270 bis -290 mV (FAD)
- -120 bis -175 mV (Häm)
- -25 bis +15 mV (Moco)

Elektronendonator für dieses System ist NADH mit einem Redoxpotential von -320 mV und finaler Elektronenakzeptor Nitrat mit einem Potential von +420 mV. Die ermittelten Potentiale stehen somit in Einklang mit dem beschriebenen Elektronentransfer von NADH zu FAD, zu Häm, zu Moco und schließlich zum Nitrat.

Versuche zur Bestimmung des Redoxpotentials von Cytochrom b_5 wurden sowohl mittels spektroelektrochemischer Titration als auch direkter Proteinelektrochemie durchgeführt (Rivera *et al.*, 1998). Hierbei wurde beobachtet, dass die direkte Proteinelektrochemie an Oberflächen-modifizierten Elektroden Potentiale liefert, welche um etwa 40-100 mV positiver sind als solche, welche mittels potentiometrischer Methoden bestimmt wurden.

Beispielsweise wurde von Rivera *et al.* (1998) mittels spektroelektrochemischer Titration an rekombinantem Cytochrom b_5 der äußeren mitochondrialen Membran der Rattenleber ein Redoxpotential von -102 mV ermittelt. Das Potential des entsprechenden Hämdimethylesters betrug -36 mV. Bei Zugabe von Polylysin blieb das Potential des Dimethylesters nahezu unverändert, während für das Potential des Cytochrom b_5 ein positiver Shift detektiert wurde. Zur Erklärung der Differenz von 66 mV zwischen den Redoxpotentialen des Cytochrom b_5 und des Dimethylesters wurde angeführt, dass nur im Falle des Cytochrom b_5 eine Wechselwirkung zwischen positiv geladenem Fe-Zentralatom und negativen Carbonsäurestrukturen im Häm besteht, welche eine Stabilisierung und somit ein negativeres Redoxpotential bewirkt. Des Weiteren könnte eine Wechselwirkung zwischen negativer Carboxylfunktion und positivem Polylysin, welche nur im Falle des Cytochrom b_5 nicht aber beim Dimethylester möglich ist, die Unterschiede des Redoxpotentials von Cytochrom b_5 in An- bzw. Abwesenheit von Polylysin begründen.

Bei der Bestimmung des Redoxpotentials mittels Cyclischer Voltammetrie an Gold-elektroden, welche mit β -Mercaptopropionat und Polylysin modifiziert waren, wurde eine Abhängigkeit des Redoxpotentials von Cytochrom b_5 von der Konzentration und dem Molekulargewicht des Polylysins detektiert.

Ähnliche Studien wurden von Aono *et al.* (2010) an rekombinant hergestelltem, humanen mikrosomalen Cytochrom b_5 sowie diversen Mutanten durchgeführt. Hierbei wurde eine Abhängigkeit des Potentials von Konformationsänderungen in der Tertiärstruktur, kleineren Änderungen der Struktur oder Hydrophobizität in der Nähe des Häms, beispielsweise durch Interaktion mit Polylysin, beschrieben.

Dies erklärt nicht nur, dass sich die Redoxpotentiale verschiedener Cytochrom b_5 Proteine um bis zu 400 mV unterscheiden, sondern auch, dass je nach Methode teils unterschiedliche Potentiale für ein und dasselbe Protein erhalten werden können.

Von Iyanagi *et al.* (1974) wurde für NADH-Cytochrom b_5 Reduktase der porcinen Leber mittels potentiometrischer Titration ein Redoxpotential von -280 mV bei pH 7,5 bestimmt. Untersuchungen mittels direkter Proteinelektrochemie sind für dieses Enzym in der Literatur bisher nicht beschrieben. Beispiele für FAD-haltige Enzyme, die mittels direkter Proteinelektrochemie charakterisiert wurden, sind rekombinant hergestellte Flavin-Domänen der Nitratreduktase aus *Chlorella vulgaris* bzw. *Spinacia oleracea*. Mittels Cyclischer Voltammetrie und Square-Wave Voltammetrie wurden je nach Protein Potentiale im Bereich von -274 mV bis -175 mV detektiert (Trimboli *et al.*, 1996; Barber *et al.*, 1997). Das Potential des FAD zeigt somit, ähnlich wie zuvor anhand des Cytochrom b_5 beschrieben, eine Abhängigkeit von der Umgebung im jeweiligen Protein.

3.1.3 Zielsetzung

Von Havemeyer *et al.* (2011) wurde ein hypothetischer Mechanismus der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen durch das mARC-Enzymsystem in Anlehnung an die Nitratreduktase formuliert. Die Nitratreduktase besitzt innerhalb des Proteins eine FAD-, Häm- und Moco-haltige Domäne, während das mARC-Enzymsystem aus drei Komponenten, der FAD-haltigen Cytochrom b_5 Reduktase, dem Häm-haltigen Cytochrom b_5 und dem Moco-haltigen mARC, besteht. In beiden Fällen wird postuliert, dass NADH zwei Elektronen liefert, welche über FAD, Häm und Moco im Sinne einer Elektronentransportkette letztlich auf das Substrat übertragen werden (Campbell, 1999; Havemeyer *et al.*, 2011).

In Kapitel 2 wurden bereits anhand verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime die Redoxpotentiale einiger mARC-Substrate bestimmt. Das Redoxverhalten von Cytochrom b_5 - bzw. Cytochrom b_5 Reduktase-Proteinen wurde bereits beschrieben (Rivera *et al.*, 1998; Aono *et al.*, 2010; Iyanagi, 1977; Iyanagi und Anan, 1984).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun exemplarisch an mARC1 erste Studien mittels direkter Proteinelektrochemie zur Bestimmung des Redoxpotentials durchgeführt werden. Anschließend sollte ermittelt werden, ob die Potentiale der drei Komponenten des mARC-Enzymsystems sowie der mARC-Substrate in Einklang mit dem postulierten Mechanismus der *N*-Reduktion stehen.

3.2 Methoden

3.2.1 Materialien und Geräte

Die Experimente zur Bestimmung des Redoxpotentials von mARC1 wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis Ferapontova (iNANO, Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Außer der untersuchten mARC1-Charge wurden mir freundlicherweise sämtliche benötigte und im Folgenden aufgeführten Materialien und Geräte zur Benutzung zur Verfügung gestellt. *Multiwall carbon nanotubes* (MWCNT) wurden von Nanocyl (Belgien) bezogen.

3.2.2 Proteinquelle

Die Gewinnung und Charakterisierung der eingesetzten mARC1-Charge wurde bereits in Kapitel 2 beschrieben.

3.2.3 Modifikation der Elektroden

Zur Immobilisierung von mARC1 auf Graphitelektroden wurden diese zunächst zugeschnitten (SGL Carbon AG, Werk Ringsdorf, Bonn, Typ RW001, 3,05 mm Durchmesser) und ihre Oberfläche mit Schmirgelpapier (Tufbak Durite, P600) poliert. Nach Spülen mit entionisiertem Wasser wurden die Graphitstäbe in Teflonhalter eingesetzt. 3 μl einer mARC1-Lösung (4 mg Protein/ml) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,0; 6,0; 7,4 bzw. 8,0, je nach Experiment) wurden auf die Elektrode aufgetragen. Anschließend wurden diese mit einer Plastikkappe abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment wurden die Elektroden vorsichtig mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,0; 6,0; 7,4 bzw. 8,0, je nach Experiment) gespült und in die elektrochemische Zelle eingesetzt. Zur Durchführung aller Versuche wurden jeweils drei Elektroden unter identischen Bedingungen vorbereitet.

Zur Modifikation der Elektrode mit MWCNT wurden zwei 1,5 μl Tropfen einer Suspension von MWCNT in DMF (1 bzw. 2 mg/ml) auf die frisch polierte Elektrodenoberfläche gegeben. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde die Proteinlösung wie bereits beschrieben aufgetragen.

3.2.4 Elektrochemische Messungen

Für alle Messungen per Cyclischer Voltammetrie oder Differentieller Puls-Voltammetrie wurde eine elektrochemische Zelle mit Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Neben der mARC1 beschichteten Graphitelektrode wurde eine Ag/AgCl Referenzelektrode (3 M KCl, +210 mV *vs.* NHE) sowie ein Platindraht als Gegenelektrode genutzt. Die elektrochemische Zelle war mit einem $\mu\text{AUTOLAB}$ Typ III Potentiostaten (Eco Chemie B.V., Niederlande), ausgestattet mit GPES 4.9 Software, verbunden.

Alle Experimente erfolgten bei Raumtemperatur unter Argon. Versuche zur Cyclischen Voltammetrie wurden jeweils bei Scangeschwindigkeiten von 5, 10, 50, 100, 200, 300 und 400 mV s^{-1} durchgeführt. Im Anschluss an die Messungen der mARC1 beschichteten Elektroden wurde 1,2 mM Benzamidoxim zugegeben und das Experiment wiederholt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Cyclische Voltammetrie

Das Redoxverhalten von rekombinant hergestelltem mARC1 sollte zunächst mittels Cyclischer Voltammetrie charakterisiert werden. Entsprechend des von Havemeyer

et al. (2011) postulierten hypothetischen Mechanismuses der *N*-Reduktion im mARC-Enzymsystem wurde davon ausgegangen, dass das Zentralatom im Molybdäncofaktor des rekombinanten mARC1 in der Oxidationsstufe +VI vorliegt.

Im enzymatischen System liefert NADH zwei Elektronen, welche von der Cytochrom b_5 Reduktase auf Cytochrom b_5 und anschließend auf den Molybdäncofaktor übertragen werden. Die Oxidationsstufe des Molybdäns wird somit von +VI auf +IV erniedrigt. Im elektrochemischen Experiment mit mARC1 beschichteten Graphitelektroden wurde daher das angelegte Potential zunächst erniedrigt, um eine Reduktion zu erzielen und anschließend erhöht, um das Molybdän wieder zu oxidieren.

Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen exemplarisch das Verhalten von mARC1, immobilisiert auf Graphitelektroden, bei pH 5,0 und Scangeschwindigkeiten von 100 bzw. 400 mV s^{-1} . Während der Oxidationspeak im Cyclischen Voltammogramm deutlich zu erkennen ist, war der kathodische Peak in allen Experimenten schwächer ausgeprägt und teils nicht detektierbar. Mithilfe der Basislinien korrigierten Darstellung der Voltammogramme ((B) in Abbildung 3.1 und 3.2) wurde die Oberflächenbedeckung an elektrochemisch aktivem Protein (τ) entsprechend des Faraday'schen Gesetzes bestimmt (Rücker *et al.*, 2008). Mit etwa 1 pmol mARC1 lag jeweils nur ein sehr geringer Teil des aufgetragenen Proteins elektrochemisch aktiv und an der Elektrodenoberfläche immobilisiert vor, was die schwachen Signale im elektrochemischen Experiment erklärt.

Durch Vorbehandlung der Elektrode mit *multiwall carbon nanotubes* (MWCNT) wurde versucht, die Wechselwirkung zwischen Elektrode und Protein zu erhöhen und so das Signal zu verstärken. Hierbei wurden keine Unterschiede zwischen MWCNT-behandelter Elektrode und der reinen Graphitelektrode detektiert (Daten nicht gezeigt).

Jeweils nach Analyse der mARC1 beschichteten Graphitelektroden wurde das Modellsubstrat Benzamidoxim zugegeben und die Messung wiederholt. In Kaliumphosphatpuffer mit pH-Werten zwischen 5 und 8 und bei Scangeschwindigkeiten zwischen 5 und 400 mV s^{-1} wurde kein katalytischer Stromfluss im Sinne einer Bioelektrokatalyse detektiert (Daten nicht gezeigt).

$$n = \frac{62,5 \text{ mV}}{\text{width}_{0,5\text{anodic}}} + \frac{62,5 \text{ mV}}{\text{width}_{0,5\text{cathodic}}} \quad (3.1)$$

Mithilfe der Laviron-Gleichung, welche letztlich einen Zusammenhang zwischen den Peakbreiten in halber Höhe des anodischen und kathodischen Scans ($\text{width}_{0,5\text{anodic}}$) bzw. ($\text{width}_{0,5\text{cathodic}}$) und der Anzahl der beteiligten Elektronen (n) beschreibt (s. Gleichung (3.1)), wurde ermittelt, dass es sich bei den in Abbildung 3.1 und 3.2 gezeigten Prozessen um die Übertragung zweier Elektronen handelt (s. Tabelle 3.1) (Laviron, 1979). Dies steht in Einklang mit der Vermutung, dass die Oxidationsstufe des Molybdäns im elektrochemischen Experiment ebenso wie im enzymatischen System zwischen +VI und +IV variiert.

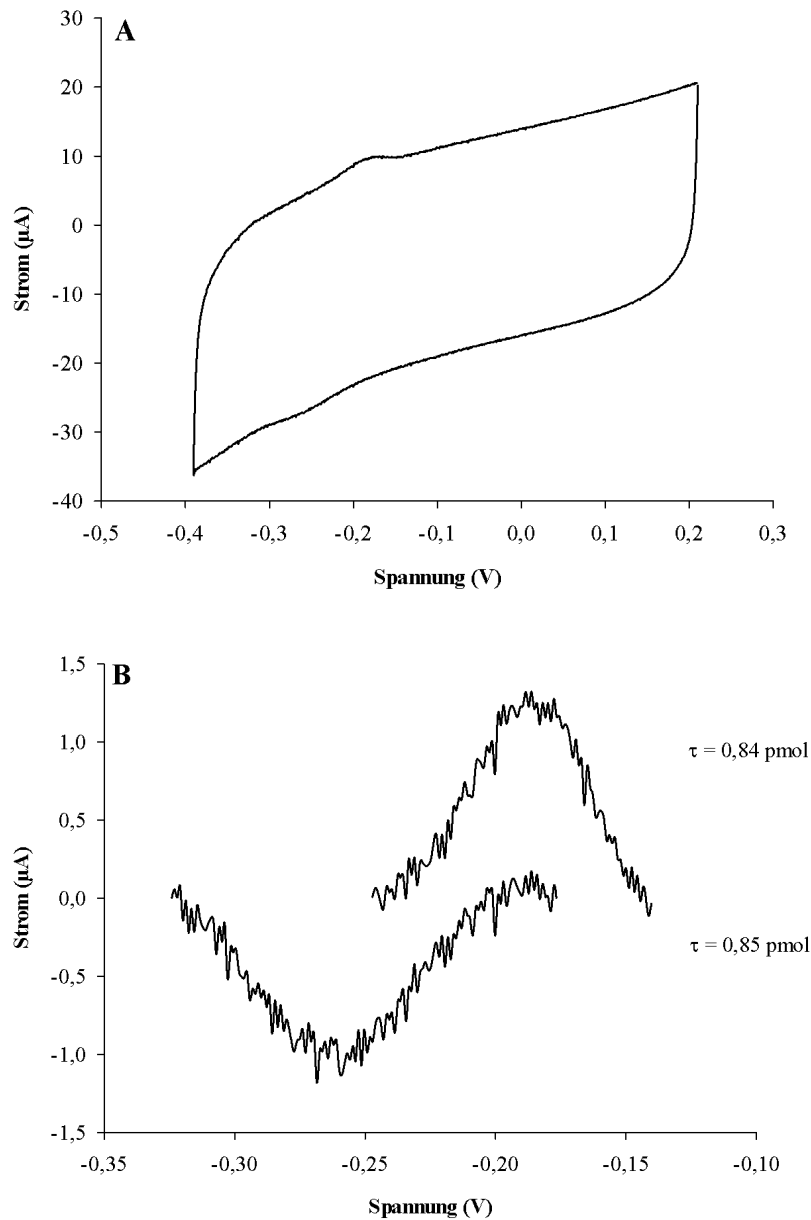


Abbildung 3.1: Cyclisches Voltammogramm einer mARC1 beschichteten Graphitelektrode in Kaliumphosphatpuffer pH 5,0 bei einer Scangeschwindigkeit von 400 mV s^{-1} (A)

Die Modifikation der Elektrode sowie die Messbedingungen sind unter 3.2.3 bzw. 3.2.4 beschrieben. (B) Basislinsen subtrahierte Darstellung von (A). τ = elektrochemisch aktives Protein

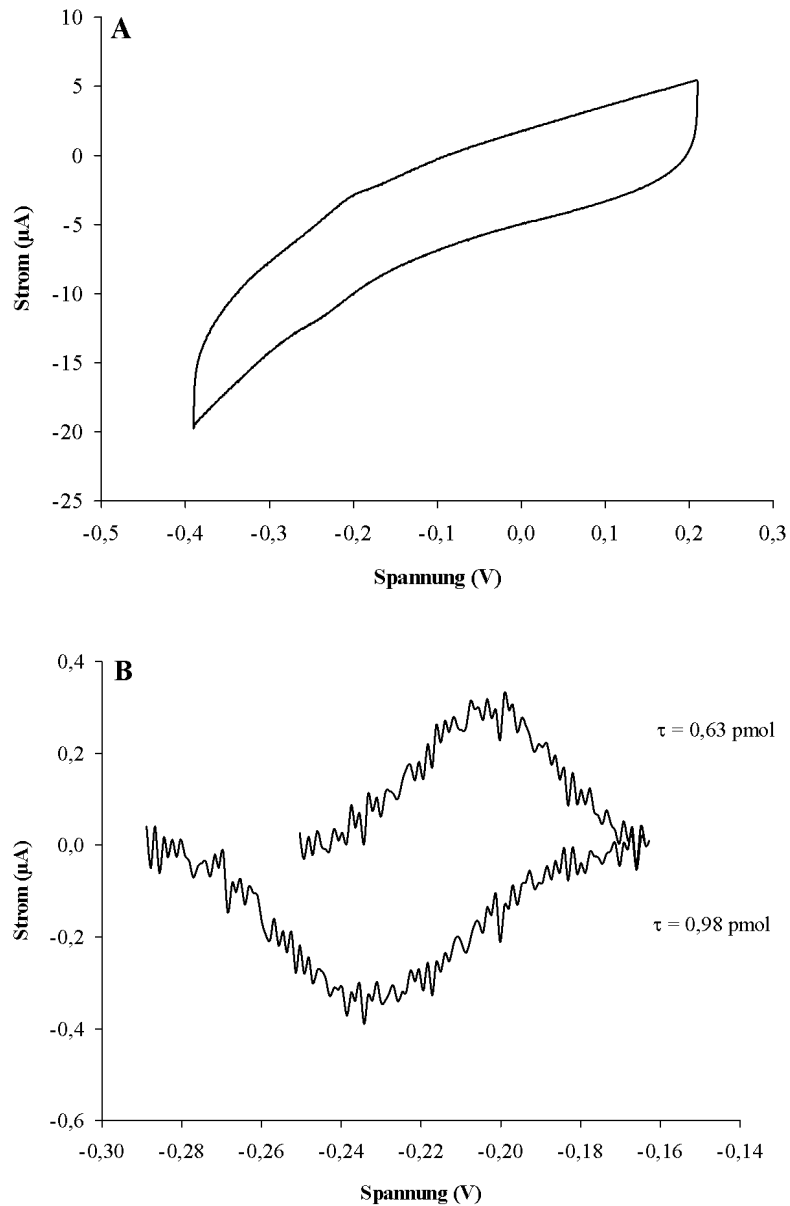


Abbildung 3.2: Cyclisches Voltammogramm einer mARC1 beschichteten Graphitelektrode in Kaliumphosphatpuffer pH 5,0 bei einer Scangeschwindigkeit von 100 mV s^{-1} (A)

Die Modifikation der Elektrode sowie die Messbedingungen sind unter 3.2.3 bzw. 3.2.4 beschrieben. (B) Basislinien subtrahierte Darstellung von (A). τ = elektrochemisch aktives Protein

pH	n
5,0	2,00 ± 0,14
6,0	2,07 ± 0,12
7,4	2,06 ± 0,18
8,0	kathodischer Peak ND

Tabelle 3.1: Ermittlung der Anzahl der beteiligten Elektronen (n) anhand der Laviron-Gleichung

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. ND: nicht detektierbar

pH	$E_{1/2}$ (mV)
5,0	-216 ± 1 ^[a]
6,0	-257 ± 3
7,4	-335 ± 2
8,0	-380 ± 1 ^[a]

Tabelle 3.2: Redoxpotential von mARC1 in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Versuchsdurchführung ist unter 3.2.4 beschrieben. $E_{1/2} = (E_{\text{red}} + E_{\text{ox}})/2$. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus je drei Experimenten. [a] Mittelwert ± Standardabweichung aus nur zwei Experimenten, da E_{red} in einem Fall nicht detektierbar war.

3.3.2 Differentielle Puls-Voltammetrie

Das Redoxpotential von mARC1 in Abhängigkeit des pH-Werts wurde mittels Differentieller Puls-Voltammetrie bestimmt (s. Tabelle 3.2). Abbildung 3.3 zeigt, dass sowohl die Oxidation beim anodischen Scan als auch die Reduktion beim kathodischen Scan im Sauren leichter bzw. bei positiverem Potential als im Alkalischen erfolgt. Der Prozess der Aufnahme und Abgabe von Elektronen durch das Molybdän im aktiven Zentrum von mARC scheint somit Protonen-gekoppelt abzulaufen. Ausgehend von der allgemeinen Form der Nernst-Gleichung kann folgender Zusammenhang abgeleitet werden (Rücker *et al.*, 2008):

$$\frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta \text{pH}} = -\frac{0,059}{n} \times p \quad (3.2)$$

Um die Anzahl der beteiligten Protonen zu ermitteln, wurden die Peakpotentiale des anodischen (E_{ox}) bzw. kathodischen Scans (E_{red}) der Differentiellen Puls-Voltammetrie gegen den pH-Wert aufgetragen (s. Abbildung 3.4). Es wurden zwei Geraden mit linearem Verlauf und Steigungen von -56 mV (kathodischer Scan) bzw. -54 mV (anodischer Scan) erhalten. Entsprechend der Nernst-Gleichung ist bei einer

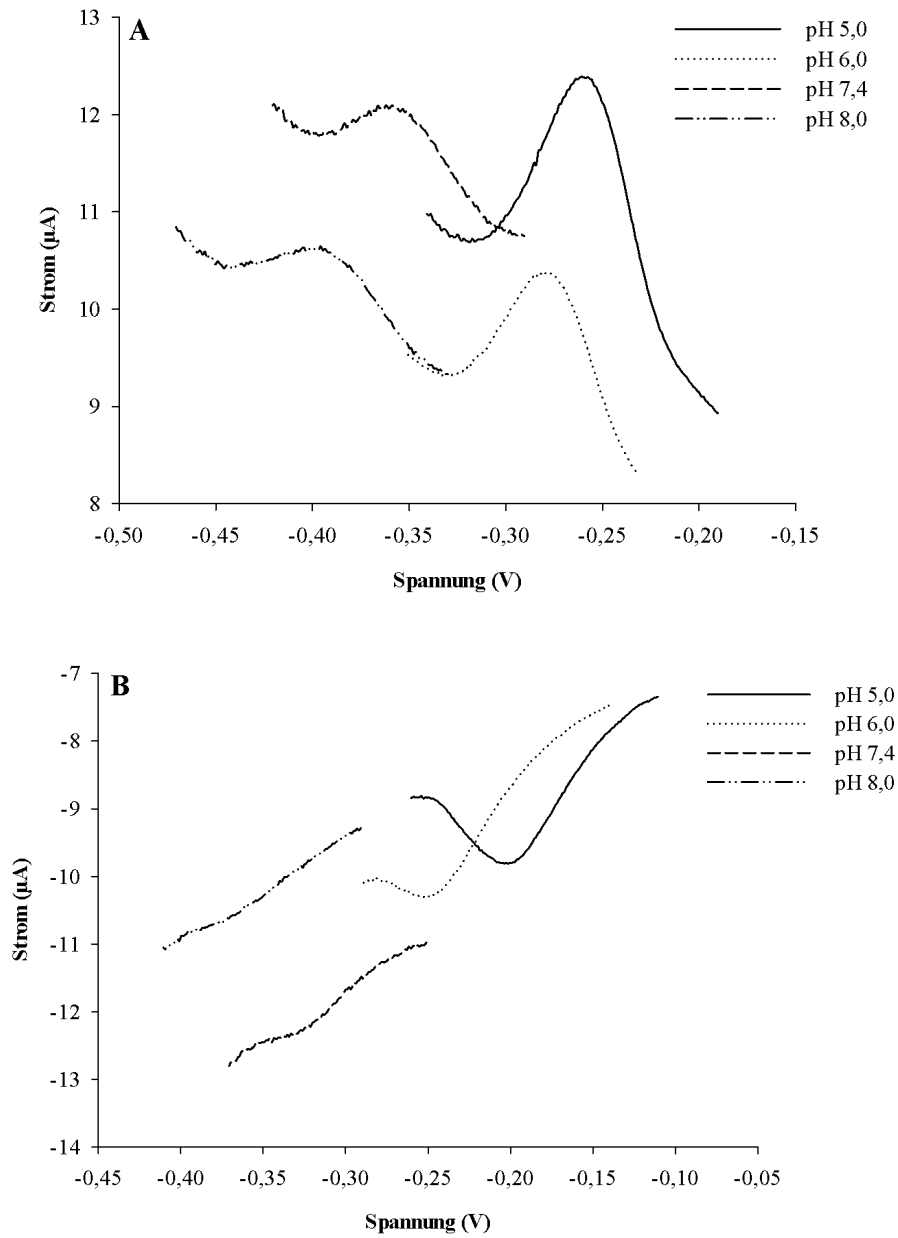


Abbildung 3.3: pH-Abhängigkeit der Oxidation (A) bzw. Reduktion (B) von mARC1, immobilisiert auf Graphitelektroden, im Differentiellen Puls-Voltammogramm

Die Modifikation der Elektrode sowie die Messbedingungen sind unter 3.2.3 bzw. 3.2.4 beschrieben.

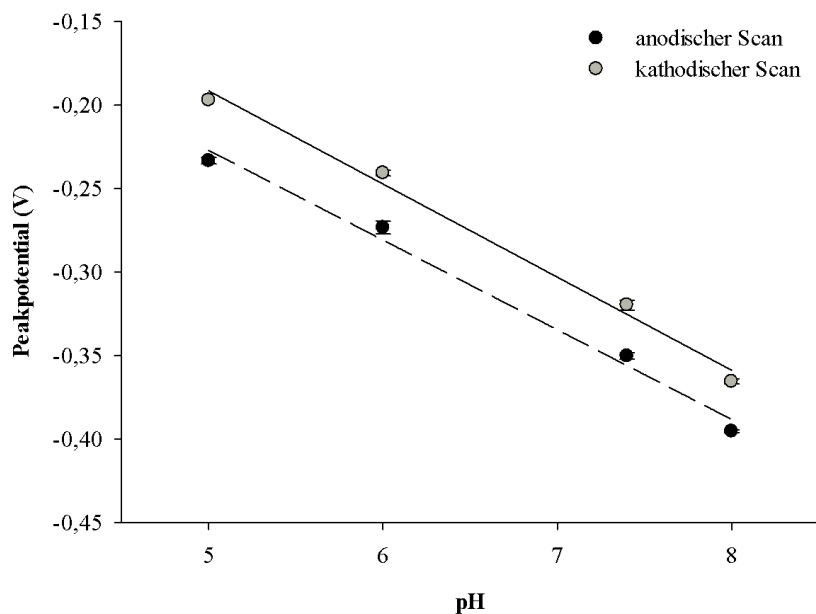


Abbildung 3.4: Einfluss des pH-Werts auf die Oxidation bzw. Reduktion von mARC1, immobilisiert auf Graphitelektroden

Zur Korrelationsanalyse wurden die mittels Differenzieller Puls-Voltammetrie ermittelten Peakpotentiale verwendet (s. 3.2.4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Anodischer Scan: $E_{\text{ox}} = -0,054 \text{ pH} + 0,041$, $R^2 = 0,989$;

Kathodischer Scan: $E_{\text{red}} = -0,056 \text{ pH} + 0,087$, $R^2 = 0,991$

Steigung von -59 mV die Anzahl der beteiligten Elektronen (n) gleich der der beteiligten Protonen (p) (s. Gleichung (3.2)). Die detektierten Steigungswerte liegen nahe dem Idealwert von -59 mV. Mithilfe der Laviron-Gleichung wurde unter 3.3.1 ermittelt, dass zwei Elektronen übertragen werden. Somit ergibt sich, dass insgesamt zwei Elektronen und zwei Protonen am Prozess beteiligt sind und es sich vermutlich um den Übergang zwischen Mo^{VI} und Mo^{IV} im aktiven Zentrum von mARC1 handelt.

3.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Versuche zur direkten Proteinelektrochemie an humanem mARC1 mittels Cyclischer Voltammetrie und Differentieller Puls-Voltammetrie durchgeführt. Es konnte ein Redoxpotential von -335 mV vs. NHE bei pH 7,4 detektiert und dessen pH-Abhängigkeit ebenso wie die Beteiligung zweier Elektronen und Protonen gezeigt werden.

Das ermittelte Potential liegt etwa im Bereich der Redoxpotentiale, welche von Hille (1996) für verschiedene Molybdoenzyme der Xanthinoxidase-Familie angeführt wurden. Für mARC wurde eine Zugehörigkeit zur Sulfitoxidase-Familie beschrieben (Havemeyer *et al.*, 2011). Vertreter dieser Klasse zeigen insgesamt positivere Redoxpotentiale als die zuvor genannten Mitglieder der Xanthinoxidase-Familie (Hille, 1996). Allerdings wurde für die Sulfitoxidase aus Hühnerleber für das Redoxpaar $\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$ ein Potential von -239 mV bei pH 7,0 angegeben, welches dem für mARC1 bestimmten Potential, sowie denen der Mitglieder der Xanthinoxidase-Familie näher kommt (Spence *et al.*, 1991).

In der Übersicht von Hille (1996) sind jeweils die Potentiale für die Redoxpaare $\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}$ und $\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$ angegeben. Für mARC1 wurde sowohl mittels Cyclischer Voltammetrie als auch Differentieller Puls-Voltammetrie nur ein Signal der Oxidation bzw. Reduktion detektiert. Mithilfe der Laviron- sowie der Nernst-Gleichung konnte die Beteiligung zweier Elektronen und Protonen ermittelt werden. Hierbei könnte es sich um den Übergang zwischen $\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$ handeln. Möglicherweise liegen die Potentiale eng beieinander, wie auch im Falle anderer Molybdoenzyme, und es wurde daher nur ein Signal für die Übertragung beider Elektronen erhalten.

Vergleicht man das für mARC1 ermittelte Redoxpotential mit den Potentialen der Partner im enzymatischen *N*-reduktiven System, also NADH, Cytochrom b_5 Reduktase, Cytochrom b_5 und einer *N*-hydroxylierten Verbindung als mARC-Substrat, so liegt es deutlich negativer als aufgrund des von Havemeyer *et al.* (2011) postulierten Mechanismus erwartet. Dieser wurde in Anlehnung an die Nitratreduktase aufgestellt und geht davon aus, dass NADH zwei Elektronen liefert, welche über das FAD der Cytochrom b_5 Reduktase, das Häm des Cytochrom b_5 und den Moco von mARC schließlich auf eine *N*-hydroxylierte Verbindung übertragen werden. Im Falle der Nitratreduktase steigen die Redoxpotentiale in der Reihenfolge des Elektronentransports, also NADH, FAD, Häm, Moco und Nitrat an. Das für mARC1 bei physiologischem pH-Wert bestimmte Potential beträgt -335 mV , während für den Elektronendonator NADH ein Standardredoxpotential von -320 mV angegeben wird (Christen und Jaussi, 2005). Diese Werte liegen so eng beieinander, dass ein Elektronentransport in Richtung des positiveren Redoxpotentials nicht gegeben wäre, wofür auch die Potentiale des Häms bzw. FADs innerhalb von Cytochrom b_5 bzw. Cytochrom b_5 Reduktase sprechen.

In Kapitel 2 dieser Arbeit wurden die Redoxpotentiale einiger mARC-Substrate bestimmt, welche bei pH 6,0 zwischen $-0,81 \text{ V}$ und $-1,49 \text{ V}$ lagen und somit deutlich negativer sind als das Potential des Elektronendonors NADH. Als mögliche Erklärung wurde bereits angeführt, dass die postulierte koordinative Bindung zwischen Molyb-

dän des Moco und Sauerstoff des Substrats, welche im enzymatischen System, nicht aber bei der elektrochemischen Analyse besteht, die *N*-Reduktion begünstigen könnte. Somit wäre die Verwendbarkeit der elektrochemisch bestimmten Redoxpotentiale der Substrate für die Überprüfung des postulierten Mechanismus der enzymatischen, mARC-katalysierten Reduktion stark eingeschränkt.

Die Beteiligung zweier Elektronen am Redoxprozess, welcher für mARC1 mittels direkter Proteinelektrochemie an Graphitelektroden untersucht wurde, sowie Redoxpotentiale anderer Molybdoenzyme, welche in einem ähnlichen Potentialbereich liegen, sprechen dafür, dass es sich bei dem detektierten Potential von -335 mV bei pH 7,4 um das Redoxpotential von mARC1 handelt. Allerdings waren die Signale relativ schwach und bei Zugabe des mARC-Modellsubstrates Benzamidoxim wurde kein katalytischer Stromfluss im Sinne einer Bioelektrokatalyse detektiert. Des Weiteren liegt das bestimmte Potential zu weit im negativen Spannungsbereich, als dass es sich mit einem Elektronentransport von NADH über FAD, Häm und schließlich auf den Moco in Einklang bringen ließe. Hierbei muß jedoch auch berücksichtigt werden, dass der Prozess der Immobilisierung einen Einfluss auf das gemessene Potential haben kann. Um letztlich den Beweis zu erbringen, dass es sich tatsächlich um das Redoxpotential von mARC1 bzw. den Übergang von Mo^{VI} und Mo^{IV} innerhalb des Moco handelt, sind somit weitere Studien nötig.

Anhand von rekombinanten mARC1-Proteinen mit unterschiedlicher Molybdän-Sättigung sowie dem Apoprotein könnte untersucht werden, ob ein steigender Molybdän-Gehalt zu einem stärkeren Signal im Rahmen der Cyclischen Voltammetrie bzw. Differentiellen Puls-Voltammetrie führt. Dies würde dafür sprechen, dass das Signal durch das Redoxpaar Mo^{VI}/Mo^{IV} und nicht durch andere redoxaktive Strukturen innerhalb des Proteins hervorgerufen wird.

Andere Elektrodenmaterialien als Graphit sowie Oberflächen-modifizierte Elektroden könnten eingesetzt werden, um die Wechselwirkung zwischen Protein und Elektrode zu stärken und somit die Oberflächenbedeckung an elektrochemisch aktivem Protein zu erhöhen. Außerdem könnte auf diese Weise Einfluss auf die Orientierung von mARC an der Elektrodenoberfläche genommen werden. An Graphit erfolgt die Adsorption des Proteins entsprechend einer Zufallsorientierung. Möglicherweise war aufgrund der sterischen Anordnung von mARC zwar ein Elektronentransfer zwischen Elektrode und Protein, nicht jedoch zwischen Protein und Substrat möglich, so dass in Folge bei Zugabe von Benzamidoxim kein katalytischer Stromfluss detektiert wurde.

Ebenso könnten neben der direkten Proteinelektrochemie weitere Methoden wie die Mediator-vermittelte Proteinelektrochemie oder aber spektroelektrochemische Titrations getestet werden und auch die Partnerproteine von mARC unter identischen Bedingungen elektrochemisch charakterisiert werden.

3.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals humanes mARC1 mittels direkter Proteinelektrochemie an Graphitelektroden untersucht. Per Cyclischer Voltammetrie und Differentieller Puls-Voltammetrie konnte ein pH-abhängiger Redoxprozess detektiert und über die Laviron- und Nernst-Gleichung die Beteiligung zweier Elektronen und Protonen kalkuliert werden. Es wurde ein Redoxpotential von -335 mV vs. NHE bei physiologischem pH-Wert ermittelt, bei Zugabe des mARC-Substrates Benzamidoxim wurde allerdings kein katalytischer Stromfluss detektiert.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten weiterführende Studien durchgeführt werden. Durch Variation der experimentellen Parameter sollte versucht werden, eine Bioelektrokatalyse zu ermöglichen und die kinetischen Parameter der Reaktion zu kalkulieren.

4 Biotransformationsstudien

N-hydroxylierter Sulfonamide

4.1 Einleitung

4.1.1 Bedeutung von HNO-Donoren im Rahmen der Pharmakotherapie

Das Molekül HNO besteht zwar nur aus drei Atomen, zeigt jedoch komplexe chemische und pharmakologische Eigenschaften. Erste Studien zur Acidität von HNO ergaben einen pKa-Wert von 4,7 (Grätzel *et al.*, 1970). Später wurde von Bartberger *et al.* (2002) und Shafirovich und Lyman (2002) beschrieben, dass es sich bei HNO um eine schwache Säure mit einem pKa-Wert von 11,4 handelt. Folglich wird davon ausgegangen, dass unter physiologischen pH-Bedingungen bevorzugt HNO vorliegt.

HNO dimerisiert unter Bildung von Hyposalpetriger Säure, welche zu Distickstoffmonoxid und Wasser zersetzt wird (s. Abbildung 4.1) (Smith und Hein, 1960). Daher ist HNO nicht lagerstabil und sowohl zur Untersuchung der chemischen und pharmakologischen Eigenschaften als auch im Rahmen der Pharmakotherapie müssen HNO-Donoren verwendet werden. Diese können in verschiedene Klassen eingeteilt werden, welche sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und Freisetzungseigenschaften unterscheiden, sowie jeweils spezifische Einschränkungen in der Anwendbarkeit aufweisen (s. Abbildung 4.2) (Irvine *et al.*, 2008).

Am längsten bekannt und daher bereits ausführlich untersucht ist Angeli's Salz ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$), welches bei physiologischem pH-Wert HNO sowie ein Äquivalent Nitrit liefert (s. Abbildung 4.2 (1)) (Paolucci *et al.*, 2007). Bei der Auswertung von Studien mit Angeli's Salz muss daher durch entsprechende Kontrollen stets geprüft werden, ob ein Effekt tatsächlich durch HNO oder aber Nitrit vermittelt wird.

Cyanamid wird in einer Katalase-vermittelten Reaktion zu *N*-Hydroxycyanamid umgesetzt, welches HNO, jedoch auch aus toxikologischer Sicht bedenkliches Cyanid freisetzt (s. Abbildung 4.2 (2)). Cyanamid wird zur Pharmakotherapie im Rahmen der

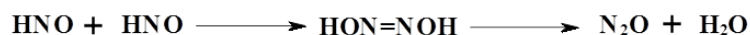


Abbildung 4.1: Dimerisierung von HNO zu Hyposalpetriger Säure mit nachfolgender Zersetzung zu Distickstoffmonoxid und Wasser nach Smith und Hein (1960)

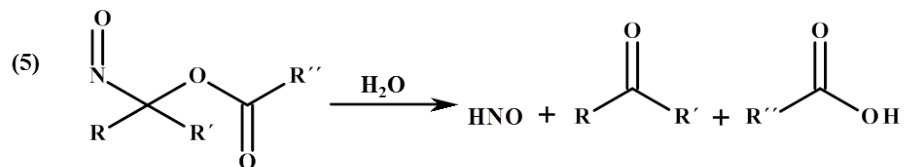
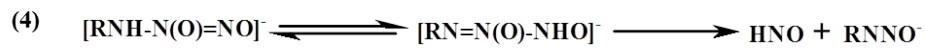
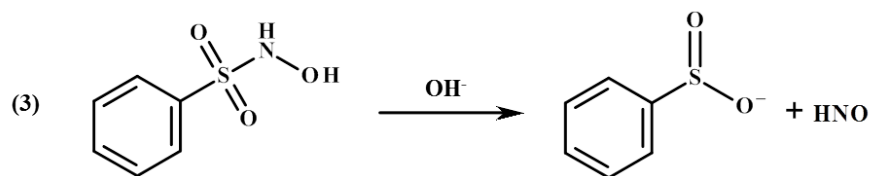
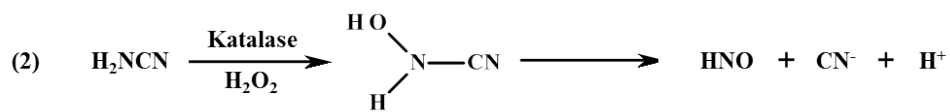
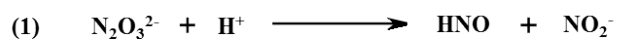


Abbildung 4.2: Übersicht der HNO-Donoren verschiedener Klassen und ihr Mechanismus der HNO-Freisetzung nach Paolucci *et al.* (2007)

(1) Angeli's Salz, (2) Cyanamid, (3) *Piloty's acid*, (4) Diazoniumdiolate (NONOate), (5) Acyloxynitrosoverbindungen

Alkoholabhängigkeit eingesetzt und ist in Europa, Kanada und Japan als Dipsan[®], Abstem[®], Temposil[®] bzw. Cyanamid Yoshitomi[®] im Handel (Paolucci *et al.*, 2007).

Piloty's acid sowie entsprechende Derivate setzen HNO bevorzugt bei alkalischem pH-Wert frei (s. Abbildung 4.2 (3)) (Bonner und Ko, 1992). Bei physiologischem pH-Wert liegen einige Verbindungen dieser Klasse oxidiert vor und es kommt zur Freisetzung von NO anstelle von HNO (Zamora *et al.*, 1995). Daher wird die Anwendbarkeit unter physiologischen Bedingungen teils kritisch betrachtet.

Diazoniumdiolate (NONOate), die ausgehend von primären Aminen hergestellt werden, liefern bei physiologischem pH-Wert HNO, bei pH-Werten unterhalb von 7 wird jedoch NO freigesetzt, was bei *in vitro* Studien berücksichtigt werden muß (s. Abbildung 4.2 (4)). Als Nebenprodukte der HNO-Freisetzung werden Nitrosamine gebildet, welche aufgrund der Toxizität die Anwendbarkeit von NONOaten *in vivo* limitieren (Paolucci *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2005).

Acyloxynitrosoverbindungen liefern durch spontane oder Esterase-katalysierte Hydrolyse HNO (s. Abbildung 4.2 (5)) (Paolucci *et al.*, 2007; Sha *et al.*, 2006).

Eine Vielzahl der durch HNO-vermittelten pharmakologischen Wirkungen ist in der hohen Affinität zu Thiolgruppen, welche u.a. Bestandteile von Enzymen, Rezeptoren oder Ionenkanälen sein können, begründet (Irvine *et al.*, 2008). Für Cyanamid ist eine Wechselwirkung mit Thiolstrukturen im aktiven Zentrum der Aldehyddehydrogenase beschrieben, welche letztlich auch den Einsatz im Rahmen der Alkoholabhängigkeit erklärt (Paolucci *et al.*, 2007). Durch Interaktion mit Thiolen innerhalb von NMDA-Rezeptoren, sowie dem kardialen (RyR1) bzw. skelettalen (RyR2) Ryanodin-Rezeptor kann HNO deren Aktivität modifizieren und beeinflusst somit die kardiale Kontraktilität, spielt aber auch im Nervensystem eine Rolle (Paolucci *et al.*, 2007; Tocchetti *et al.*, 2007).

HNO scheint dabei nicht mit allen zellulären Thiolen gleichermaßen zu interagieren. Diskutiert wird, dass HNO bevorzugt Wechselwirkungen mit Thiolaten gegenüber Thiolen eingeht (Irvine *et al.*, 2008). Des Weiteren scheinen membrangebundene Biomoleküle bevorzugt durch HNO beeinflusst zu werden, da hier die Konzentration an Scavengern wie Glutathion geringer ist (Wink *et al.*, 2003).

HNO wirkt als Vasodilatator und zeigt antithrombotische sowie antioxidative Eigenschaften. Außerdem beeinflusst es das Myokard und ruft hier positiv inotrope und lusitrope Effekte hervor (Irvine *et al.*, 2008). Diskutiert wird daher im Bereich der Pharmakotherapie der Einsatz neuartiger HNO-Donoren vor allem zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen. Des Weiteren scheint HNO protektive Eigenschaften auf das Myokard auszuüben und die Gefahr von Reperusionsverletzungen zu mindern. Somit könnten HNO-Donoren auch zur Vorbehandlung bei geplanten Prozessen, welche ischämische Ereignisse mit sich bringen, wie herzchirurgische Eingriffe oder eine Angioplastie, genutzt werden (Irvine *et al.*, 2008).

Die Kombination aus positiver Inotropie und Lusitropie sowie vasodilatierenden Eigenschaften macht HNO-Donoren vor allem für die Therapie der Herzinsuffizienz interessant (Paolucci *et al.*, 2007). Bisher werden vor allem β -Agonisten und Phosphodiesterase-3-Hemmstoffe zur Therapie der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt, um po-

sitiv inotrope und im Falle der Phosphodiesterase-3-Hemmstoffe auch vasodilatierende Effekte hervorzurufen. Die Anwendung ist jedoch auf einen kurzen Zeitraum begrenzt und muss unter strenger Kontrolle erfolgen, da insbesondere die Therapie mit Phosphodiesterase-3-Hemmstoffen mit starken Nebenwirkungen behaftet ist (Mutschler, 2012). Das organische Nitrat Glyceroltrinitrat wird aufgrund seiner vasodilatierenden Eigenschaften ebenfalls bei akuter Herzinsuffizienz eingesetzt (Mutschler, 2012). Durch Gabe von HNO-Donoren, welche sowohl positiv inotrop als auch vasodilatierend wirken, könnte somit die Therapie der Herzinsuffizienz optimiert und vereinfacht werden.

Bereits seit 1990 wurde die vasodilatierende Wirkung von Angeli´s Salz eingehend untersucht (Paolucci *et al.*, 2007). Die Mechanismen, über welche HNO vasodilatierend wirkt, sind bisher nicht endgültig geklärt. *In vivo* scheint HNO bevorzugt im venösen System als Vasodilatator zu agieren (Paolucci *et al.*, 2001). Folgende Mechanismen werden zur Erklärung der vasodilatierenden Eigenschaften von HNO diskutiert: *In vitro* konnte eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch HNO und somit Erhöhung der cGMP-Spiegel in Analogie zu NO-Donoren detektiert werden, während dies *in vivo* nicht bestätigt wurde. Diskutiert wird, dass es *in vitro* zu einer Umwandlung von HNO zu NO kommen könnte (Irvine *et al.*, 2008).

Beschrieben ist außerdem eine Relaxation der glatten Muskulatur bedingt durch Interaktion von HNO mit K_V und K_{ATP} -Kanälen. Ungeklärt ist bisher, ob diese Effekte auf einer Wechselwirkung von HNO mit Thiolstrukturen der Kanäle oder einer cGMP-vermittelten Reaktion beruhen (Irvine *et al.*, 2003, 2008).

Des Weiteren wird die Rolle des Neuropeptids CGRP diskutiert. Miranda *et al.* (2005) konnten zeigen, dass HNO zu einer Erhöhung der Plasmaspiegel von CGRP in Hunden führte. Vermittelt über eine Stimulation der endothelialen NO Freisetzung, Erhöhung von cAMP in der glatten Gefäßmuskulatur sowie Aktivierung von Kalium-Kanälen kam es folglich zur Vasodilatation (Brain und Grant, 2004). Allerdings sind *in vivo* Studien mit Angeli´s Salz beschrieben, in denen der Antagonist $CGRP_{8-37}$ die Vasodilatation nicht beeinträchtigte (Paolucci *et al.*, 2001). Die Rolle von CGRP bei der HNO-vermittelten Vasodilatation ist somit noch nicht abschließend geklärt.

Ähnlich wie für die Vasodilatation dargestellt, scheinen auch die Wirkungen von HNO auf das Myokard über cGMP-unabhängige Wege abzulaufen. In isolierten Kardiomyocyten wurde gezeigt, dass die Interaktion von HNO mit Thiolen des skelettalen (RyR1) sowie kardialen (RyR2) Ryanodin-Rezeptors die Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum begünstigt und so positiv inotrop wirkt (Tocchetti *et al.*, 2007). HNO scheint außerdem vermittelt über die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) die Aufnahme von Calcium aus dem Cytosol ins sarkoplasmatische Retikulum zu fördern und somit die Calciumsensitivität des Myofilaments zu erhöhen (Dai *et al.*, 2007).

Während NO liefernde Verbindungen bereits seit über 150 Jahren erfolgreich zur Therapie kardialer Erkrankungen eingesetzt werden, befindet sich die Entwicklung von HNO-Donoren noch im Anfangsstadium (Paolucci *et al.*, 2007). Obwohl HNO und NO sich nur um ein Wasserstoffatom unterscheiden, rufen sie im Organismus teils unter-

schiedliche Effekte hervor bzw. vermitteln diese über unterschiedliche Mechanismen, welche von Irvine *et al.* (2008) gegenübergestellt wurden.

Im Rahmen von *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass HNO ausgehend von N^ω -Hydroxy-L-arginin und katalysiert durch NO-Synthase gebildet wurde (Fukuto *et al.*, 2005). Eine direkte Reduktion von NO zu HNO wird unter physiologischen Bedingungen als unwahrscheinlich angesehen (Bartberger *et al.*, 2002). Allerdings ist eine entsprechende Reduktion enzymatisch katalysiert durch beispielsweise mitochondriales Cytochrom c, Xanthinoxidoreduktase oder Superoxiddismutase beschrieben (Fukuto *et al.*, 2005). Endogen wird NO ausgehend von L-Arginin und katalysiert durch NO-Synthase gebildet, während für HNO bisher *in vivo* nicht abschließend geklärt ist, ob eine endogene Bildung bzw. Reduktion von NO zu HNO abläuft.

Vorteile einer Pharmakotherapie mit HNO-Donoren anstelle von NO-Donoren werden darin gesehen, dass geringe NO-Konzentrationen im Gefäßsystem cytoprotektive Eigenschaften haben, höhere NO-Konzentrationen jedoch cytotoxische Effekte bedingen können, während HNO-vermittelte Wirkungen selektiver und weniger konzentrationsabhängig abzulaufen scheinen (Paolucci *et al.*, 2007).

Während die Rolle von NO sowohl im Organismus als auch bei der Pharmakotherapie bereits weitestgehend aufgeklärt ist, bestehen im Falle von HNO noch zahlreiche offene Fragen und die Entwicklung von HNO-Donoren befindet sich erst im Anfangsstadium. Die Firma Cardioxyl Pharmaceuticals hat anhand eines HNO-Donors der ersten Generation bereits in einer Phase IIa Studie den Nachweis der Wirksamkeit am Menschen erbracht (NCT01092325). Derzeit erfolgt die Optimierung des ersten Kandidaten, um langfristig HNO-Donoren zur Therapie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz auf dem Arzneimittelmarkt zu etablieren.

4.1.2 Zielsetzung

Die Reduktion *N*-hydroxylierter Sulfonamide durch das mARC-Enzymsystem wurde am Beispiel des Prodrugs *N*-Hydroxyvaldecoxib sowie der beiden Modellverbindungen *N*-Hydroxybenzolsulfonamid und *N*-Hydroxy-4-toluolsulfonamid bereits von Havemeyer *et al.* (2010) beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals die mARC-katalysierte Reduktion der HNO-Donoren *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid zu den korrespondierenden Sulfonamiden charakterisiert werden (s. Abbildung 4.3).

N-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid zählen zu den HNO-Donoren aus der Klasse der *Piloty's acid* Derivate, welche bei alkalischem pH-Wert HNO unter Bildung der Sulfinsäure freisetzen (s. Abbildung 4.4) (Paolucci *et al.*, 2007). Werden *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid mARC-katalysiert zu den entsprechenden Sulfonamiden reduziert, können sie keine HNO-vermittelte pharmakologische Wirkung mehr hervorrufen. Die *N*-Reduktion stellt somit eine unerwünschte Inaktivierung dar.

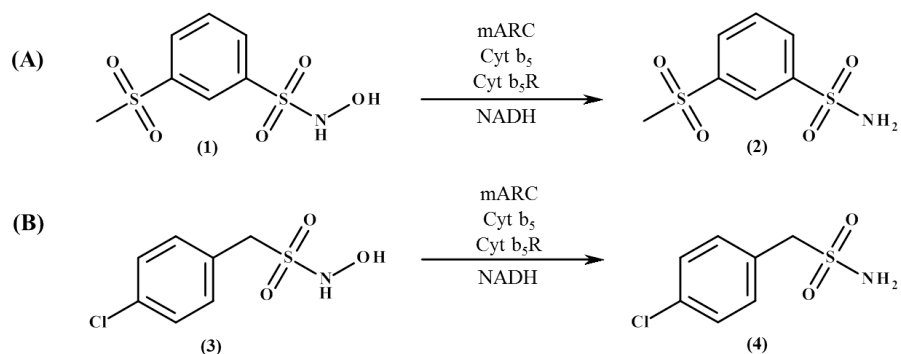


Abbildung 4.3: Reduktion von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid (A) und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid (B) durch das mARC-Enzymsystem

- (1) *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, (2) 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid,
 (3) 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, (4) 4-Chlorphenylmethansulfonamid

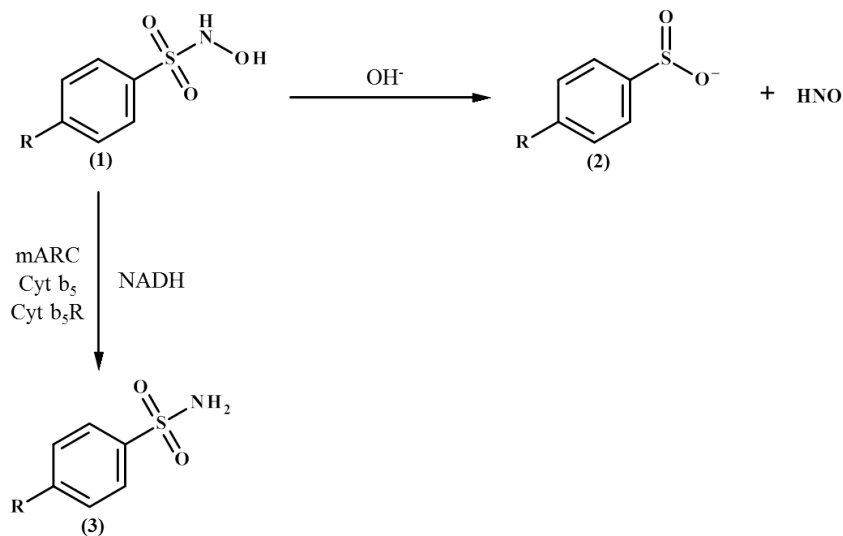


Abbildung 4.4: Inaktivierung von HNO-Donoren der *Piloty's acid* Serie durch das mARC-Enzymsystem

- (1) *N*-Hydroxysulfonamid, wirksam als HNO-Donor, (2) Sulfinsäure, (3) Sulfonamid, inaktiv als HNO-Donor

Ziel der Untersuchungen war es, anhand der genannten Verbindungen erste Hinweise auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu identifizieren. Diese sollten den Startpunkt der Planung und späteren Durchführung breiter angelegter QSAR-Studien zur Entwicklung neuartiger HNO-Donoren zur Therapie der Herzinsuffizienz bilden. Aufgrund der mARC-abhängigen Inaktivierung sollten strukturelle Eigenschaften ermittelt werden, die zu einer möglichst geringen Umsetzung durch das mARC-Enzymsystem führen.

Zunächst sollten hierfür HPLC-Methoden zur Trennung der *N*-Hydroxysulfonamide, Sulfonamide und Sulfinssäuren entwickelt und die Stabilitäten der HNO-Donoren unter Inkubationsbedingungen ebenso wie die Zeitabhängigkeit der mARC-katalysierten Reduktion geprüft werden. Abschließend sollten durch Inkubationen mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber sowie dem mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystem bei Vorliegen einer Michaelis-Menten-Kinetik die kinetischen Parameter bestimmt und hinsichtlich möglicher Struktur-Aktivitäts-Beziehungen analysiert werden.

4.2 Methoden

4.2.1 Materialien und Geräte

N-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid und -sulfinssäure wurden ebenso wie 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, 4-Chlorphenylmethansulfonamid und -sulfinssäure freundlicherweise von Dr. Reardon (Cardioxyl Pharmaceuticals) zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Chemikalien sowie Materialien und Geräte sind in Kapitel 7 dieser Arbeit aufgeführt.

4.2.2 Proteinquellen

Es wurden Biotransformationsstudien mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber sowie dem rekombinanten mARC1- bzw. mARC2-haltigen Enzymsystem als Proteinquellen durchgeführt. Hierbei wurden einheitliche Chargen verwendet, deren Gewinnung und Charakterisierung bereits unter 2.2.2 beschrieben wurde.

4.2.3 HPLC-Analytik

4.2.3.1 Trennung von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid und -sulfinsäure

Zur Trennung von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, dem entsprechenden Sulfonamid sowie der Sulfinsäure wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 616 Pump
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Integrator	EZChrom Elite, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, United States)
Stationäre Phase	Symmetry C18, 5 μ m, 4,6 \times 250 mm (Waters, Milford, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	10 mM Ammoniumacetat, pH 5,6/Acetonitril 93:7 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	30 min
Detektion	222 nm
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeiten	4,9 \pm 0,1 min (3-Methylsulfonylbenzolsulfinsäure) 10,8 \pm 0,2 min (3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid) 15,7 \pm 0,4 min (<i>N</i> -Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid)

Zur Herstellung des Fließmittels wurde die wässrige Phase zunächst durch einen Polyamidmembranfilter (0,45 μ m, Sartorius AG, Göttingen) filtriert, bevor der organische Anteil (HPLC-Grade) zugegeben und das Gemisch für 15 min im Ultraschallbad entgast wurde.

4.2.3.2 Trennung von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, 4-Chlorphenylmethansulfonamid und 4-Chlorphenylmethansulfinsäure

Zur Trennung von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, dem entsprechenden Sulfonamid sowie der Sulfinsäure wurde folgende Methode entwickelt:

Pumpe	Waters 616 Pump
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Integrator	EZChrom Elite, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, United States)
Stationäre Phase	Symmetry C18, 5 μm , 4,6 \times 250 mm (Waters, Milford, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	10 mM Ammoniumacetat, pH 5,6/Acetonitril 70:30 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	30 min
Detektion	229 nm
Injektionsvolumen	10 μl
Retentionszeiten	3,4 \pm 0,1 min (4-Chlorphenylmethansulfinsäure) 10,8 \pm 0,1 min (4-Chlorphenylmethansulfonamid) 15,1 \pm 0,1 min (4-Chlorphenyl- <i>N</i> -hydroxymethansulfonamid)

Zur Herstellung des Fließmittels wurde die wässrige Phase durch einen Polyamidmembranfilter (0,45 μm , Sartorius AG, Göttingen) filtriert. Anschließend wurde der organische Anteil (HPLC-Grade) zugegeben und das Gemisch für 15 min im Ultraschallbad entgast.

4.2.3.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit (3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid bzw. 4-Chlorphenylmethansulfonamid) in zehn verschiedenen Konzentrationen (0,5-500 μM) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) gelöst und mittels der beschriebenen HPLC-Analytik vermessen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen wie bei der Kalibrierung verwendet. Der entsprechende Metabolit sowie 0,05 mg hitzedenaturierte Mitochondrien der Schweineleber und 3 mM Substrat (*N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid bzw. 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid) wurden 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Dann wurde 1 mM NADH zugegeben und die Inkubation nach 15 min durch Hinzufügen von 150 μl Methanol abgestoppt. Die Proben wurden 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände anschließend per HPLC vermessen. Das Inkubationsvolumen betrug 150 μl . Jeder Ansatz enthielt 5 % DMSO (v/v).

4.2.4 Stabilitätsuntersuchungen

75 µl einer 3 mM Lösung von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid bzw. 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 mit 5 % DMSO (v/v) wurden bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 0, 30, 60 und 90 min wurden 75 µl Methanol zugegeben. Anschließend wurden die Proben geschüttelt und mittels der unter 4.2.3.1 bzw. 4.2.3.2 beschriebenen HPLC-Methoden vermessen.

Je zwei Ansätze einer 3 mM Lösung *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid bzw. 25 µM Lösung 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenylmethansulfonamid wurden in 20 mM MES-Puffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) hergestellt. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur im Autosampler der HPLC inkubiert und nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 24 Stunden mittels der unter 4.2.3.1 bzw. 4.2.3.2 beschriebenen Methoden vermessen.

4.2.5 Zusammensetzung der *in vitro* Biotransformationsansätze

4.2.5.1 Bestimmung der Zeitabhängigkeit

3 mM Substrat (*N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid bzw. 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid) wurden gemeinsam mit 5 µg Protein (OMV) über 3 min bei 37 °C in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde die Inkubation gestartet und nach 5, 10, 15, 20, 25, 30 bzw. 45 min durch Hinzufügen von 150 µl Methanol abgestoppt. Die Proben wurden 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände anschließend per HPLC analysiert. Das Inkubationsvolumen betrug 150 µl. Jeder Ansatz enthielt 5 % DMSO (v/v). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Protein, welcher nach 45 min abgestoppt wurde.

4.2.5.2 Bestimmung der Substratabhängigkeit

Protein und das jeweilige Substrat in unterschiedlicher Konzentration wurden über 3 min bei 37 °C in Puffer vorinkubiert. Das Substrat wurde in den Konzentrationen 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 bzw. 3 mM eingesetzt.

Bei Inkubationen mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion wurden 5 µg Protein sowie 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 verwendet und bei Inkubationen mit dem rekombinanten Enzymsystem 3,75 µg Protein mARC1 bzw. mARC2, 37,5 pmol Häm (Cytochrom b₅) und 3,75 pmol FAD (Cytochrom b₅ Reduktase) sowie 20 mM MES-Puffer pH 6,0.

Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde die Inkubation gestartet und nach 15 min (OMV) bzw. 10 min (rekombinante Proteine) durch Hinzufügen von 150 µl (OMV) bzw. 75 µl (rekombinante Proteine) Methanol abgestoppt. Die Proben wurden 5 min geschüttelt, 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände anschließend per

HPLC vermessen. Das Inkubationsvolumen betrug 150 μl im Falle der äußeren mitochondrialen Membranfraktion und 75 μl im Falle der rekombinanten Proteine. Jeder Ansatz enthielt 5 % DMSO (v/v). Es wurde jeweils ein Kontrollansatz ohne Protein durchgeführt. Jede Inkubation erfolgte dreimal. Die enzymkinetischen Parameter wurden mithilfe von SigmaPlot ermittelt (SigmaPlot 11.0; SPSS Science, Chicago, IL).

4.3 Ergebnisse

4.3.1 HPLC-Analytik

4.3.1.1 Kalibrierung und Wiederfindung von 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid

Ein repräsentatives Chromatogramm der Trennung von 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid sowie der korrespondierenden *N*-Hydroxyverbindung und Sulfinsäure ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

Im Konzentrationsbereich von 1-500 μM wurde eine lineare Kalibriergerade ($R^2 = 0,9995$) erhalten (s. Abbildung 4.6). Die Richtigkeit betrug 94 ± 5 % im Bestimmungsbereich (1-500 μM) und 85 % an der Bestimmungsgrenze (1 μM). Mithilfe der Kalibriergeraden wurde eine Wiederfindung von 104 ± 4 % im Bestimmungsbereich (5-500 μM) und 111 % an der Bestimmungsgrenze (5 μM) ermittelt.

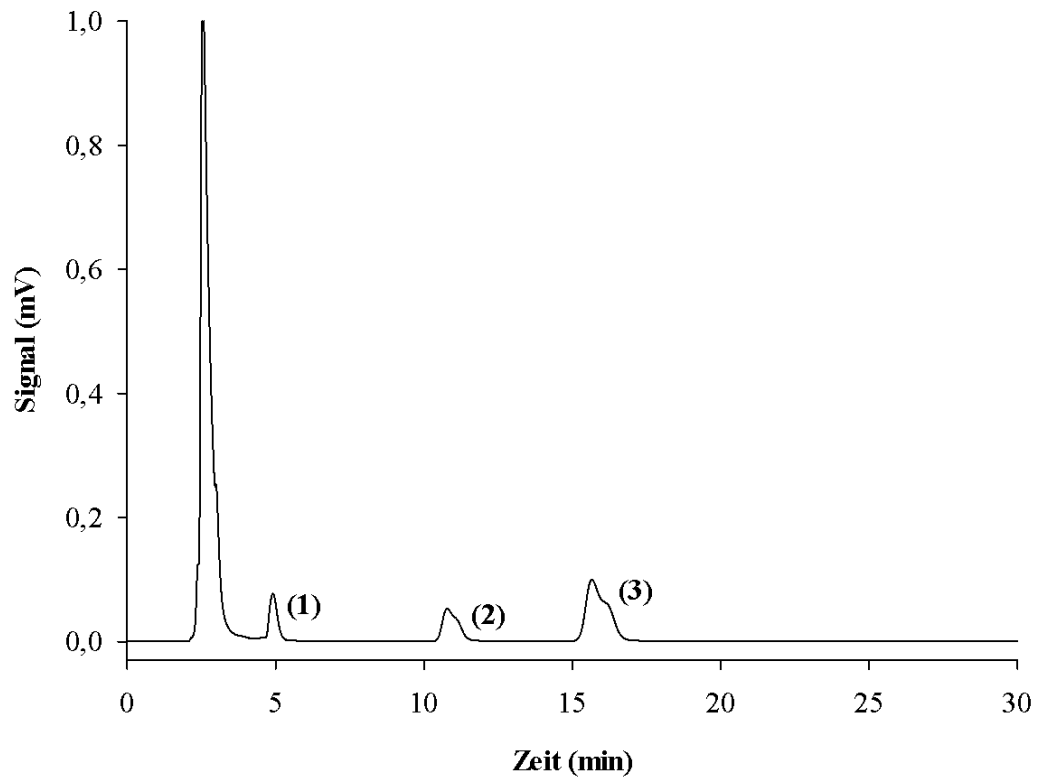


Abbildung 4.5: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid und -sulfinsäure

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, 500 μ M 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 3-Methylsulfonylbenzolsulfinsäure, (2) 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid, (3) *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid

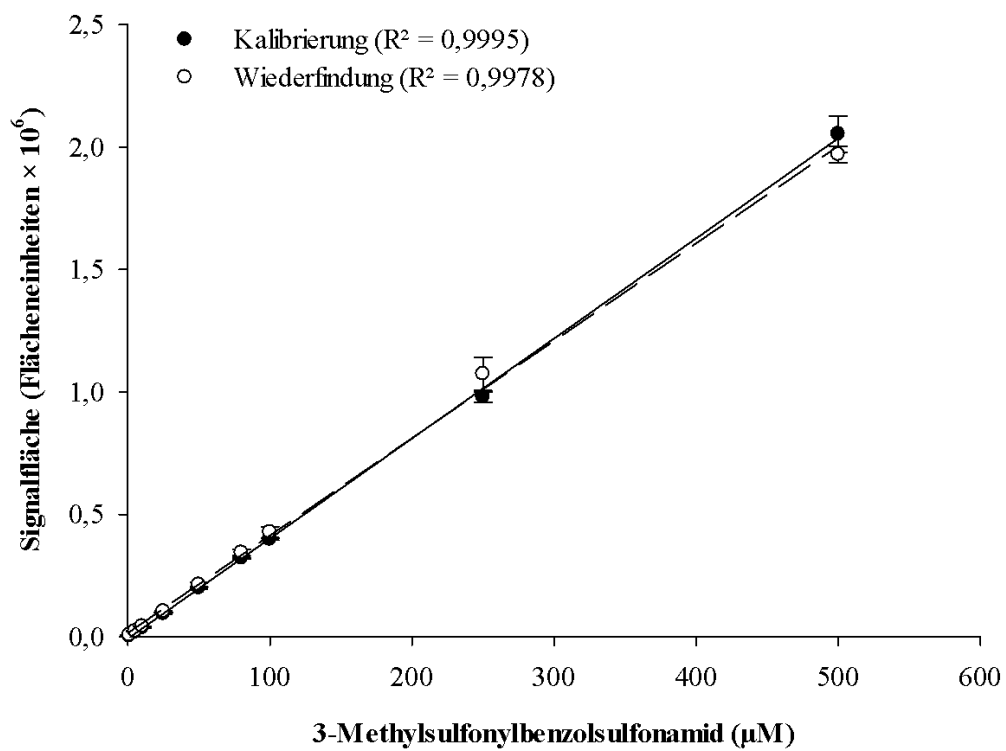


Abbildung 4.6: Kalibrierung und Wiederfindung von 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden.

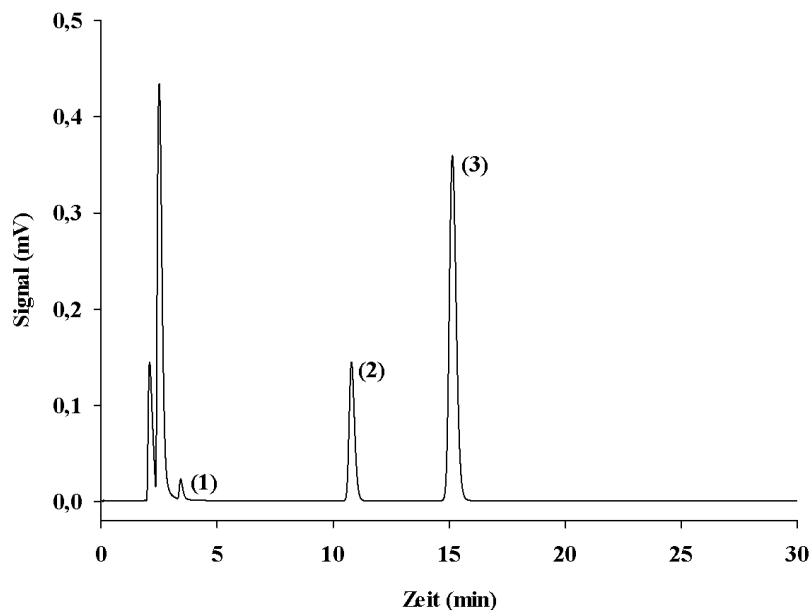


Abbildung 4.7: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, 4-Chlorphenylmethansulfonamid und -sulfinsäure

Dargestellt ist ein Inkubationsansatz bestehend aus 3 mM 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, 500 μ M 4-Chlorphenylmethansulfonamid, 5 % (v/v) DMSO, 1 mM NADH sowie 0,05 mg hitzedenaturierten Mitochondrien in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. (1) 4-Chlorphenylmethansulfinsäure, (2) 4-Chlorphenylmethansulfonamid, (3) 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid

4.3.1.2 Kalibrierung und Wiederfindung von 4-Chlorphenylmethansulfonamid

Das repräsentative Chromatogramm in Abbildung 4.7 zeigt die Trennung von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, dem entsprechenden Sulfonamid sowie der Sulfinsäure.

Es wurde eine lineare Kalibriergerade ($R^2 = 0,9999$) im Konzentrationsbereich von 0,5-500 μ M ermittelt (s. Abbildung 4.8). Die Richtigkeit lag bei 100 ± 3 % im Bestimmungsbereich (0,5-500 μ M) und 102 % an der Bestimmungsgrenze (0,5 μ M). Die mittels Kalibriergeraden bestimmte Wiederfindung betrug 101 ± 3 % im Bestimmungsbereich von 5-500 μ M und 105 % an der Bestimmungsgrenze (5 μ M).

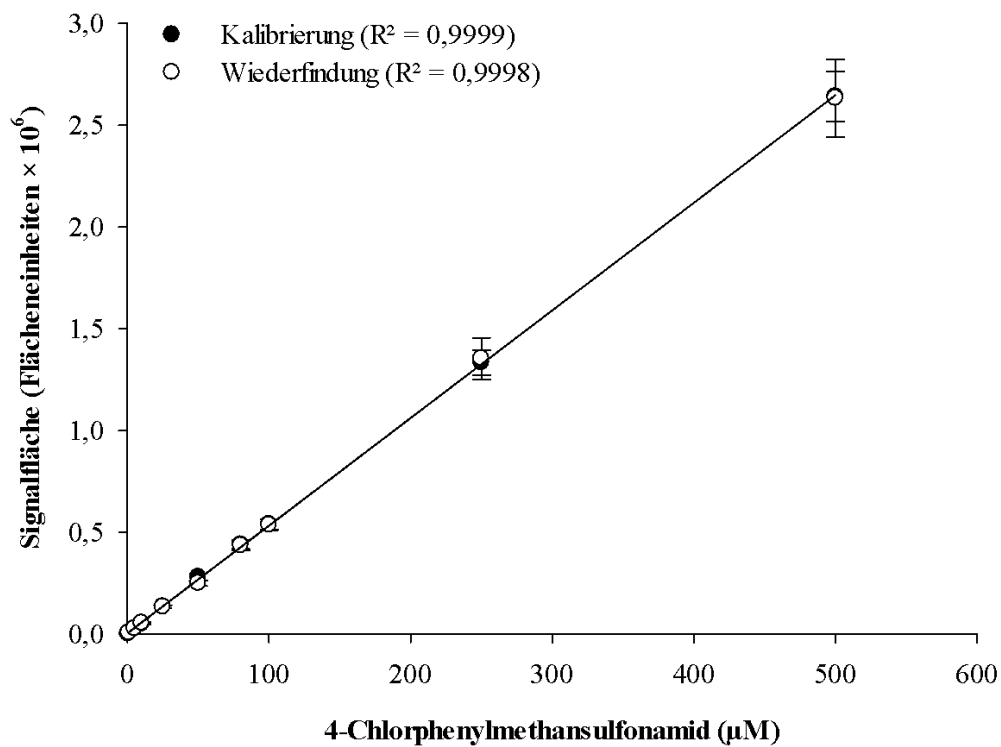


Abbildung 4.8: Kalibrierung und Wiederfindung von 4-Chlorphenylmethansulfonamid

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden.

4.3.2 Stabilitätsuntersuchungen

4.3.2.1 Stabilität von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid unter Inkubationsbedingungen

In Biotransformationsstudien sollte die mARC-katalysierte *N*-Reduktion von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid untersucht werden. Zunächst wurde die Stabilität dieser Verbindungen unter Inkubationsbedingungen geprüft, um zu gewährleisten, dass bei *in vitro* Biotransformationsstudien die *N*-hydroxylierten Sulfonamide und nicht aufgrund von HNO-Freisetzung die entsprechenden Sulfinsäuren vorliegen (s. Abbildung 4.9).

Für beide Verbindungen wurde mittels HPLC eine geringfügige Abnahme an *N*-hydroxyliertem Sulfonamid bzw. Zunahme der korrespondierenden Sulfinsäure ermittelt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden noch 97 % (*N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid) bzw. 99 % (4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid) bezogen auf die Ausgangskonzentration des *N*-hydroxylierten Sulfonamids detektiert. Biotransformationsstudien unter diesen Versuchsbedingungen sind somit hinsichtlich der Stabilität der *N*-hydroxylierten Sulfonamide bei Inkubationszeiten unter 30 min unproblematisch.

4.3.2.2 Stabilität von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid, 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid und 4-Chlorphenylmethansulfonamid bei Raumtemperatur

Da die Auswertung späterer Biotransformationsstudien per HPLC-Analytik erfolgen sollte, wurde zunächst die Stabilität der Substrate und Metabolite bei Raumtemperatur im Autosampler überprüft (s. Abbildungen 4.10 und 4.11). Die Metabolite 4-Chlorphenylmethansulfonamid bzw. 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid waren über die gesamte Versuchsdauer stabil. Im Falle der entsprechenden *N*-hydroxylierten Verbindungen wurde im Verlauf der Versuchsdauer von 24 Stunden eine Abnahme auf etwa 80 % (4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid) bzw. 70 % (*N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid) der Ausgangskonzentration detektiert, die auf die Freisetzung von HNO unter Bildung der Sulfinsäure zurückzuführen war.

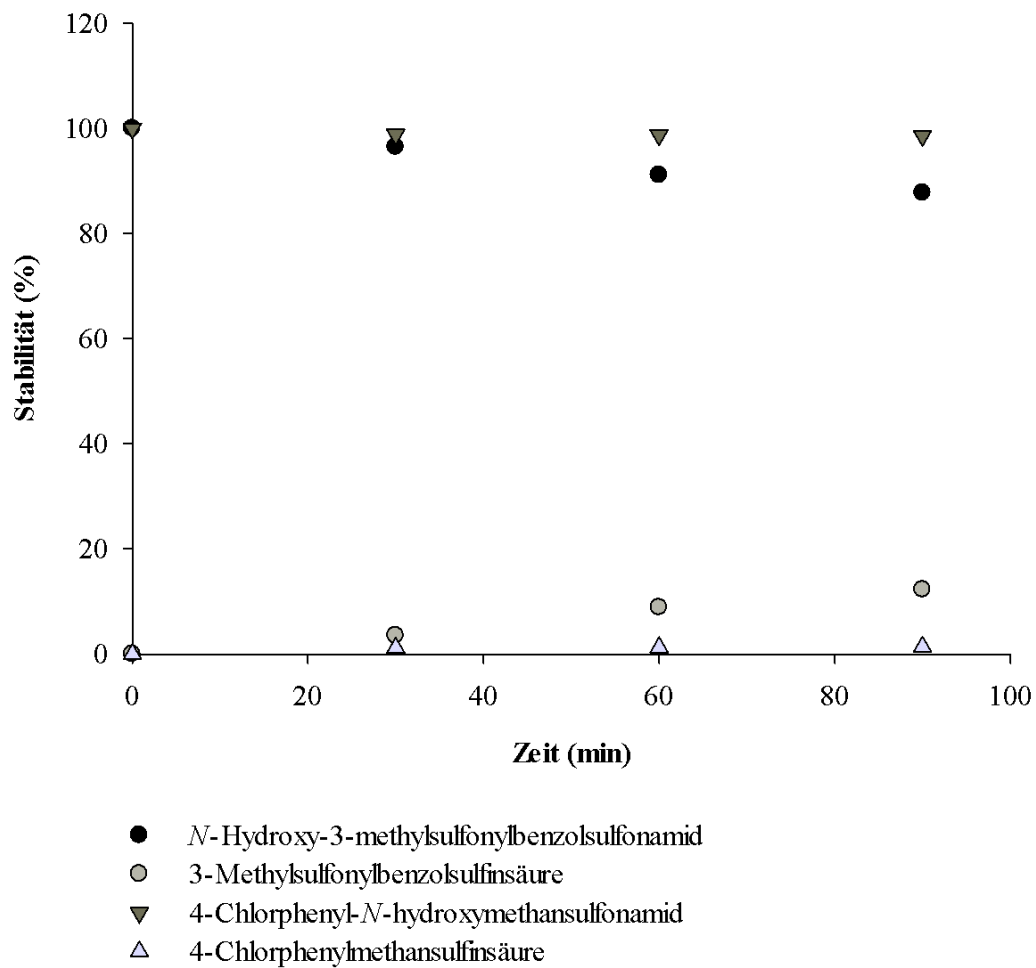


Abbildung 4.9: Stabilität von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid unter Inkubationsbedingungen

Die Versuchsdurchführung ist unter 4.2.4 beschrieben. Dargestellt sind die Ergebnisse von je einem Ansatz, der einfach vermessen wurde.

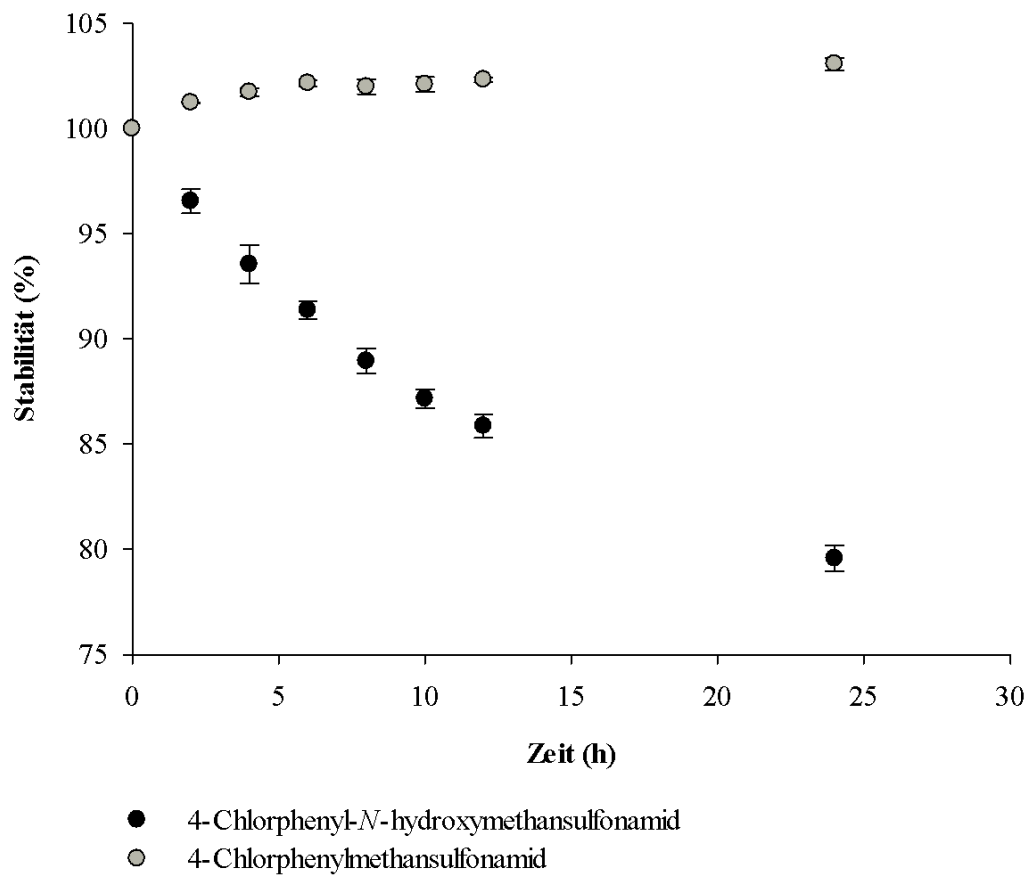


Abbildung 4.10: Stabilität von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid und 4-Chlorphenylmethansulfonamid bei Raumtemperatur

Die Zusammensetzung der Lösungen ist unter 4.2.4 beschrieben.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus je zwei unabhängigen Ansätzen, die einfach vermessen wurden.

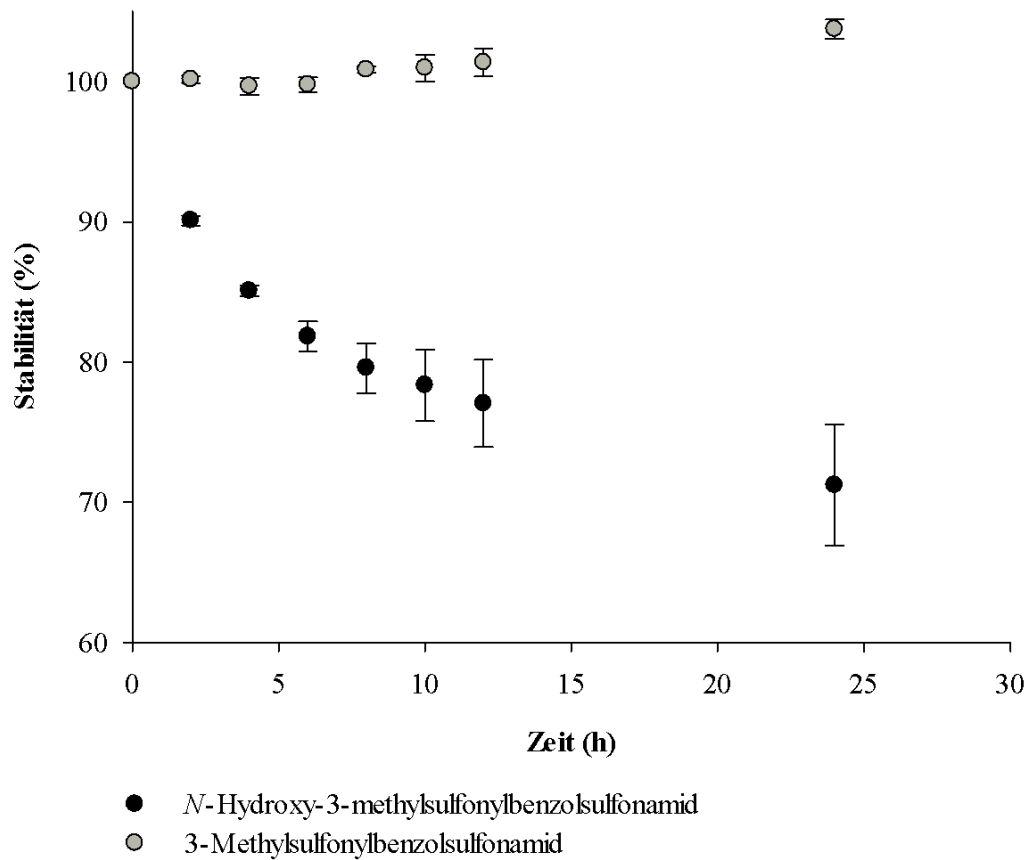


Abbildung 4.11: Stabilität von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid und 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid bei Raumtemperatur

Die Zusammensetzung der Lösungen ist unter 4.2.4 beschrieben.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus je zwei unabhängigen Ansätzen, die einfach vermessen wurden.

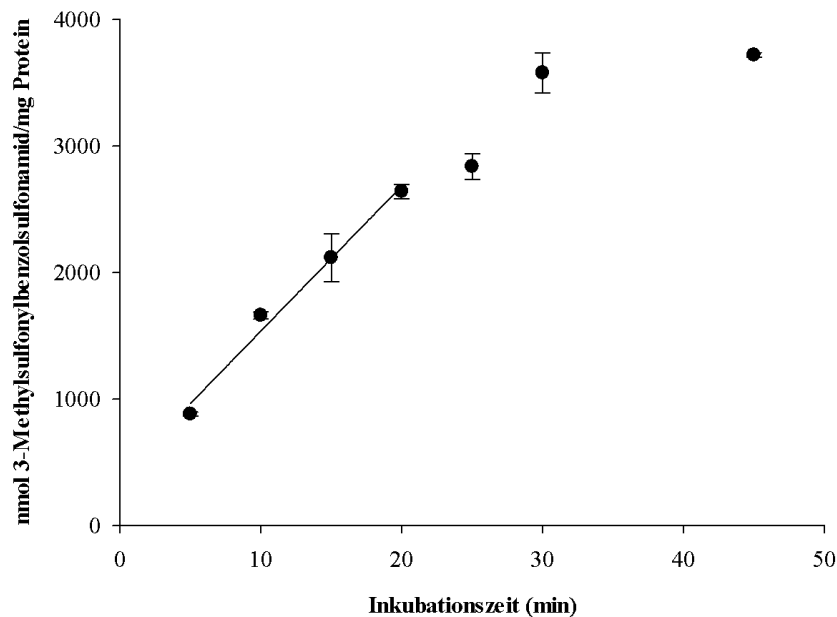


Abbildung 4.12: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 4.2.5.1 beschrieben. Inkubiert wurden Parallelansätze, die doppelt vermessen wurden. Die Reduktion verlief über 20 min zeitlinear ($R^2 = 0,9855$).

4.3.3 Biotransformation von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid

4.3.3.1 Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Exemplarisch wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die mARC-katalysierte Reduktion von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid unter Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion als Enzymquelle untersucht. Die *N*-Reduktion verlief über 20 min zeitlinear (s. Abbildung 4.12).

4.3.3.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter

Der Einfluss der Substratkonzentration auf die *N*-Reduktion von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid wurde in Inkubationen mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion sowie dem mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekonstituierten, rekombinanten Enzymsystem untersucht. *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid wur-

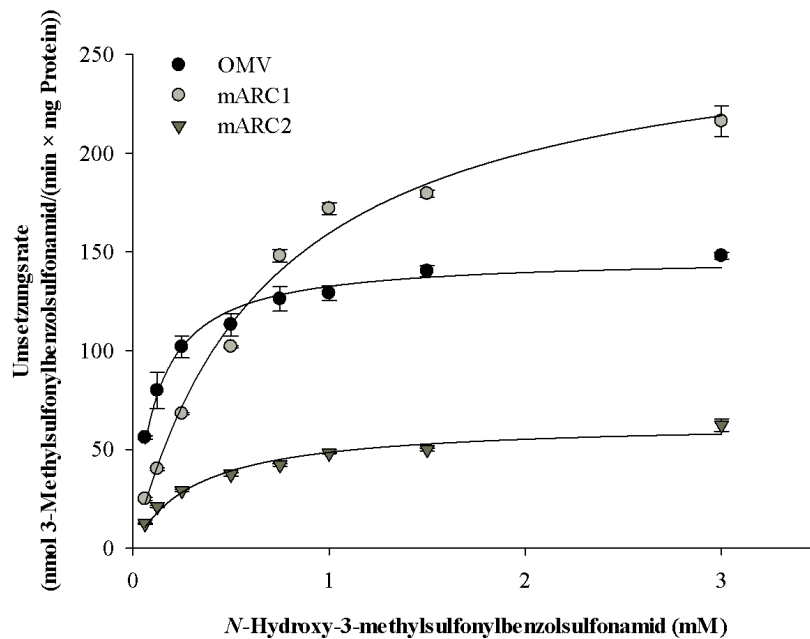


Abbildung 4.13: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid durch die äußere mitochondriale Membranfraktion sowie das mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und deren Aufarbeitung ist in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei unabhängigen Ansätzen, die doppelt vermessen wurden.

de sowohl durch die äußere mitochondriale Membranfraktion als auch das mARC1- bzw. mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem zu 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid reduziert. In allen Fällen folgte die Umsetzung einer Michaelis-Menten-Kinetik (s. Abbildung 4.13). Mittels SigmaPlot wurden die enzymkinetischen Parameter bestimmt (s. Tabelle 4.1).

	OMV	mARC1	mARC2
$V_{\max}^{[a]}$	156 ± 7	300 ± 25	65 ± 1
$K_M^{[b]}$	$0,121 \pm 0,019$	$0,834 \pm 0,105$	$0,307 \pm 0,007$

Tabelle 4.1: Kinetische Parameter der Reduktion von *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid durch die äußere mitochondriale Membranfraktion sowie das mARC1- bzw. mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus je drei unabhängigen Versuchen, deren Durchführung unter 4.2.5.2 beschrieben ist.

[a] (nmol 3-Methylsulfonylbenzolsulfonamid/(min \times mg Protein)),

[b] (mM *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid)

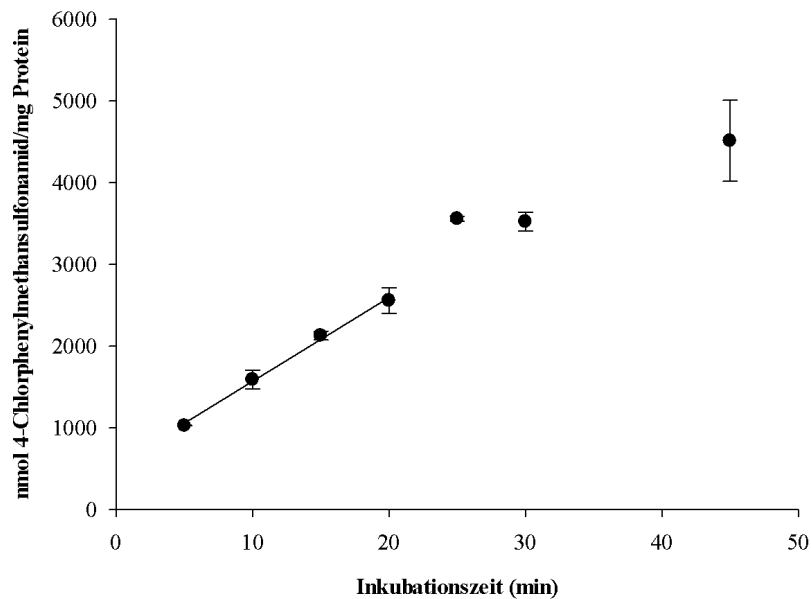


Abbildung 4.14: Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid durch die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber

Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist in Kapitel 4.2.5.1 beschrieben. Inkubiert wurden Parallelansätze, die doppelt vermessen wurden. Die Reduktion verlief über 20 min zeitlinear ($R^2 = 0,9962$).

4.3.4 Biotransformation von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid

4.3.4.1 Bestimmung der Zeitabhängigkeit

Der Einfluss der Inkubationszeit auf die Reduktion von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid wurde exemplarisch unter Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber als Enzymquelle untersucht. Wie Abbildung 4.14 zeigt, wurde ein linearer Zusammenhang zwischen *N*-Reduktion und Inkubationszeit bis zu einer Inkubationsdauer von 20 min ermittelt.

4.3.4.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter

4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid wurde sowohl bei Inkubationen mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber als auch dem mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystem zu 4-Chlorphenylmethansulfonamid umgesetzt.

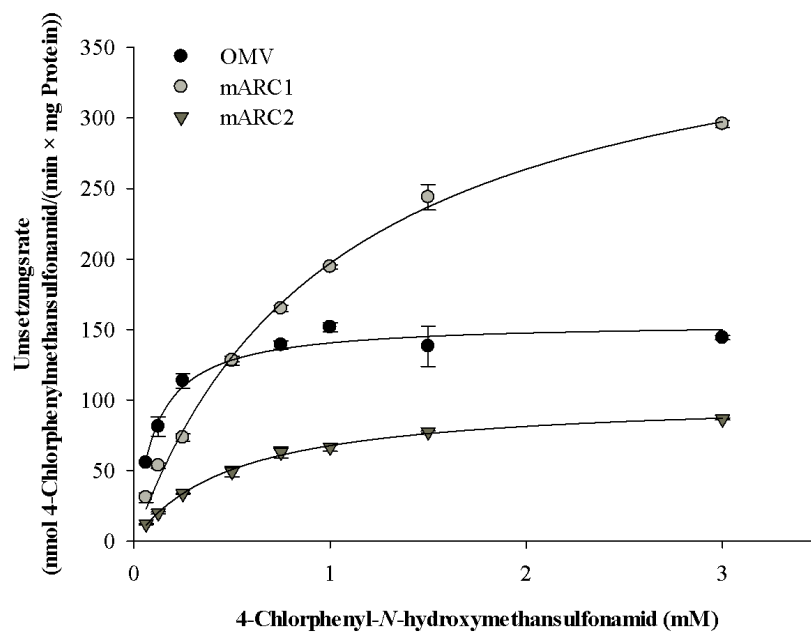


Abbildung 4.15: Einfluss der Substratkonzentration auf die Reduktion von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid durch die äußere mitochondriale Membranfraktion sowie das mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze und deren Aufarbeitung ist in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei unabhängigen Ansätzen, die doppelt vermessen wurden.

In allen Fällen folgte die Reduktion einer Michaelis-Menten-Kinetik (s. Abbildung 4.15). Die kinetischen Parameter wurden mittels SigmaPlot bestimmt (s. Tabelle 4.2).

	OMV	mARC1	mARC2
$V_{\max}^{[a]}$	143 ± 11	369 ± 24	104 ± 6
$K_M^{[b]}$	$0,091 \pm 0,010$	$1,138 \pm 0,080$	$0,584 \pm 0,063$

Tabelle 4.2: Kinetische Parameter der Reduktion von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid durch die äußere mitochondriale Membranfraktion sowie das mARC1- bzw. mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus je drei unabhängigen Versuchen, deren Durchführung unter 4.2.5.2 beschrieben ist.

[a] (nmol 4-Chlorphenylmethansulfonamid/(min \times mg Protein)),

[b] (mM 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid)

4.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte die mARC-katalysierte Reduktion zweier Arzneistoffkandidaten aus der Reihe der HNO-Donoren zur Therapie der Herzinsuffizienz sowohl für die äußere mitochondriale Membranfraktion der Schweineleber als auch das rekombinante mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem charakterisiert werden. Der Vergleich der ermittelten enzymkinetischen Parameter beider Verbindungen ermöglichte es, erste Hypothesen bezüglich Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der *N*-Reduktion und somit Inaktivierung von HNO-Donoren aus der Klasse der *Piloty's acid* Derivate durch das mARC-Enzymsystem aufzustellen. Diese könnten in zukünftigen Studien anhand weiterer Entwicklungsprodukte überprüft werden und somit der Optimierung der Therapie der Herzinsuffizienz mit neuartigen HNO-Donoren dienen.

Unter Inkubationsbedingungen bei pH 6,0 zeigten die untersuchten Verbindungen nur eine äußerst geringfügige HNO-Freisetzung und somit ausreichende Stabilität für *in vitro* Biotransformationsstudien. Die enzymatische Reduktion wies jeweils einen zeitlinearen Bereich sowie eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik auf. Somit waren die Voraussetzungen zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter erfüllt.

Für beide Verbindungen wurden für mARC1 höhere V_{\max} - und K_M -Werte als für mARC2 ermittelt (s. Abbildung 4.16). Beide Substrate scheinen somit eine höhere Affinität zu mARC2 zu besitzen. Die Inkubation mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber zeigte für beide Verbindungen vergleichbare V_{\max} - und K_M -Werte.

Sowohl für humanes mARC1 als auch mARC2 lieferte 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid signifikant höhere V_{\max} -Werte als *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid (s. Abbildung 4.16). Beide Verbindungen unterscheiden sich sowohl in der Lipophilie als auch dem Charakter der *N*-Hydroxysulfonamidstruktur. Die Kombination aus Chlorsubstituent und einer zusätzlichen Methylengruppe bewirkt, dass 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid lipophiler ist als *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid. Außerdem bedingt die zusätzliche Methylengruppe, dass im Falle der Chlorverbindung eine aliphatische *N*-Hydroxysulfonamidstruktur vorliegt.

Die Reduktion aliphatischer Amidoxime durch das mARC-Enzymsystem wurde am Beispiel von Benzylamidoxim bereits von Krompholz (2013) untersucht. Ein Vergleich mit dem aromatischen Amidoxim Benzamidoxim ergab, dass die aliphatische Verbindung durch hepatische Mitochondrien und die äußere mitochondriale Membranfraktion um den Faktor 1,2 und durch das humane mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem um den Faktor 2,4 besser umgesetzt wurde.

Die durch Inkubation von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid und *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion erhaltenen V_{\max} -Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede im *student's t-test*. Für humanes mARC1 und mARC2 lieferte das aliphatische *N*-Hydroxysulfonamid jedoch signifikant höhere V_{\max} -Werte als das aromatische *N*-Hydroxysulfonamid

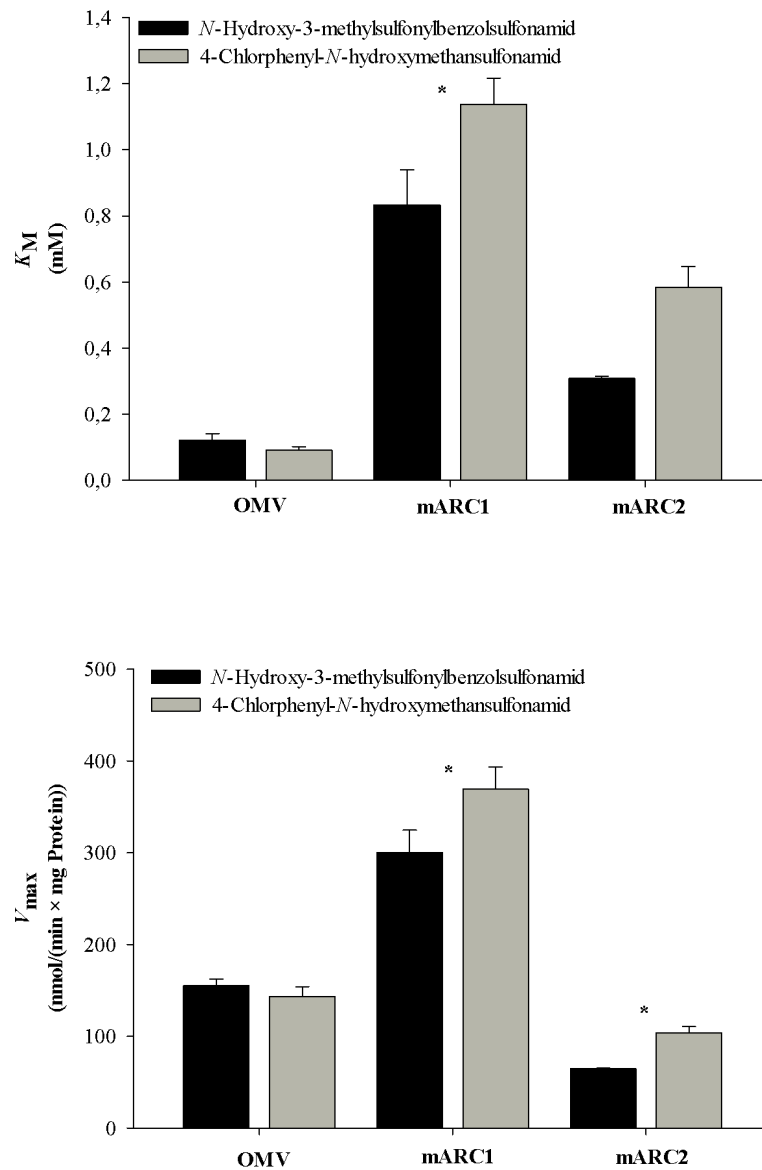


Abbildung 4.16: Vergleich der K_M - bzw. V_{max} -Werte von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid und *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzulfonamid für die äußere mitochondriale Membranfraktion sowie das mARC1- bzw. mARC2-haltige rekombinante Enzymsystem

Die Versuchsdurchführung ist unter 4.2.5.2 beschrieben. * statistisch signifikant im *student's t-test* ($P = 0,031$ (K_M -Werte für mARC1), $P = 0,047$ (V_{max} -Werte für mARC1), $P = 0,001$ (V_{max} -Werte für mARC2))

(Faktor 1,2 (mARC1), Faktor 1,6 (mARC2)). Der von Krompholz (2013) dargestellte Trend, dass Substrate mit aliphatischem Charakter der *N*-Hydroxystruktur bevorzugt umgesetzt werden, konnte somit anhand zweier *N*-Hydroxysulfonamide bestätigt werden.

In Kapitel 2 dieser Arbeit wurde die Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime durch das mARC-Enzymsystem beschrieben. Hierbei wurde kein eindeutiger Einfluss der Lipophilie oder der elektronischen Eigenschaften des Substituenten auf die enzymatische *N*-Reduktion detektiert. Der Vergleich der V_{\max} -Werte zeigte jedoch, dass mit 4-Methyl- und 4-Trifluormethylbenzamidoxim zwei relativ lipophile Verbindungen sowohl für die äußere mitochondriale Membranfraktion als auch das mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem die höchsten V_{\max} -Werte lieferten, während das hydrophilere 4-Nitrobenzamidoxim bei allen drei Enzymquellen zu den geringsten Umsatzraten führte. Dieser Trend lässt sich zumindest für die rekombinanten Enzyme auf die untersuchten *N*-Hydroxysulfonamide übertragen, da die lipophilere Chlorverbindung hier signifikant höhere V_{\max} -Werte lieferte als die hydrophilere 4-Methylsulfonylverbindung.

Um die aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, sollte in nachfolgenden Studien die mARC-katalysierte Reduktion weiterer *Piloty's acid* Derivate untersucht werden. Hierbei könnten *N*-Hydroxysulfonamide mit aliphatischen Ketten unterschiedlicher Länge eingesetzt werden. Die bevorzugte Reduktion aliphatischer *N*-Hydroxystrukturen könnte darauf hindeuten, dass das aktive Zentrum von mARC aufgrund seiner Struktur sterisch für kleinere, aliphatische Substratfragmente besser zugänglich ist als für größere, aromatische Fragmente, obwohl derzeit von einer Lokalisation des Molybdäncofaktors an der Proteinoberfläche ausgegangen wird. Durch Variation der Kettenlänge könnte geprüft werden, ob eine Verlängerung der Kette die *N*-Reduktion zunächst bis zu einem Optimum erhöht und bei sehr langen und sperrigen aliphatischen Ketten wieder erniedrigt. Um den Einfluss der Lipophilie näher zu prüfen, könnten am Benzolring Substituenten eingefügt oder aber verschiedene Heterocyclusen verwendet werden. Sobald die Kristallstruktur von mARC aufgeklärt ist, könnten die Hypothesen zusätzlich durch 3D-QSAR-Studien getestet werden.

4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid und *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid stellen Entwicklungsprodukte aus der Klasse der HNO-Donoren zur Therapie der Herzinsuffizienz dar. Die mARC-katalysierte Reduktion zu den korrespondierenden Sulfonamiden verhindert eine HNO-Freisetzung und somit Entfaltung der gewünschten Wirkung *in vivo*. Ziel der Entwicklung sollten daher Verbindungen sein, die nur geringfügig durch mARC umgesetzt werden. Der Vergleich beider Verbindungen deutet daraufhin, dass in Zukunft insbesondere hydrophile, aromatische *N*-Hydroxysulfonamide getestet werden sollten. Dies könnte erreicht werden, indem anstelle des Benzolrings ein Stickstoff- oder Sauerstoff-haltiger Heterocyclus eingesetzt und mit entsprechenden Substituenten sowie einer *N*-Hydroxysulfonamidstruktur mit aromatischem Charakter kombiniert wird.

4.5 Zusammenfassung

Anhand von 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid und *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid wurde erstmals die mARC-katalysierte Reduktion neuartiger HNO-Donoren zur Therapie der Herzinsuffizienz charakterisiert. Sowohl für die äußere mitochondriale Membranfraktion als auch das rekombinante mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem wurde eine Abhängigkeit der Umsetzung von der Substratkonzentration im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik detektiert, so dass die enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} ermittelt werden konnten.

Anhand dieser Daten wurden erste Hypothesen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt. Diese könnten in weiterführenden Studien getestet werden und langfristig helfen, HNO-Donoren aus der Klasse der *Piloty's acid* Derivate zu entwickeln, welche nur geringfügig durch mARC inaktiviert werden, und somit letztlich die Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz optimieren.

5 Biotransformationsstudien aromatischer Nitro- und Nitrosoverbindungen

5.1 Einleitung

5.1.1 Toxizität aromatischer Nitro- und Nitrosoverbindungen

Nitroaromaten spielen eine wichtige Rolle in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. Sie werden sowohl bei der Synthese von Farbstoffen, Pestiziden und Sprengstoffen als auch in der Kunststoffverarbeitung eingesetzt. Außerdem kommen sie in Tabakrauch oder Autoabgasen vor. Ebenso enthalten viele Arzneistoffe Nitrogruppen (Kovacic und Somanathan, 2014; Reichl *et al.*, 2002).

Die Reduktion von Nitroaromaten kann zur Bildung reaktiver Nitroso- oder Hydroxylamin-Intermediate sowie reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanion bzw. Wasserstoffperoxid führen. Im ersten Reduktionsschritt wird durch Aufnahme eines Elektrons durch die Nitrogruppe ein Nitroanionradikal gebildet (s. Abbildung 5.1). Die weitere Reduktion verläuft unterschiedlich in An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff. Unter anaeroben Bedingungen wird das Nitroanionradikal durch Aufnahme eines weiteren Elektrons zur Nitrosoverbindung umgesetzt. Im weiteren Reduktionsverlauf entsteht das entsprechende Hydroxylamin bzw. Amin, wobei jeweils zwei weitere Elektronen übertragen werden. Unter aeroben Bedingungen kann das anfangs gebildete Nitroanionradikal durch molekularen Sauerstoff oxidiert werden, wobei die Ausgangsverbindung und Superoxidanion entstehen. Superoxidanion kann durch Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt werden (Ask *et al.*, 2003).

Die entstandenen Nitroso- und Hydroxylamin-Intermediate können kovalent an Glutathion binden sowie Proteine und DNA alkylieren und so mutagene bzw. kanzerogene Effekte hervorrufen. Für Hydroxylamine wie beispielsweise Sulfamethoxazolhydroxylamin oder Dapsonhydroxylamin sind außerdem toxische Effekte aufgrund der Bildung von Methämoglobin beschrieben (Reilly *et al.*, 1999).

Werden vermehrt ROS gebildet und reichen die körpereigenen antioxidativen Schutzmechanismen nicht aus, kommt es zu einem Ungleichgewicht, welches als oxidativer Stress bezeichnet wird (Turrens, 2003). Oxidation bzw. Schädigung von Lipiden, Proteinen und DNA führen zu Alterungsprozessen oder dem Zelltod. Außerdem werden redoxensitive Signalwege aktiviert, welche schädigende, aber auch protektive Effekte hervorrufen können (Finkel und Holbrook, 2000).

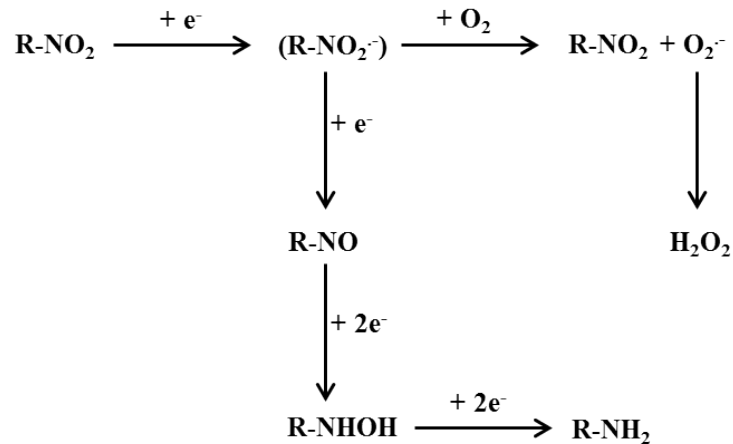


Abbildung 5.1: Mechanismus der Reduktion nitroaromatischer Verbindungen in An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff nach Ask *et al.* (2003)

Trotz der beschriebenen Toxizität von Nitroaromaten sind auf dem Arzneimittelmarkt Wirkstoffe vertreten, die Nitrogruppen enthalten (s. Abbildung 5.2). Ein Beispiel hierfür ist Chloramphenicol. Bei der Therapie können aplastische Anämien sowie Agranulozytose als Nebenwirkungen auftreten. Daher wird es nur noch als Reserveantibiotikum zur Behandlung von Typhus, Paratyphus und bakterieller Meningitis sowie lokal am Auge verwendet (Mutschler, 2012). Auch die antiandrogene Verbindung Flutamid, welche zur Therapie des Prostatakarzinoms genutzt wird, enthält eine nitroaromatische Struktur. Durch Reduktion der Nitrogruppe entstehende Nitroso-, Hydroxylamin- und Aminverbindungen schädigen in diesem Fall vor allem Proteine und DNA der Leber (Coe *et al.*, 2007). Weitere Beispiele sind Nitrazepam, Nifedipin oder Nitrofurantoin, die trotz ihrer nitroaromatischen Strukturen und dem damit verbundenen toxikologischen Risiko häufig eingesetzte Arzneistoffe darstellen (Mutschler, 2012).

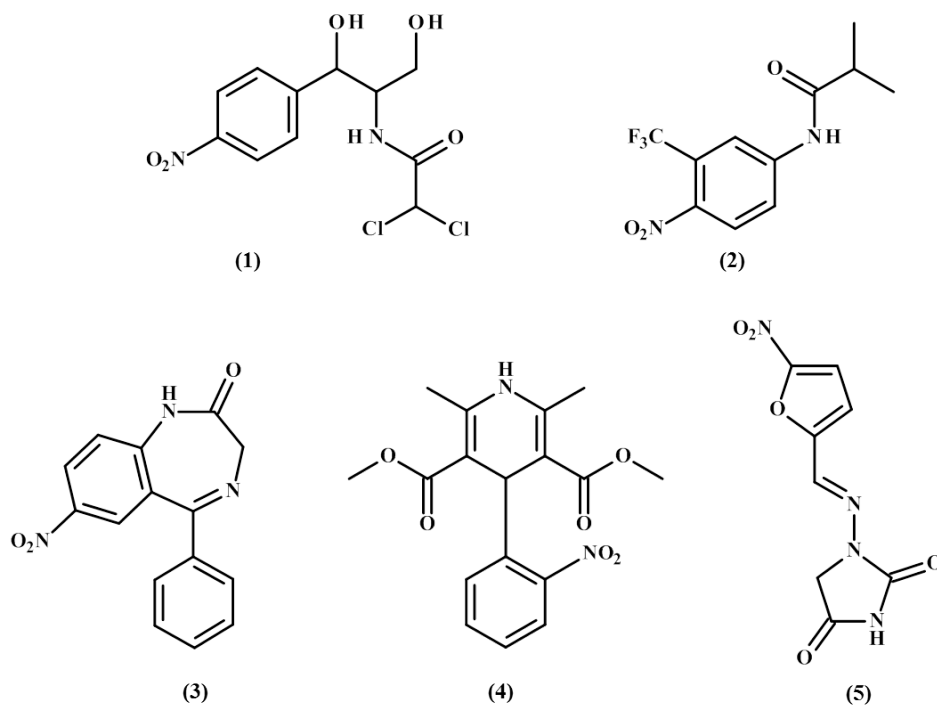


Abbildung 5.2: Beispiele für Arzneistoffe mit nitroaromatischen Strukturen

(1) Chloramphenicol, (2) Flutamid, (3) Nitrazepam, (4) Nifedipin, (5) Nitrofurantoin

5.1.2 Enzymatische Reduktion aromatischer Nitro- und Nitrosoverbindungen

Aromatische Nitroverbindungen werden durch Nitroreduktasen metabolisiert. Hierbei handelt es sich um FMN- oder FAD-haltige Enzyme, welche NADH oder NADPH zur Elektronenübertragung nutzen (Kovacic und Somanathan, 2014). Diese kommen vor allem in Bakterien und in geringerem Ausmaß in Eukaryoten vor (Méndez-Vilas, 2010).

Je nachdem, ob Nitroreduktasen in Anwesenheit von Sauerstoff ein- oder zwei-Elektronen-Reduktionen katalysieren, werden sie als Typ I (sauerstoffunabhängig) oder Typ II (sauerstoffabhängig) bezeichnet (Koder *et al.*, 2001). Typ I Nitroreduktasen katalysieren in An- und Abwesenheit von Sauerstoff den Transfer von je zwei Elektronen von NADH oder NADPH auf die Nitrogruppe, so dass zunächst die entsprechende Nitrosoverbindung entsteht und in den nächsten Schritten das korrespondierende Hydroxylamin bzw. Amin. Typ II Nitroreduktasen katalysieren in Anwesenheit von Sauerstoff eine ein-Elektronen-Reduktion. Durch Aufnahme des Elektrons durch die Nitrogruppe entsteht ein Nitroanionradikal, welches mit Sauerstoff unter Bildung von Superoxid anion und Regeneration der ursprünglichen Nitroverbindung reagiert (Méndez-Vilas, 2010). Die Unterschiede in der Katalyse durch Nitroreduktasen des Typs I und II erklären, warum für die Toxizität von Nitroaromaten sowohl Nitroso- und Hydroxylaminverbindungen als auch reaktive Sauerstoffspezies verantwortlich sind (s. Abbildung 5.1).

Typ I Nitroreduktasen sind an der Reduktion verschiedenster Nitroverbindungen wie etwa Nitrofurane, Nitrobenzole, Nitrophenole, Nitrobenzole und Nitroimidazole beteiligt (Race *et al.*, 2005; Olekhovich *et al.*, 2009). Sie werden in zwei weitere Gruppen eingeteilt, je nach Sequenzähnlichkeit zu den *E. coli* Nitroreduktasen NfsA (Gruppe A), welche NADPH als Elektronendonator verwendet, und NfsB (Gruppe B), welche NADH oder NADPH nutzen kann. In beiden Fällen handelt es sich zumeist um bakterielle, Flavin-haltige Homodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa, welche strukturell unterschiedliche Nitroverbindungen reduzieren (Méndez-Vilas, 2010).

Mit Frm2 und Hbn1 werden *nitroreductase-like* Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* diskutiert, die sich weder Gruppe A noch B zuordnen lassen, und eine neue Familie der Nitroreduktasen darstellen (de Oliveira *et al.*, 2010).

Die humane Jodtyrosin-Dejodase, welche die Dejodierung von Mono- und Di-jodtyrosin katalysiert, enthält eine NfsA-Nitroreduktase-Domäne und wird daher der Gruppe A der Nitroreduktasen zugeordnet (Friedman *et al.*, 2006). Im Unterschied dazu handelt es sich bei den in Säugern vertretenen Enzymen NADPH-Chinonoxido-reduktase (DT-Diaphorase) und Xanthinoxido-reduktase um Vertreter, die zwar funktionelle Ähnlichkeit zu Nitroreduktasen des Typs I aufweisen, jedoch keine Nfs-Domäne beinhalten (Méndez-Vilas, 2010). In Eukaryoten sind für Aldehydoxidase, Cytochrom c Oxidase und NADPH-Cytochrom P450 Reduktase funktionelle Ähnlichkeiten zu Nitroreduktasen des Typs II beschrieben (Méndez-Vilas, 2010).

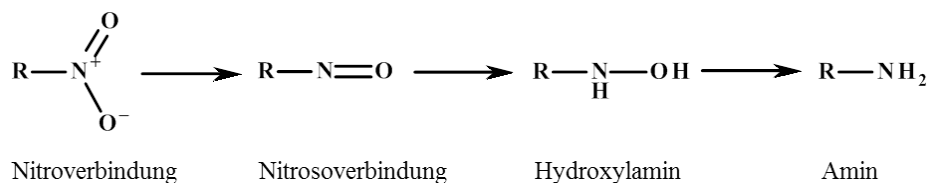


Abbildung 5.3: Reduktion von Nitroverbindungen zu Aminen nach Becker und Beckert (2004)

Somit sind bisher zwar vor allem bakterielle Nitroreduktasen bekannt, jedoch sind einige von ihnen auch für den Menschen von großer Bedeutung. Vor allem Nitroreduktasen anaerober Clostridium-Spezies sind in der humanen Darmflora vertreten und sorgen hier für die Reduktion nitroaromatischer Verbindungen (Méndez-Vilas, 2010).

5.1.3 Zielsetzung

Die Reduktion einer Vielzahl an *N*-hydroxylierten Verbindungen etwa aus den Stoffklassen der Amidoxime, *N*-Hydroxyguanidine, Hydroxamsäuren, Oxime und Hydroxylamine unter aeroben Bedingungen durch das mARC-Enzymsystem ist bereits charakterisiert und beschrieben (Froiep, 2013; Ott *et al.*, 2014b), ebenso wie die Bildung von NO bei anaerober Inkubation von Nitrit mit dem mARC-Enzymsystem (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Die Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs durch das mARC-Enzymsystem ist bekannt und allgemein akzeptiert, ebenso wie die Beteiligung des mARC-Enzymsystems an der Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basenanaloge (Have-meyer *et al.*, 2011; Krompholz *et al.*, 2012). Die weitere physiologische Bedeutung von mARC ist hingegen noch weitestgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das mARC-Enzymsystem an der Reduktion aromatischer Nitro- und Nitrosoverbindungen unter aeroben Bedingungen beteiligt ist. Aufgrund der Toxizität von Verbindungen dieser Stoffklassen könnte eine mARC-abhängige Reduktion Hinweise auf weitere physiologische Funktionen des Enzymsystems liefern. Außerdem müsste diskutiert werden, mARC bei Biotransformationsstudien zur Aufklärung der Metabolisierung von Arzneistoffen, welche Nitrogruppen beinhalten, einzuschließen.

Die Reduktion der Nitrogruppe führt über die Zwischenstufen der entsprechenden Nitroso- und Hydroxylaminverbindungen letztlich bis zum Amin (s. Abbildung 5.3).

Um zu untersuchen, ob Nitrogruppen mARC-abhängig reduziert werden, sollten 4-Nitrobenzamidoxim, 4-Nitrobenzamidin und Nitrobenzol eingesetzt werden (s. Abbildung 5.4). Als Beispielsubstrat für Nitrosogruppen wurde 4-Nitrosophenol gewählt, da hier, anders als für Nitrosobenzol, keine rein chemische Reduktion der Nitrosogruppe durch das im Inkubationsansatz enthaltene NADH zu erwarten war (Bernheim,

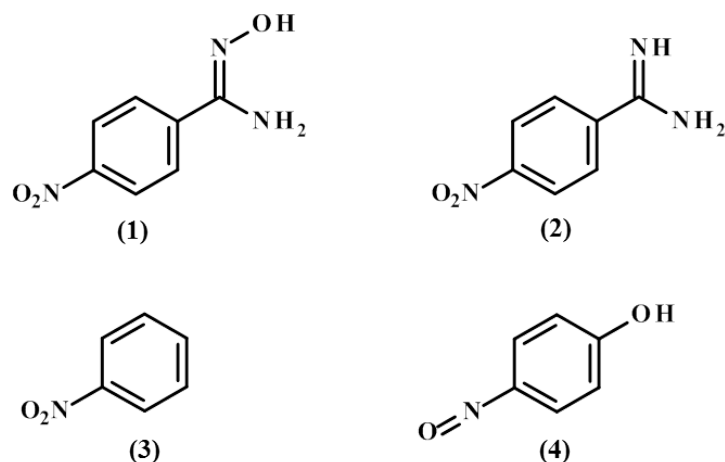


Abbildung 5.4: Übersicht der untersuchten Nitro- und Nitrosoverbindungen

(1) 4-Nitrobenzamidoxim, (2) 4-Nitrobenzamidin, (3) Nitrobenzol, (4) 4-Nitrosophenol

1972). Von Maskos und Winston (1994) wurde 1,4-Benzochinon als mögliches Zwischenprodukt der Reduktion von 4-Nitrosophenol zu 4-Aminophenol beschrieben. Da diese Verbindung kommerziell erhältlich und somit leicht verfügbar war, sollte zur Auswertung der *in vitro* Biotransformationsstudien an 4-Nitrosophenol eine HPLC-Methode entwickelt werden, welche nicht nur die Trennung von 4-Nitrosophenol und 4-Aminophenol, sondern auch von 1,4-Benzochinon ermöglicht.

5.2 Methoden

5.2.1 Materialien und Geräte

Die Synthese von 4-Nitrobenzamidoxim und 4-Nitrobenzamidin erfolgte im Arbeitskreis bereits für frühere Studien (s. Kapitel 2). 4-Aminobenzamidoxim wurde freundlicherweise von Dr. Lehmann (Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Berlin) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Nitro- und Nitrosoverbindungen sowie deren Metabolite, die in diesem Kapitel aufgeführt sind, waren kommerziell verfügbar und sind ebenso wie alle übrigen Materialien und Geräte in Kapitel 7 dieser Arbeit zusammengefasst.

5.2.2 Proteinquellen

Alle Biotransformationsstudien dieser Arbeit wurden mit einheitlichen Chargen an rekombinanten Proteinen bzw. Subfraktionen der Schweineleber durchgeführt, deren Gewinnung und Charakterisierung in Kapitel 2.2.2 beschrieben wurde.

5.2.3 HPLC-Analytik

5.2.3.1 Trennung von 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin

Zur Trennung von 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin wurde folgende Gradientenmethode entwickelt:

Pumpe	Waters 616 Pump
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Integrator	EZChrom Elite, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, United States)
Stationäre Phase	Symmetry max RP, 4 μm , 4,6 \times 250 mm (Phenomenex, Torrance, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	(A) 10 mM Natriumoctylsulfonat, 20 mM KH_2PO_4 , pH 3,0/ Acetonitril 85:15 (v/v) (B) Acetonitril
Flussrate	1,0 ml/min
Gradient	0-23 min: 100 % A 28 min: 90 % A, 10 % B 35 min: 90 % A, 10 % B 37-45 min: 100 % A
Laufzeit	45 min
Detektion	299 nm
Injektionsvolumen	10 μl
Retentionszeiten	17,6 \pm 0,2 min (4-Aminobenzamidoxim) 21,1 \pm 0,5 min (4-Aminobenzamidin) 33,2 \pm 0,2 min (4-Nitrobenzamidoxim) 36,9 \pm 0,3 min (4-Nitrobenzamidin)

Zur Herstellung des Fließmittels wurde der wässrige Anteil durch einen Polyamidmembranfilter (0,45 μm , Sartorius AG, Göttingen) filtriert, bevor der organische Anteil (HPLC-Grade) zugegeben und das Gemisch für 15 min im Ultraschallbad entgast wurde.

5.2.3.2 Detektion von 4-Aminobenzamidoxim und -amidin

Folgende Lösungen wurden hergestellt und mit der unter 5.2.3.1 beschriebenen Methode per HPLC analysiert:

- 0; 0,5; 1 und 5 μM 4-Aminobenzamidin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0
- 0; 0,5; 1 und 5 μM 4-Aminobenzamidoxim in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit DMSO in unterschiedlichen Anteilen

Zur Herstellung der 4-Aminobenzamidoximlösungen wurde eine 10 mM Stammlösung in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 25 % DMSO (v/v) angesetzt und mit reiner Pufferlösung verdünnt.

5.2.3.3 Trennung von Nitrobenzol, Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin

Zur Trennung von Nitrobenzol, Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin wurde folgende Gradientenmethode entwickelt:

Pumpe	Waters 616 Pump
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Integrator	EZChrom Elite, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, United States)
Stationäre Phase	Nova Pak C18, 4 μm , 3,9 \times 300 mm (Waters, Milford, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	(A) 50 mM Ammoniumacetat, pH 7,0/Acetonitril 85:15 (v/v) (B) Acetonitril
Flussrate	0,8 ml/min
Gradient	0-4 min: 90 % A, 10 % B 9-20 min: 80 % A, 20 % B 22-30 min: 90 % A, 10 % B
Laufzeit	30 min
Detektion	254 nm
Injektionsvolumen	10 μl
Retentionszeiten	5,4 \pm 0,6 min (<i>N</i> -Phenylhydroxylamin) 8,7 \pm 0,1 min (Anilin) 24,1 \pm 0,1 min (Nitrobenzol) 27,8 \pm 0,2 min (Nitrosobenzol)

Der wässrige Anteil des Fließmittels wurde durch einen Polyamidmembranfilter (0,45 μm , Sartorius AG, Göttingen) filtriert, bevor der organische Anteil (HPLC-Grade) zugegeben und das Gemisch für 15 min im Ultraschallbad entgast wurde.

5.2.3.4 Detektion von Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin

Es wurden 10 mM Stammlösungen von Nitrosobenzol und *N*-Phenylhydroxylamin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 25 % DMSO (v/v) hergestellt. Diese wurden mit Puffer auf Konzentrationen von 0,5; 1 und 5 μM verdünnt und ebenso wie eine reine Pufferlösung mit der unter 5.2.3.3 beschriebenen Methode per HPLC vermessen.

Eine 50 mM Stammlösung von Anilin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) wurde mit Puffer auf Konzentrationen von 0,5; 1 und 5 μM verdünnt. Diese Lösungen sowie eine reine Pufferlösung wurden anschließend in die HPLC injiziert.

5.2.3.5 Trennung von 4-Nitrosophenol, 1,4-Benzochinon und 4-Aminophenol

Folgende HPLC-Methode wurde zur Trennung von 4-Nitrosophenol, 1,4-Benzochinon und 4-Aminophenol entwickelt:

Pumpe	Waters 616 Pump
Detektor	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Integrator	EZChrom Elite, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, United States)
Stationäre Phase	Symmetry max RP, 4 μm , 4,6 \times 250 mm (Phenomenex, Torrance, United States) Vorsäule: C18, 3 \times 4 mm (Phenomenex, Torrance, United States)
Mobile Phase	10 mM Natriumoctylsulfonat, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 3,5/ Acetonitril 90:10 (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	40 min
Detektion	229 nm
Injektionsvolumen	10 μl
Retentionszeiten	10,9 \pm 0,4 min (1,4-Benzochinon) 18,4 \pm 0,2 min (4-Nitrosophenol) 29,9 \pm 0,4 min (4-Aminophenol)

Der wässrige Anteil des Fließmittels wurde durch einen Polyamidmembranfilter (0,45 μm , Sartorius AG, Göttingen) filtriert, bevor der organische Anteil (HPLC-Grade) zugegeben und das Gemisch für 15 min im Ultraschallbad entgast wurde.

5.2.4 Stabilitäten

5.2.4.1 Untersuchungen an 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin

Die Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen erfolgte wie unter 2.2.4.2 beschrieben.

5.2.4.2 Untersuchungen an Nitrobenzol, Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin

Zur Überprüfung der Stabilität der Verbindungen unter Inkubationsbedingungen wurden diese in einer Konzentration von 500 μM in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 3 % DMSO (v/v) gelöst. Die erste Probe wurde jeweils sofort nach der Herstellung per HPLC vermessen. Die übrigen Proben wurden 30, 60 bzw. 120 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend in die HPLC injiziert.

Zur Überprüfung der Stabilität der Verbindungen bei Raumtemperatur wurden jeweils 500 μM Lösungen in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) hergestellt, im Autosampler der HPLC inkubiert und nach 0, 1, 2, 3 und 24 Stunden mit der unter 5.2.3.3 beschriebenen Methode vermessen.

5.2.4.3 Untersuchungen an 4-Nitrosophenol und 4-Aminophenol

Zur Überprüfung der Stabilität von 4-Nitrosophenol unter Inkubationsbedingungen wurde eine 3 mM Lösung in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 mit 5 % DMSO (v/v) angesetzt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 0, 30, 60 und 90 min wurden die Proben im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Methanol versetzt, geschüttelt und mittels der unter 5.2.3.5 angegebenen Methode per HPLC vermessen.

Zur Überprüfung der Stabilität der Verbindungen bei Raumtemperatur wurden zwei Ansätze 3 mM 4-Nitrosophenol sowie ein Ansatz 25 μM 4-Aminophenol in 20 mM MES-Puffer pH 6,0/Methanol 1:1 (v/v) hergestellt und bei Raumtemperatur im Autosampler der HPLC inkubiert. Nach 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Stunden wurden die Proben mit der unter 5.2.3.5 beschriebenen HPLC-Methode vermessen.

5.2.4.4 Untersuchungen an 4-Nitrosophenol in An- und Abwesenheit von NADH

Zwei Ansätze mit je 3 mM 4-Nitrosophenol in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 mit 5 % DMSO (v/v) wurden für 3 min bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert. Einem Ansatz wurde 1 mM NADH zugegeben, dem anderen Ansatz das entsprechende Volumen Pufferlösung, so dass beide Proben ein Gesamtvolumen von 150 μl aufwiesen. Nach 15 min Inkubation wurden jeweils 150 μl Methanol zugegeben, die Proben geschüttelt und per HPLC vermessen.

5.2.5 Zusammensetzung der *in vitro* Biotransformationsansätze

Das jeweilige Substrat wurde in einer Konzentration von 3 mM in Puffer gemeinsam mit dem Protein über 3 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und nach 15 Minuten durch Hinzufügen von 75 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt. Das Inkubationsvolumen betrug 75 µl. Jeder Ansatz enthielt 5 % DMSO (v/v).

Bei Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion als Enzymquelle wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 gearbeitet, jeder Ansatz enthielt 2,5 µg Protein. Inkubationen mit den rekombinanten Proteinen wurden in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 durchgeführt, wobei jeder Ansatz 3,75 µg Protein mARC1 bzw. mARC 2, 37,5 pmol Häm (Cytochrom b₅) und 3,75 pmol FAD (Cytochrom b₅ Reduktase) enthielt. Bei jedem Versuch wurde neben dem zu untersuchenden Substrat zusätzlich Benzamidoxim unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Als Kontrollen dienten Inkubationsansätze ohne Protein bzw. ohne NADH.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 HPLC-Analytik

5.3.1.1 Detektion von 4-Aminobenzamidoxim und -amidin

An 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sollte untersucht werden, ob die Nitrogruppe mARC-abhängig bis zur Aminogruppe reduziert wird. Daher wurde zunächst geprüft, ab welcher Konzentration die potentiellen Amino-Metabolite per HPLC-Analytik detektiert werden können. Sowohl 4-Aminobenzamidoxim als auch 4-Aminobenzamidin lieferten in den getesteten Konzentrationen von 0,5; 1 und 5 µM gut auswertbare Signale, wobei ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalfläche gegeben war (s. Abbildung 5.5). Repräsentative Chromatogramme beider Verbindungen sind in Abbildung 5.6 gezeigt.

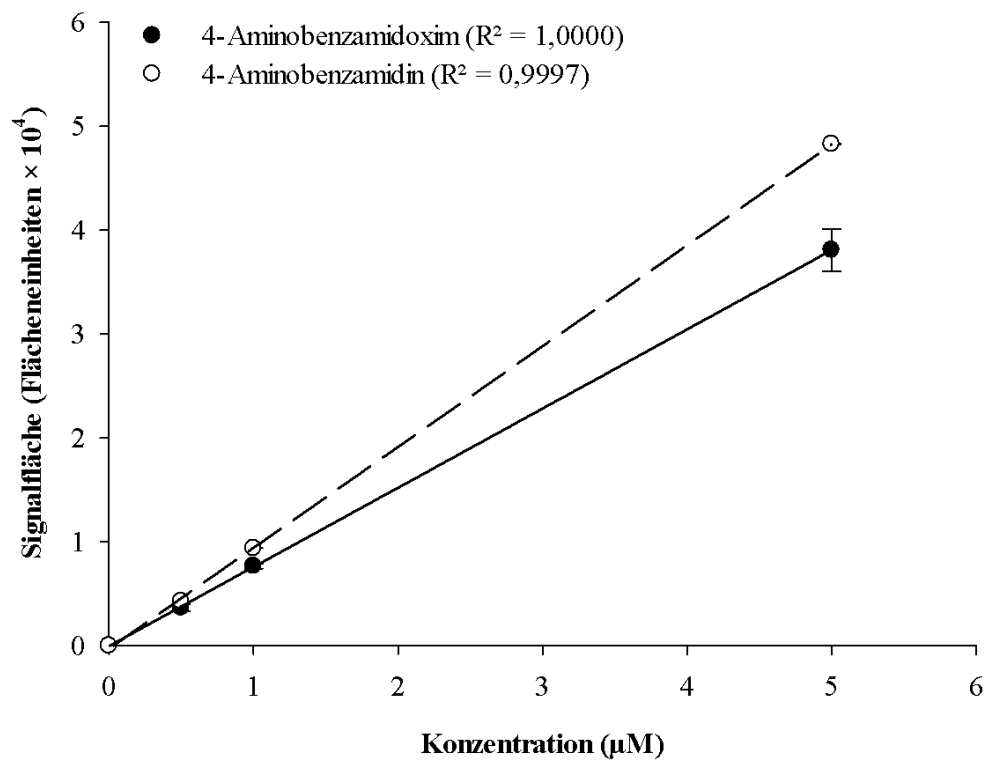


Abbildung 5.5: Detektion von 4-Aminobenzamidoxim und 4-Aminobenzamidin

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei verschiedenen Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

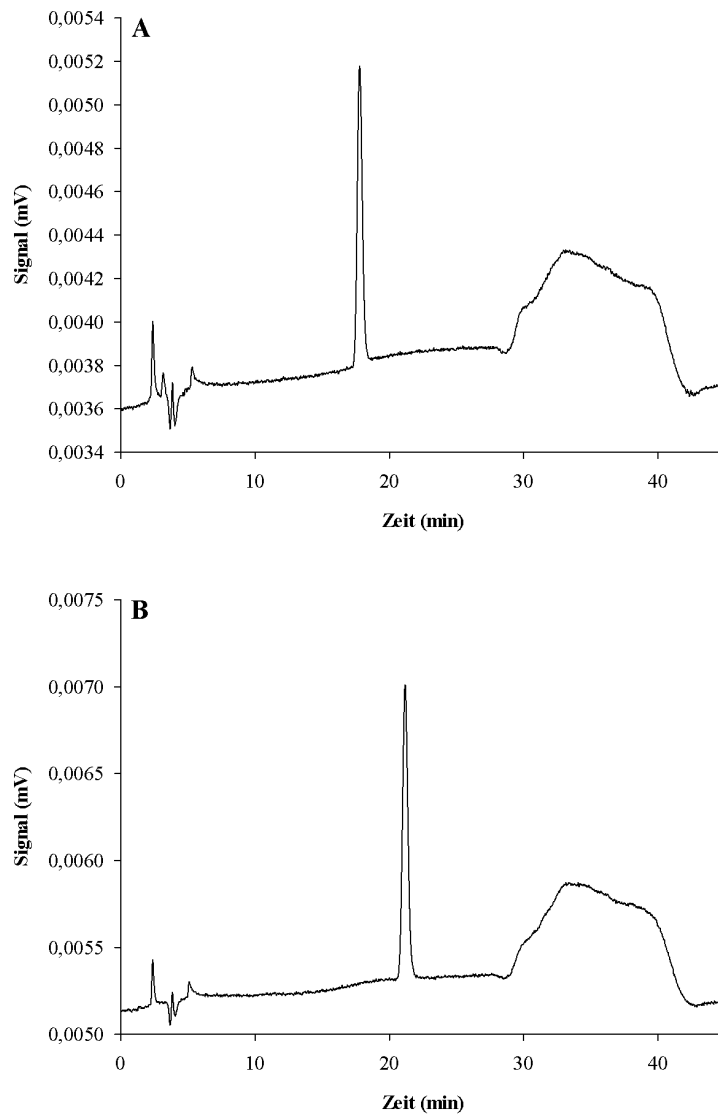


Abbildung 5.6: Repräsentatives Chromatogramm von 4-Aminobenzamidoxim (A) und 4-Aminobenzamidin (B)

5 μ M Lösungen wurden mit der unter 5.2.3.1 beschriebenen Methode vermessen.

Analyt	Konzentration (μM)	Signalfläche (Flächeneinheiten)
Anilin	1	$935 \pm 70^{[a]}$
Anilin	5	$4899 \pm 115^{[a]}$
<i>N</i> -Phenylhydroxylamin	5	$1142 \pm 395^{[b]}$
Nitrosobenzol	5	$1706 \pm 119^{[b]}$

Tabelle 5.1: Detektion von Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin per HPLC-Analytik

[a] Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei Parallelansätzen, die doppelt mittels der unter 5.2.3.3 beschriebenen HPLC-Methode vermessen wurden, [b] Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten, jeder Ansatz wurde einfach vermessen.

5.3.1.2 Detektion von Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin

Um zu testen, ab welcher Konzentration die potentiellen Metabolite einer mARC-katalysierten Reduktion von Nitrobenzol auswertbare Signale im Chromatogramm liefern, wurden entsprechende Lösungen der Konzentration 0,5; 1 und 5 μM per HPLC analysiert.

Anilin konnte ab einer Konzentration von 1 μM detektiert werden, Nitrosobenzol und *N*-Phenylhydroxylamin erst ab einer Konzentration von 5 μM . Eine Übersicht der detektierten Signale liefert Tabelle 5.1.

Die repräsentativen Chromatogramme in Abbildung 5.7 verdeutlichen, dass insbesondere *N*-Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol nur schwache Signale lieferten, wobei die Detektion zusätzlich durch den Einfluss des Gradienten auf die Basislinie erschwert wurde. Des Weiteren ist die Instabilität bzw. Oxidationsempfindlichkeit von *N*-Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol zu erkennen, da zusätzlich Nitrosobenzol bzw. Nitrobenzol detektiert wurden (s. B und C in Abbildung 5.7).

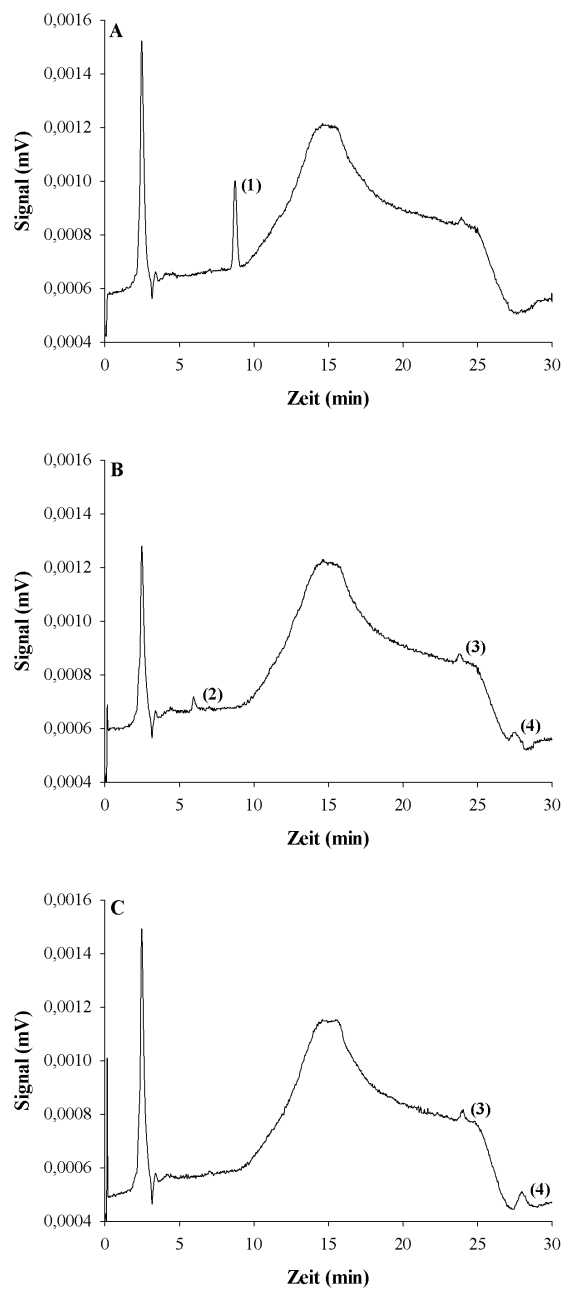


Abbildung 5.7: Repräsentative Chromatogramme von Anilin (A), *N*-Phenylhydroxylamin (B) und Nitrosobenzol (C)

5 μM Lösungen wurden mit der unter 5.2.3.3 beschriebenen Methode vermessen. (1) Anilin, (2) *N*-Phenylhydroxylamin, (3) Nitrobenzol, (4) Nitrosobenzol

5.3.2 Stabilitäten

5.3.2.1 Untersuchungen an 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen an 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sowie 4-Aminobenzamidoxim und -amidin sind in Kapitel 2.3.3.2 dargestellt.

5.3.2.2 Untersuchungen an Nitrobenzol, Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin

Da alle Biotransformationsstudien bei 37 °C durchgeführt werden sollten, wurde zunächst die Stabilität der Verbindungen bei dieser Temperatur überprüft (s. Abbildung 5.8).

Nitrobenzol und Anilin waren über die gesamte Versuchsdauer stabil, auch nach 120 min bei 37 °C waren noch etwa 98 % bezogen auf die Ausgangskonzentration nachweisbar. Nitrosobenzol zeigte deutlich geringere Stabilität, nach 120 min lagen nur noch 46 % bezogen auf den Ausgangswert vor. Jedoch waren nach 30 min noch 99 % und nach 60 min 82 % Nitrosobenzol vorhanden, so dass Versuche bei 37 °C hinsichtlich der Stabilität bis zu einer Inkubationszeit von 30 min unproblematisch sind. *N*-Phenylhydroxylamin zeigte deutliche Instabilität. Nach 30 min wurden noch 83 % bezogen auf die Ausgangskonzentration, nach 60 min 44 % und nach 120 min lediglich noch 13 % detektiert. Somit muss bei Versuchen mit *N*-Phenylhydroxylamin, die unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt werden, die geringe Stabilität berücksichtigt werden.

Die Auswertung der geplanten Biotransformationsstudien sollte per HPLC erfolgen. Die Laufzeit der entwickelten HPLC-Methode beträgt 30 min (s. Kapitel 5.2.3.3). Da die verwendete HPLC-Anlage über keine Möglichkeit zur Temperierung der Proben verfügte, standen die Proben während der Analyse bei Raumtemperatur im Autosampler und eine ausreichende Stabilität war somit erforderlich (s. Abbildung 5.9).

Anilin zeigte die höchste Stabilität, nach 24 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler wurden 104 % bezogen auf die Ausgangskonzentration detektiert. Im Falle von Nitrobenzol lagen nach 3 Stunden zwar noch 97 % vor, nach 24 Stunden jedoch nur noch 73 %. Für Nitrosobenzol konnten nach 3 Stunden noch 91 %, nach 24 Stunden jedoch nur noch 21 % bezogen auf den Ausgangswert nachgewiesen werden. Die geringste Stabilität zeigte *N*-Phenylhydroxylamin. Nach einer Stunde lagen noch 89 %, nach 3 Stunden lediglich noch 52 % vor. Nach 24 Stunden wurde kein *N*-Phenylhydroxylamin mehr detektiert.

Ziel der Biotransformationsstudien war es, zu untersuchen, ob Nitrobenzol mARC-abhängig über die Zwischenstufen Nitrosobenzol und *N*-Phenylhydroxylamin bis zum Anilin reduziert wird. Anilin zeigte weder bei 37 °C noch bei Raumtemperatur Anzeichen der Instabilität, während der Gehalt an Nitrosobenzol und insbesondere an *N*-Phenylhydroxylamin bei beiden Temperaturen im Laufe der Zeit stark abnahm. Zur Beantwortung der Frage, ob Nitrobenzol durch mARC reduziert wird, sollte die

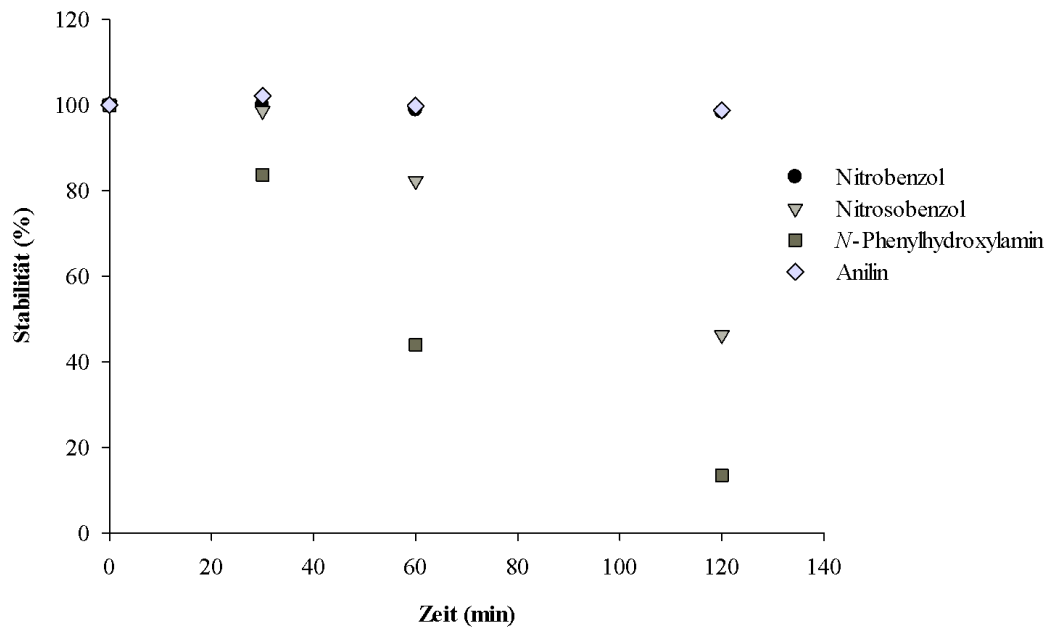


Abbildung 5.8: Stabilitäten von Nitrobenzol, Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin bei 37 °C

Die Zusammensetzung der Lösungen sowie die Versuchsdurchführung ist unter 5.2.4.2 beschrieben. Dargestellt sind Einzelwerte aus je einem Ansatz.

Bildung von Nitrosobenzol und *N*-Phenylhydroxylamin somit eher für eine qualitative Aussage genutzt werden, wohingegen der stabile Metabolit Anilin sich zur Quantifizierung anbietet.

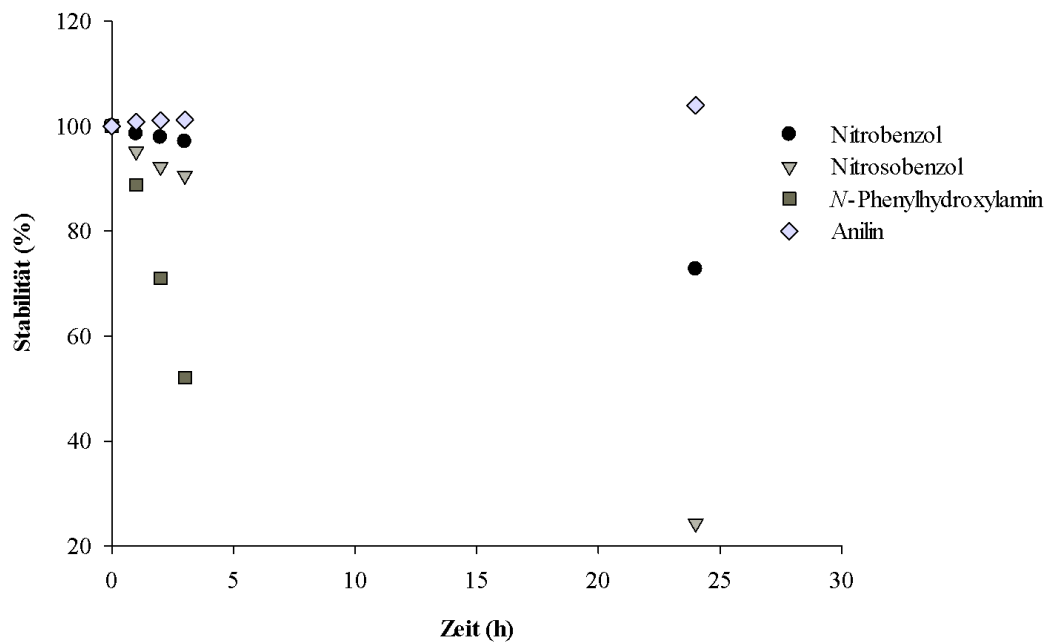


Abbildung 5.9: Stabilitäten von Nitrobenzol, Nitrosobenzol, *N*-Phenylhydroxylamin und Anilin bei Raumtemperatur

Die Zusammensetzung der Lösungen und die Versuchsdurchführung ist unter 5.2.4.2 beschrieben. Dargestellt sind Einzelwerte aus je einem Ansatz, der zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen wurde. *N*-Phenylhydroxylamin war nach 24 Stunden nicht mehr detektierbar.

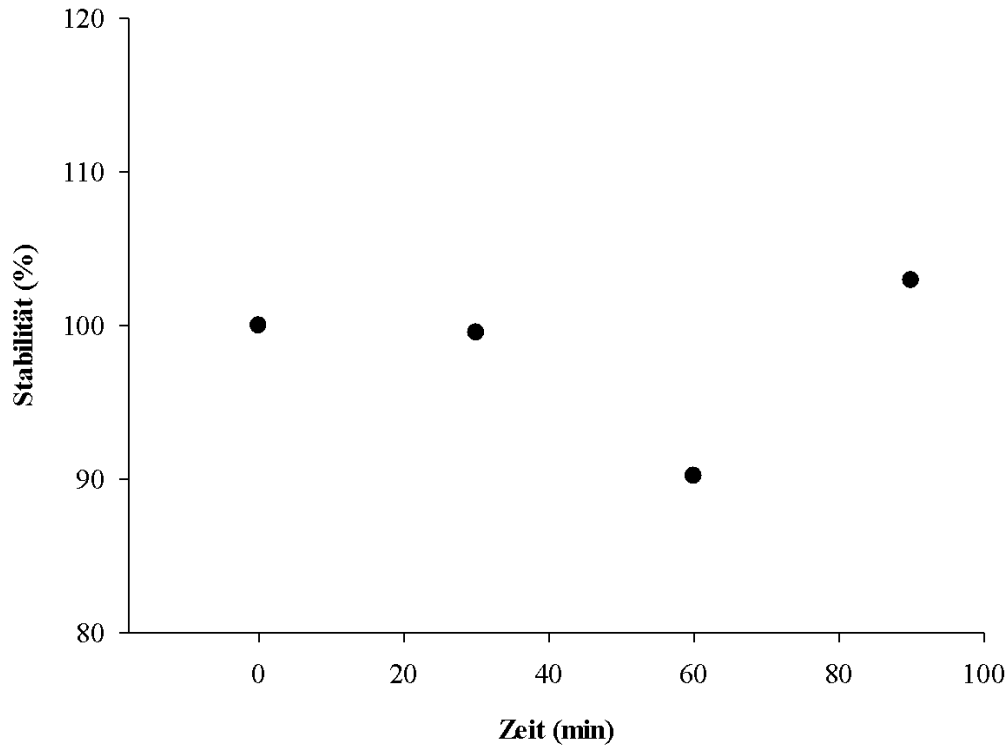


Abbildung 5.10: Stabilität von 4-Nitrosophenol unter Inkubationsbedingungen

Die Zusammensetzung der Lösung und die Versuchsdurchführung ist unter 5.2.4.3 beschrieben. Dargestellt sind Einzelwerte aus einem Ansatz.

5.3.2.3 Untersuchungen an 4-Nitrosophenol und 4-Aminophenol

Um zu überprüfen, ob 4-Nitrosophenol ausreichende Stabilität für Biotransformationsstudien bei 37 °C aufweist, wurde zunächst das Verhalten bei 37 °C im Wasserbad untersucht. Anschließend wurde getestet, ob 4-Nitrosophenol und 4-Aminophenol bei Raumtemperatur im Autosampler stabil genug sind, um in späteren Studien per HPLC-Analytik vermessen zu werden. Die Abbildungen 5.10 und 5.11 zeigen, dass die Stabilität beider Verbindungen bei Raumtemperatur sowie von 4-Nitrosophenol unter Inkubationsbedingungen gegeben war.

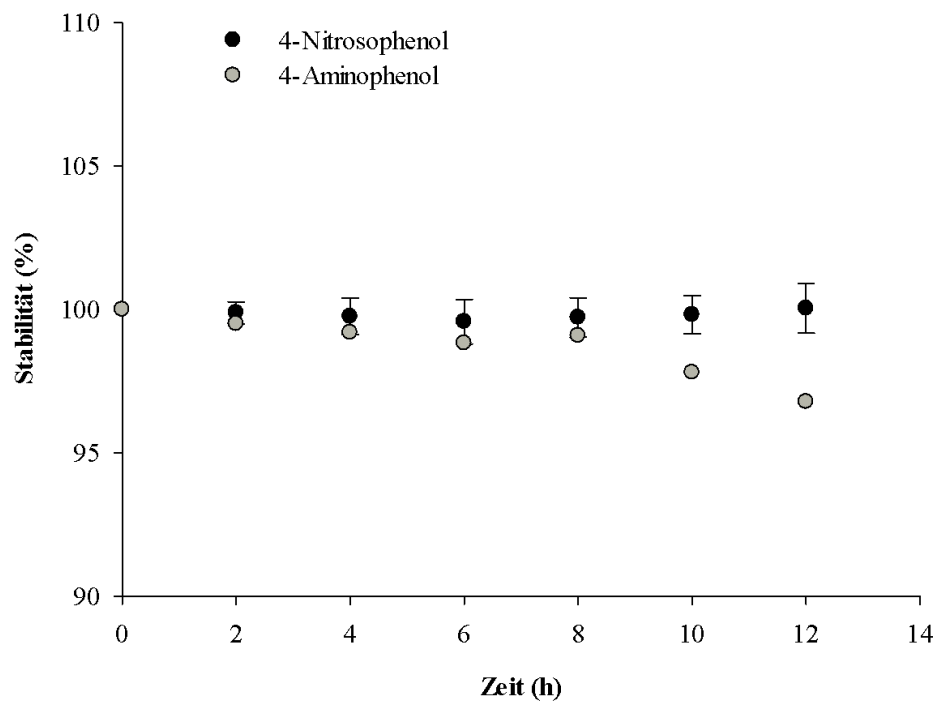


Abbildung 5.11: Stabilitäten von 4-Nitrosophenol und 4-Aminophenol bei Raumtemperatur

Die Zusammensetzung der Lösungen und die Versuchsdurchführung ist unter 5.2.4.3 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Ansätzen (4-Nitrosophenol) bzw. Einzelwerte aus nur einem Ansatz (4-Aminophenol).

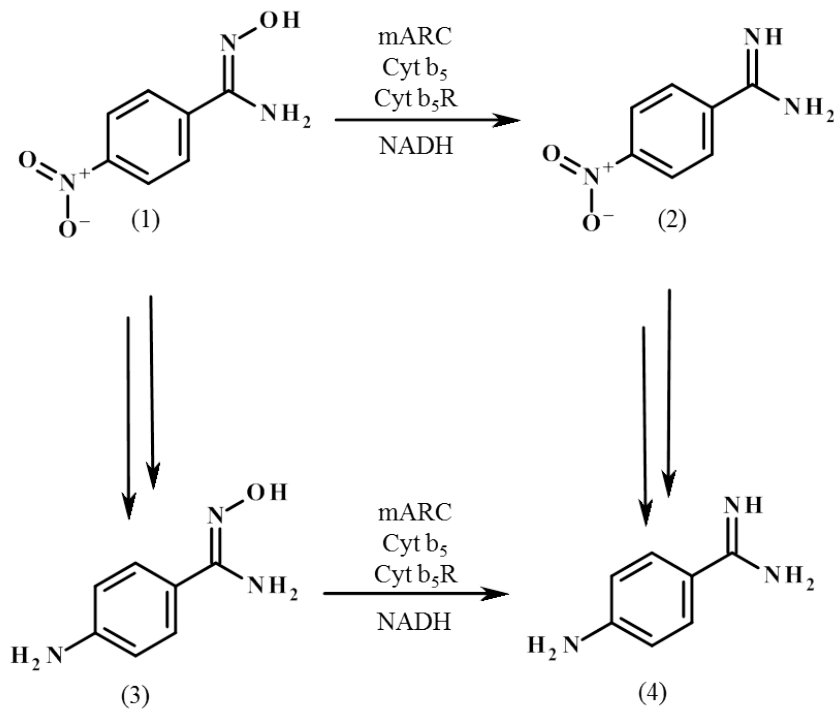


Abbildung 5.12: Reduktion von 4-Nitrobenzamidoxim an Nitro- und Amidoximfunktion

(1) 4-Nitrobenzamidoxim, (2) 4-Nitrobenzamidin, (3) 4-Aminobenzamidoxim, (4) 4-Aminobenzamidin

5.3.3 *In vitro* Biotransformationsstudien

5.3.3.1 Testung von 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin

Die mARC-abhängige Reduktion von 4-Nitrobenzamidoxim zu 4-Nitrobenzamidin wurde bereits in Kapitel 2 charakterisiert und beschrieben. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob neben der Amidoxim- auch die Nitrofunktion des 4-Nitrobenzamidoxims bzw. -amidins reduziert wird. Abbildung 5.12 zeigt eine Übersicht möglicher Biotransformationsschritte.

Per HPLC-Analytik sollte getestet werden, ob die Inkubation von 4-Nitrobenzamidoxim mit dem mARC-Enzymsystem neben 4-Nitrobenzamidin auch 4-Aminobenzamidoxim bzw. 4-Aminobenzamidin liefert. Zur Absicherung des Ergebnisses wurden auch mit 4-Nitrobenzamidin Biotransformationsstudien durchgeführt und die Ansätze per HPLC auf 4-Aminobenzamidin untersucht.

Inkubationsansatz	4-Nitrobenzamidin ^[a]	Benzamidin ^[a]
mARC1	5,8 ± 1,7	59,7 ± 5,6
mARC2	49,6 ± 5,4	160,5 ± 35,8
OMV	154,0 ± 17,6	160,8 ± 23,5
Ohne Protein	ND	-

Tabelle 5.2: Inkubation von 4-Nitrobenzamidoxim und Kontrollinkubation von Benzamidoxim

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei Versuchen. Jeder Versuch bestand aus zwei Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist unter 5.2.5 beschrieben. Die Quantifizierung des 4-Nitrobenzamidins erfolgte über einen 10 µM Standard. ND = nicht detektierbar, - = nicht bestimmt, [a] (nmol/(min × mg Protein))

5.3.3.1.1 Inkubationen mit 4-Nitrobenzamidoxim

4-Nitrobenzamidoxim wurde sowohl mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion als auch den rekombinanten Proteinen mARC1 bzw. mARC2, Cytochrom b₅ und Cytochrom b₅ Reduktase inkubiert. Es wurde jeweils 4-Nitrobenzamidin, aber weder 4-Aminobenzamidoxim noch 4-Aminobenzamidin detektiert.

Exemplarisch sind die Chromatogramme eines Inkubationsansatzes mit äußerer mitochondrialer Membranfraktion sowie eines Kontrollansatzes ohne Protein gezeigt (s. Abbildung 5.13). Die Bildung von 4-Nitrobenzamidin und die zur Kontrolle im gleichen Versuchsansatz durchgeführte Inkubation von Benzamidoxim, welche Benzamidin lieferte, belegen, dass die verwendeten Proteine aktiv waren (s. Tabelle 5.2).

Somit konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten aeroben Versuchsbedingungen und unter Berücksichtigung der unter 5.3.1.1 bestimmten Detektionsgrenzen der HPLC-Analytik keine Reduktion der Nitrogruppe von 4-Nitrobenzamidoxim durch das mARC-Enzymsystem stattfindet.

5.3.3.1.2 Inkubationen mit 4-Nitrobenzamidin

4-Nitrobenzamidin wurde exemplarisch unter Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion als Enzymquelle untersucht. Per HPLC konnte in keinem der Inkubationsansätze 4-Aminobenzamidin detektiert werden (s. Abbildung 5.14). Die Kontrollinkubation von Benzamidoxim mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion belegte, dass die verwendete Enzymcharge funktionsfähig war (182,1 ± 19,9 nmol Benzamidin/(min × mg Protein), Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen, wobei jeder Versuch aus zwei Parallelansätzen bestand, die doppelt vermessen wurden). Somit konnte dargestellt werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Reduktion der Nitrogruppe des 4-Nitrobenzamidins abläuft.

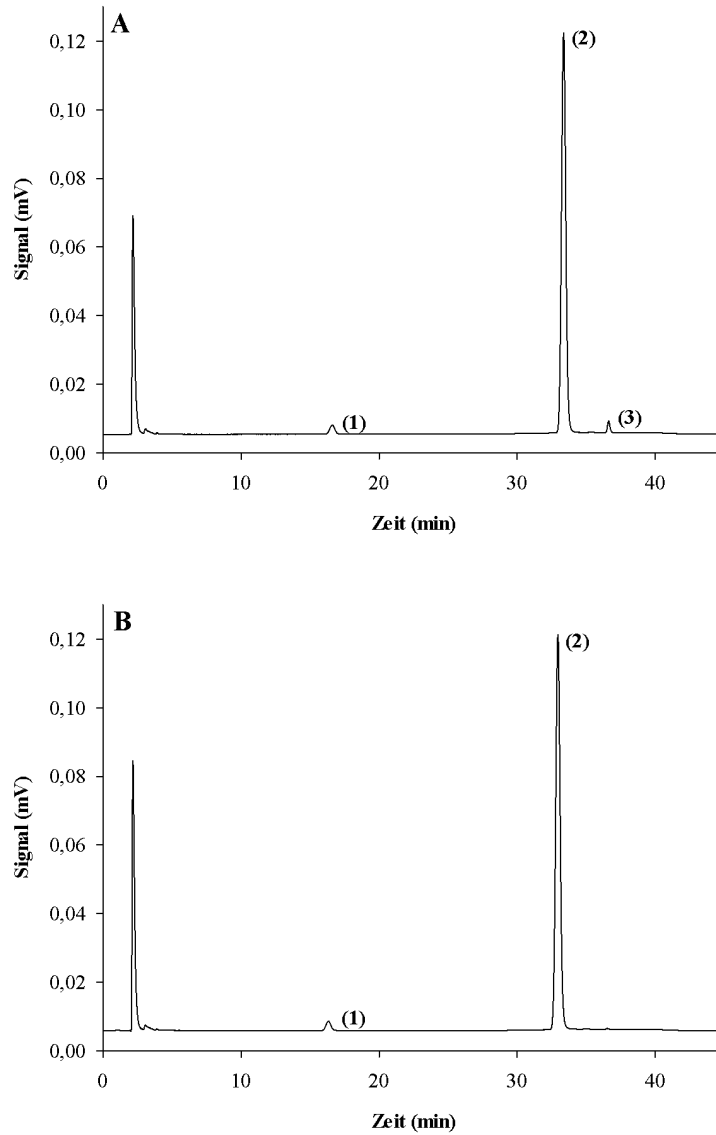


Abbildung 5.13: Repräsentatives Chromatogramm der Inkubation von 4-Nitrobenzamidoxim mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion (A) bzw. des Kontrollansatzes ohne Protein (B)

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist unter 5.2.5 beschrieben. Die Parameter der HPLC-Methode sind unter 5.2.3.1 angegeben. (1) Nicht näher charakterisierte Verunreinigung aus 4-Nitrobenzamidoxim, (2) 4-Nitrobenzamidoxim, (3) 4-Nitrobenzamidin

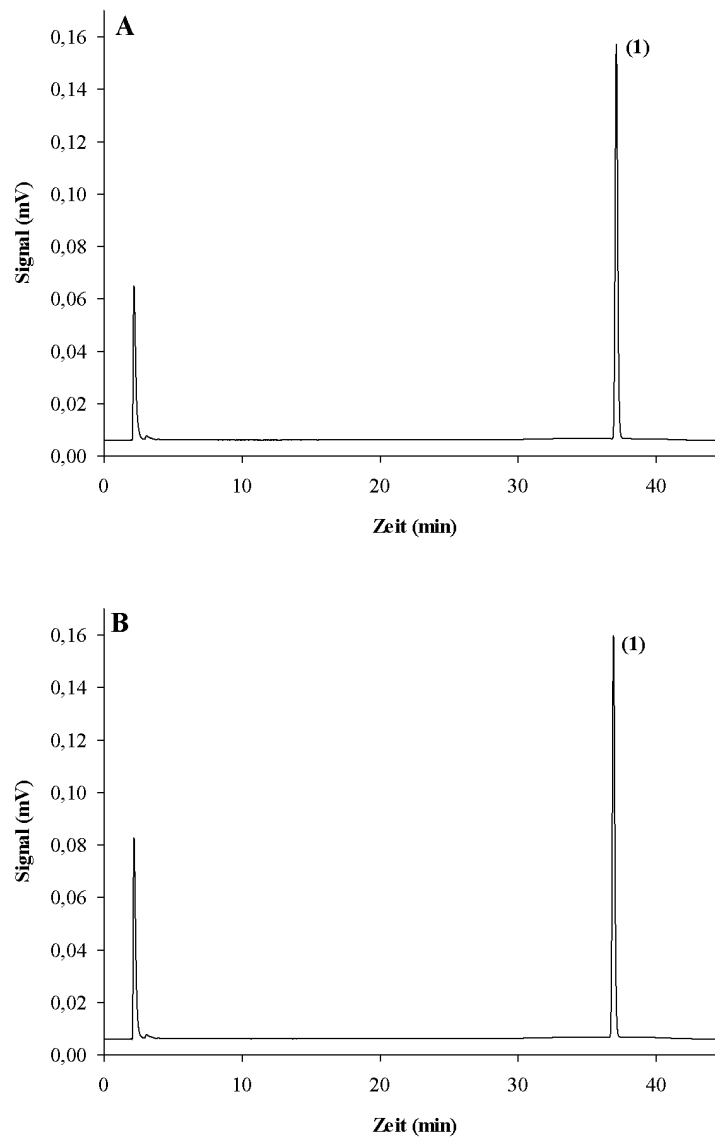


Abbildung 5.14: Repräsentatives Chromatogramm der Inkubation von 4-Nitrobenzamidin mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion (A) bzw. des Kontrollansatzes ohne Protein (B)

Die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes ist unter 5.2.5 beschrieben. Die Parameter der HPLC-Methode sind unter 5.2.3.1 angegeben. (1) 4-Nitrobenzamidin

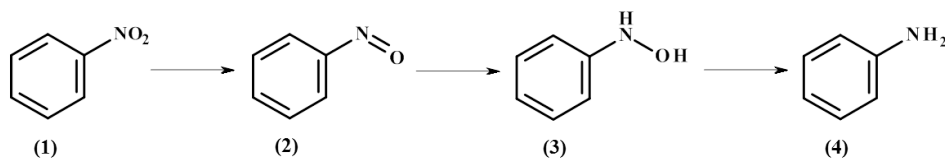


Abbildung 5.15: Reduktion von Nitrobenzol

(1) Nitrobenzol, (2) Nitrosobenzol, (3) *N*-Phenylhydroxylamin, (4) Anilin

Inkubationsansatz	Benzamidin ^[a]
mARC1	136, 8 ± 1, 0
mARC2	272, 9 ± 16, 3
OMV	203, 4 ± 4, 1

Tabelle 5.3: Benzamidoxim-Kontrollen aus der Inkubation von Nitrobenzol

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei Parallelansätzen, die doppelt vermessen wurden. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist unter 5.2.5 beschrieben.

[a] (nmol/(min × mg Protein))

5.3.3.2 Testung von Nitrobenzol

Neben 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin sollte auch am einfachsten Nitroaromaten, dem Nitrobenzol, untersucht werden, ob eine mARC-katalysierte Reduktion der Nitrogruppe erfolgt. Diese Verbindung wurde gewählt, da mit Nitrosobenzol und *N*-Phenylhydroxylamin auch die Zwischenstufen einer möglichen Reduktion bis zum Anilin kommerziell erhältlich und somit verfügbar waren (s. Abbildung 5.15).

Weder bei Inkubation von Nitrobenzol mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion noch mit dem mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystem konnte mittels HPLC Anilin oder eine der Zwischenstufen, Nitrosobenzol bzw. *N*-Phenylhydroxylamin, detektiert werden (s. Abbildung 5.16). Die Ansätze der Kontrollinkubationen mit Benzamidoxim lieferten sowohl für die äußere mitochondriale Membranfraktion als auch die rekombinanten Proteine Benzamidin (s. Tabelle 5.3). Alle verwendeten Enzymquellen waren somit funktionsfähig. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen keine mARC-katalysierte Reduktion von Nitrobenzol abläuft.

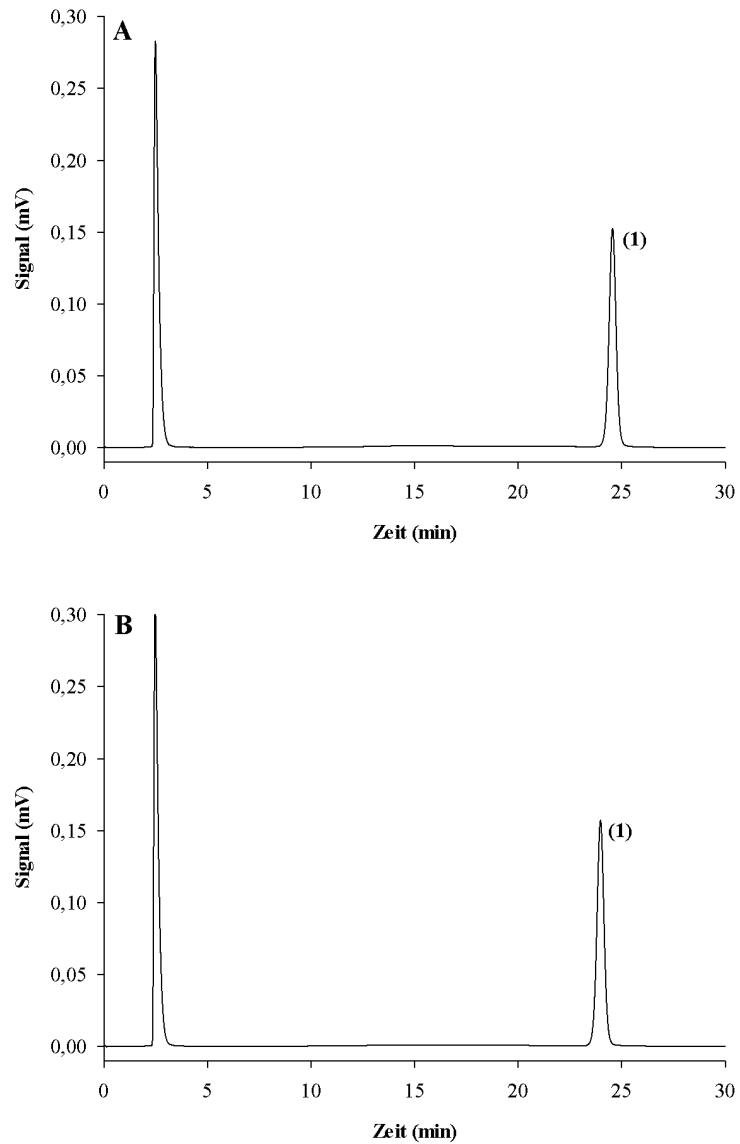


Abbildung 5.16: Repräsentatives Chromatogramm der Inkubation von Nitrobenzol mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion (A) bzw. des Kontrollansatzes ohne Protein (B)

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist unter 5.2.5 beschrieben. Die Parameter der HPLC-Methode sind unter 5.2.3.3 angegeben. (1) Nitrobenzol

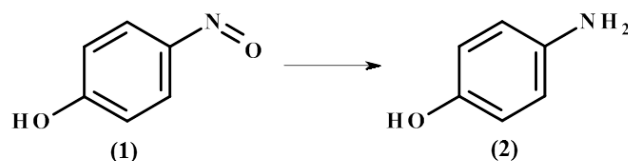


Abbildung 5.17: Reduktion von 4-Nitrosophenol

(1) 4-Nitrosophenol, (2) 4-Aminophenol

Inkubationsansatz	Signalfläche ^[a]	Konzentration ^[b]
OMV	94929 ± 2682	276 ± 8
mARC1	94168 ± 5489	274 ± 16
mARC2	90758 ± 7932	264 ± 23
Ohne Protein	85845 ± 3012	249 ± 9
Ohne NADH mit OMV	ND	ND

Tabelle 5.4: Inkubation von 4-Nitrosophenol mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion sowie dem mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystem

Die Inkubationsbedingungen sind in Kapitel 5.2.5 beschrieben. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei Parallelansätzen, die doppelt per HPLC vermessen wurden. ND = nicht detektierbar, [a] Signalfläche von 4-Aminophenol (Flächeneinheiten), [b] Konzentration von 4-Aminophenol (μM), zur Auswertung wurde ein 10 μM Standard verwendet.

5.3.3.3 Testung von 4-Nitrosophenol

Anhand von 4-Nitrosophenol sollte untersucht werden, ob aromatische Nitrosoverbindungen mARC-katalysiert reduziert werden (s. Abbildung 5.17). Diese Verbindung wurde ausgewählt, da für 4-Nitrosophenol beschrieben ist, dass diese Substanz im Unterschied zu Nitrosobenzol nicht bereits rein chemisch durch NADH reduziert wird (Bernheim, 1972).

Sowohl bei Inkubation von 4-Nitrosophenol mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion als auch mit dem mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystem wurde per HPLC-Analytik 4-Aminophenol detektiert (s. Abbildung 5.18). Allerdings war dies auch bei dem zur Kontrolle mitgeführten Ansatz ohne Protein der Fall, während der Kontrollansatz, welcher als Enzymquelle äußere mitochondriale Membranfraktion, jedoch kein NADH enthielt, kein Signal für 4-Aminophenol lieferte. Bei Verwendung aller drei Enzymquellen sowie beim Kontrollansatz ohne Protein wiesen die 4-Aminophenolsignale Flächeneinheiten im Chromatogramm auf, die sich insbesondere unter Berücksichtigung der Standardabweichungen nur geringfügig voneinander unterscheiden (s. Tabelle 5.4).

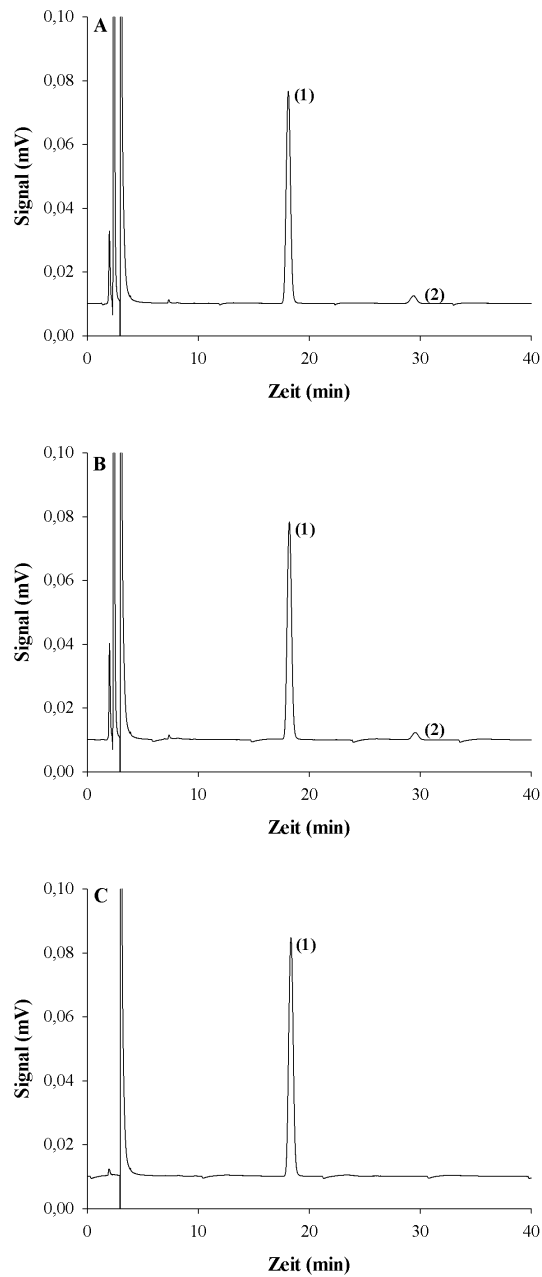


Abbildung 5.18: Repräsentatives Chromatogramm der Inkubation von 4-Nitrosophenol mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion (A) sowie des Kontrollansatzes ohne Protein (B) bzw. ohne NADH mit Protein (C)

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist unter 5.2.5 beschrieben. Die Parameter der HPLC-Methode sind unter 5.2.3.5 angegeben. (1) 4-Nitrosophenol, (2) 4-Aminophenol

In einem weiteren Versuch wurde die Stabilität von 4-Nitrosophenol im Inkubationspuffer ohne Protein in An- bzw. Abwesenheit von NADH getestet (s. Abbildung 5.19). Der NADH-haltige Ansatz lieferte ein klares 4-Aminophenolsignal im HPLC-Chromatogramm, während bei Vermessung des Kontrollansatzes ohne NADH kein 4-Aminophenol detektiert wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass 4-Nitrosophenol unter den gewählten Versuchsbedingungen bereits rein chemisch durch NADH reduziert wird.

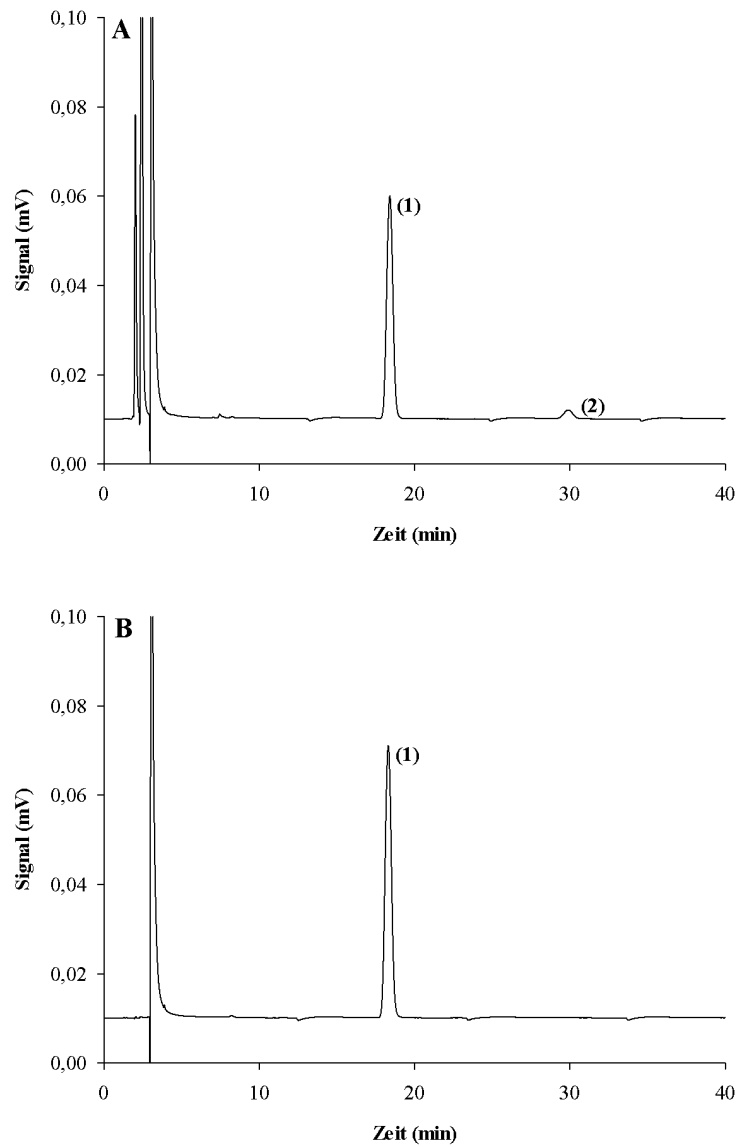


Abbildung 5.19: Stabilität von 4-Nitrosophenol in Anwesenheit (A) bzw. Abwesenheit (B) von NADH

Die Versuchsdurchführung ist unter 5.2.4.4 beschrieben. Die Parameter der HPLC-Methode sind unter 5.2.3.5 angegeben. (1) 4-Nitrosophenol, (2) 4-Aminophenol

5.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals anhand verschiedener aromatischer Nitroverbindungen gezeigt werden, dass unter aeroben Inkubationsbedingungen keine mARC-katalysierte Reduktion der Nitrogruppe abläuft.

Die Inkubation von 4-Nitrobenzamidoxim lieferte weder bei Einsatz der äußeren mitochondrialen Membranfraktion noch bei Verwendung des mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystems 4-Aminobenzamidoxim oder -amidin. Allerdings konnte in allen Fällen 4-Nitrobenzamidin detektiert werden. Zur Kontrolle wurde im gleichen Versuch Benzamidoxim inkubiert. Bei allen drei Enzymquellen konnte mittels HPLC-Analytik Benzamidin detektiert werden. Die verwendeten Proteine waren somit funktionsfähig und es konnte ausgeschlossen werden, dass aufgrund inaktiver Enzymquellen keine Reduktion der Nitrogruppe erfolgte. Auch die Inkubation von 4-Nitrobenzamidin, welche exemplarisch mit der äußeren mitochondrialen Membranfraktion als Enzymquelle durchgeführt wurde, lieferte keine Hinweise für eine Reduktion von Nitrogruppen durch das mARC-Enzymsystem.

Bei Inkubation von Nitrobenzol ermöglichten die kommerziell verfügbaren Reduktionszwischenstufen Nitrosobenzol und *N*-Phenylhydroxylamin eine detailliertere Analytik. Für Nitrosobenzol wurde von Bernheim (1972) eine rein chemische Reduktion durch NADH zum *N*-Phenylhydroxylamin beschrieben, welche durch eigene Versuche bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). *N*-Phenylhydroxylamin gehört zur Stoffklasse der Hydroxylamine, für welche die mARC-katalysierte Reduktion bereits bekannt und am Beispiel von Sulfamethoxazolhydroxylamin ausführlich charakterisiert wurde (Ott, 2013). Eigene Versuche bestätigten, dass *N*-Phenylhydroxylamin sowohl durch die äußere mitochondriale Membranfraktion als auch das mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem zu Anilin reduziert wird (Daten nicht gezeigt). Die Instabilität der Verbindung (s. Kapitel 5.3.2.2) schränkt die Aussagekraft quantitativer Auswertungen von *in vitro* Biotransformationsstudien an *N*-Phenylhydroxylamin jedoch stark ein. Da mit Sulfamethoxazolhydroxylamin bereits ein geeignetes Modells substrat für Biotransformationsstudien an Hydroxylaminen im Arbeitskreis etabliert war, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Inkubationen mit *N*-Phenylhydroxylamin durchgeführt.

Sowohl die Reduktion von Nitrosobenzol zu *N*-Phenylhydroxylamin als auch von *N*-Phenylhydroxylamin zu Anilin lief unter den gewählten Versuchsbedingungen ab, der erste Schritt bereits rein chemisch durch NADH, der zweite Schritt mARC-katalysiert. Wenn eine Reduktion von Nitrobenzol zu Nitrosobenzol durch mARC katalysiert würde, müssten somit die Zwischenstufen Nitrosobenzol und *N*-Phenylhydroxylamin bzw. das stabile Reduktionsendprodukt Anilin per HPLC detektierbar sein. Jedoch wurde keine der genannten Verbindungen detektiert. Somit konnte neben 4-Nitrobenzamidoxim und -amidin an einer dritten aromatischen Nitroverbindung gezeigt werden, dass unter den gewählten Inkubationsbedingungen keine mARC-katalysierte Reduktion der Nitrogruppe abläuft.

In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob Nitroverbindungen unter

anaeroben Inkubationsbedingungen durch mARC umgesetzt werden, da für Nitrit eine mARC1- bzw. mARC2-vermittelte Freisetzung von NO unter anaeroben Bedingungen beschrieben ist (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Außerdem muß berücksichtigt werden, dass nur für die im Rahmen dieser Arbeit gewählten und im Arbeitskreis etablierten Inkubationsbedingungen sowie unter Berücksichtigung der Detektionsgrenzen der HPLC gezeigt ist, dass keine Reduktion der Nitrogruppe abläuft.

Die Frage, ob das mARC-Enzymsystem an der Reduktion aromatischer Nitrosoverbindungen beteiligt ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Von Bernheim (1972) wurde beschrieben, dass Nitrosobenzol, nicht aber 4-Nitrosophenol, chemisch durch NADH zur entsprechenden Aminoverbindung reduziert wird. Daher wurde 4-Nitrosophenol als Modellverbindung einer aromatischen Nitrosoverbindung gewählt.

Entgegen der Aussage von Bernheim wurde jedoch in den eigenen Arbeiten eine rein chemische Reduktion von 4-Nitrosophenol zu 4-Aminophenol detektiert. Von Maskos und Winston (1994) wurde der Mechanismus der Reduktion von 4-Nitrosophenol katalysiert durch humane Alkoholdehydrogenase bzw. Alkoholdehydrogenase der Pferdeleber untersucht. Für beide Enzymquellen wurden hierbei unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Im ersten Schritt erfolgte jeweils die enzymatische Reduktion zur Hydroxylaminverbindung, gefolgt von enzymatischen und nicht enzymatischen Reaktionsschritten über 1,4-Benzochinon bzw. das 4-Hydroxybenzylnitreniumion zum 4-Aminophenol. Ebenso wie von Bernheim (1972) beschrieben, konnten sie keine nicht-enzymatische Reduktion des 4-Nitrosophenols durch NAD(P)H detektieren.

Möglicherweise liefern die gewählten Versuchsbedingungen eine Erklärung dafür, dass entgegen der Angaben von Bernheim (1972) und Maskos und Winston (1994) in den eigenen Arbeiten eine rein chemische Reduktion des 4-Nitrosophenol durch NADH detektiert wurde. Während Maskos und Winston (1994) zur Inkubation 20 μM 4-Nitrosophenol und 0,1 mM NADH einsetzten und den Verlauf der Reaktion photometrisch verfolgten, wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 mM Substrat und 1 mM NADH verwendet und entstehende Metabolite mittels HPLC-Analytik quantifiziert. Da die Reaktionsgeschwindigkeit außer bei Reaktionen 0. Ordnung von den Konzentrationen der Reaktanden abhängig ist (Mortimer und Müller, 2003), könnten die unterschiedlichen Konzentrationen sowie Konzentrationsverhältnisse, in denen 4-Nitrosophenol und NADH jeweils eingesetzt wurden, einen Einfluss auf das Ergebnis haben.

In weiterführenden Studien sollte versucht werden, beispielsweise durch Variation der Konzentrationen an Nitrosoverbindung und NADH, die Versuchsbedingungen soweit zu optimieren, dass keine nichtenzymatische Reduktion mehr detektiert werden kann und trotz insgesamt geringerer Konzentrationen eine quantitative Auswertung der *in vitro* Biotransformationsstudien mittels HPLC-Analytik möglich ist. Eine Verringerung der Konzentrationen an 4-Nitrosophenol und NADH könnte ferner helfen, im Rahmen der *in vitro* Biotransformationsstudien möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, da NADH auch *in vivo* in deutlich geringerer Konzentration vorliegt (Yu und Heikal, 2009).

5.5 Zusammenfassung

Anhand von 4-Nitrobenzamidoxim, 4-Nitrobenzamidin und Nitrobenzol konnte gezeigt werden, dass unter den im Arbeitskreis etablierten aeroben Inkubationsbedingungen keine mARC-katalysierte Reduktion aromatischer Nitroverbindungen abläuft.

Als aromatische Nitrosoverbindung wurde exemplarisch 4-Nitrosophenol untersucht. Unter den gewählten aeroben Inkubationsbedingungen erfolgte bereits eine nichtenzymatische Reduktion durch NADH. Daher steht eine abschließende Beurteilung der Beteiligung des mARC-Enzymsystems an der Reduktion aromatischer Nitrosoverbindungen noch aus und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen am mARC-Enzymsystem untersucht. Seit der Identifizierung des Molybdoenzyms mARC als dritter Komponente eines *N*-reduktiven Enzymsystems, bestehend aus mARC, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, wurde die rekombinante Herstellung der humanen Proteine etabliert und deren *in vitro* Rekonstitution optimiert.

Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der *N*-Reduktion unterschiedlich substituierter Derivate des Modellsubstrates Benzamidoxim wurden bereits von Karhan (2002) analysiert, jedoch waren zu diesem Zeitpunkt weder die Identität noch die Lokalisation der dritten Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems aufgeklärt. In Folge wurden als Enzymquellen Schweinelebermikrosomen sowie ein rekonstituiertes System verwendet, welches aus CYP2D, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase, gereinigt aus der Schweineleber, bestand.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss des Substituenten in *para*-Position von Benzamidoxim auf die physikochemischen Eigenschaften der Amidoximfunktion untersucht. Mittels Korrelationsanalysen konnte ein Zusammenhang zwischen den elektronischen Eigenschaften der Substituenten, charakterisiert durch die Hammett-Konstante σ , und den chemischen Verschiebungen im ^1H -NMR sowie den Redoxpotentialen der Verbindungen detektiert werden. Von Girreser *et al.* (2002) wurde bereits eine Korrelation zwischen den Hammett-Konstanten der Substituenten sowie den chemischen Verschiebungen im ^{15}N -NMR beschrieben. Die Substituenten in *para*-Position von Benzamidoxim beeinflussen somit sowohl die Elektronendichte der Stickstoff- als auch der Wasserstoffatome innerhalb der Amidoximfunktion.

Mittels Cyclischer Voltammetrie und Differentieller Puls-Voltammetrie wurde die elektrochemische Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime charakterisiert und Redoxpotentiale im Bereich von -0,8 bis -1,5 V *vs.* NHE bei pH 6,0 detektiert. Die Korrelationsanalyse ergab, dass elektronenziehende Substituenten die elektrochemische Reduktion begünstigen, während elektronenschiebende Substituenten diese erschweren und somit negativere Redoxpotentiale zur Folge haben.

Die Charakterisierung der enzymatischen *N*-Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime erfolgte im Rahmen dieser Arbeit erstmals unter Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber sowie des mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystems. Mittels Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass bei keiner der Enzymquellen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen elektronischen Eigenschaften der Substituenten bzw. deren Lipophilie und den kinetischen Parametern besteht. Jedoch lieferte mit 4-Nitrobenzamidoxim jeweils eine Verbindung mit stark elektronenziehendem Substituenten die geringsten und mit

4-Methylbenzamidoxim eine Verbindung mit elektronenschiebendem Substituenten die höchsten Umsetzungsraten.

Weiterführende Studien sollten sich damit beschäftigen, die Unterschiede zwischen elektrochemischer und enzymatischer Reduktion aufzuklären. Von Havemeyer *et al.* (2011) wurde im Rahmen eines hypothetischen Mechanismus der enzymatischen *N*-Reduktion durch das mARC-Enzymsystem eine koordinative Bindung zwischen Molybdän des Moco und Sauerstoff des Substrats postuliert, welche den Elektronentransfer im enzymatischen System begünstigen könnte. Die elektrochemisch bestimmten Redoxpotentiale der *para*-substituierten Benzamidoxime liegen noch unterhalb des Potentials des Elektronendonors im enzymatischen System, NADH. Eine Vereinfachung des Elektronentransfers durch die beschriebene koordinative Bindung könnte erklären, warum im enzymatischen System trotz der stark negativen Potentiale der Amidoximfunktion, welche anhand von Ethandiamidoxim von Cerdá *et al.* (1985) ebenfalls beschrieben wurden, eine Reduktion möglich ist. Des Weiteren könnte die Begünstigung der *N*-Reduktion durch die koordinative Bindung größeren Einfluss auf die enzymatische Reaktion haben als die elektronischen Eigenschaften der Substituenten und somit Unterschiede zwischen enzymatischer und elektrochemischer Reduktion erklären.

Zur Testung dieser Hypothesen könnten Mo^{IV}-Modellverbindungen mit positiverem Redoxpotential als Benzamidoxim synthetisiert und mit Benzamidoxim inkubiert werden. Sollte hierbei Benzamidin resultieren, könnte die Begünstigung der Reduktion durch eine koordinative Bindung zwischen Molybdän und Substrat bestätigt werden.

Alle *para*-substituierten Benzamidoxime, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurden sowohl durch die äußere mitochondriale Membranfraktion als auch das rekombinante mARC1- bzw. mARC2-haltige Enzymsystem zu den korrespondierenden Benzamidin-Metaboliten reduziert, wobei teils deutliche Unterschiede in den Umsetzungsraten detektiert wurden. Mittels Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass diese weder durch die elektronischen Eigenschaften der Substituenten noch deren Lipophilie begründet sind. Somit können diese Faktoren bei der Entwicklung und Optimierung neuer Amidoxim-Prodrugs, zumindest hinsichtlich der Bioaktivierung, vernachlässigt werden.

Weiterführende Studien sollten durchgeführt werden, um beispielsweise den Einfluss sterischer Effekte auf die *N*-Reduktion zu testen. Nach Aufklärung der Kristallstruktur von mARC könnten 3D-QSAR-Studien durchgeführt werden, um so letztlich die rationale Entwicklung von Amidoxim-Prodrugs, welche durch das mARC-Enzymsystem aktiviert werden, aber auch *N*-hydroxylierten Arzneistoffen, welche mARC-vermittelt inaktiviert werden, zu optimieren.

Erstmals wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche zur Bestimmung des Redoxpotentials von mARC1 mittels direkter Proteinelektrochemie durchgeführt. Hierbei wurde mittels Cyclischer Voltammetrie und Differentieller Puls-Voltammetrie ein pH-abhängiger Prozess detektiert und unter Verwendung der Lavourin- und Nernst-Gleichung gezeigt, dass zwei Elektronen und zwei Protonen an diesem beteiligt sind. Per Differentieller Puls-Voltammetrie wurde ein Redoxpotential von -335 mV *vs.* NHE

bei pH 7,4 bestimmt, welches in Einklang mit Redoxpotentialen anderer Molybdoenzyme steht (Hille, 1996). Allerdings liegt dieses Potential negativer als aufgrund des postulierten Elektronenflusses im mARC-Enzymsystem von NADH zu FAD (Cytochrom b_5 Reduktase), zu Häm (Cytochrom b_5), zu Moco (mARC) erwartet. Der Beweis, dass es sich bei dem ermitteltem Potential tatsächlich um den Übergang zwischen Mo^{IV} und Mo^{VI} des Moco handelt, steht noch aus, da bei Zugabe des Modellsubstrates Benzamidoxim bisher kein katalytischer Stromfluss im Sinne einer Bioelektrokatalyse detektiert wurde.

In weiterführenden Studien sollten daher neben Graphit weitere Elektrodenmaterialien sowie Oberflächen-modifizierte Arbeits Elektroden eingesetzt werden, um Einfluss auf die Adsorption und Orientierung von mARC an der Elektrodenoberfläche zu nehmen. Ziel sollte es sein, einen Elektronentransfer zwischen Elektrode, Enzym und Substrat zu ermöglichen, das im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Redoxpotential zu verifizieren und die kinetischen Parameter der Bioelektrokatalyse zu ermitteln.

Von Havemeyer *et al.* (2010) wurde anhand von *N*-Hydroxyvaldecoxib, einem Prodrug des COX-2 Inhibitors Valdecoxib, sowie den Modellverbindungen *N*-Hydroxybenzolsulfonamid bzw. *N*-Hydroxytoluolsulfonamid bereits die mARC-katalysierte Reduktion *N*-hydroxylierter Sulfonamide beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die *N*-Reduktion eines aromatischen und eines aliphatischen *N*-Hydroxysulfonamids charakterisiert werden. Beide Verbindungen stellen Entwicklungsprodukte aus der Reihe neuartiger HNO-Donoren zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen dar, welche chemisch unter Bildung der entsprechenden Sulfinsäure HNO freisetzen. Die mARC-vermittelte *N*-Reduktion zum Sulfonamid verhindert die HNO-Freisetzung und führt daher *in vivo* zur Inaktivierung.

Der Vergleich der kinetischen Parameter zeigte, dass beide Verbindungen bevorzugt durch das mARC1-haltige Enzymsystem umgesetzt werden. 4-Chlorphenyl-*N*-hydroxymethansulfonamid, mit aliphatischer *N*-Hydroxysulfonamidstruktur und lipophilem Chlorsubstituenten, lieferte sowohl für mARC1 als auch mARC2 höhere Umsetzungsraten als *N*-Hydroxy-3-methylsulfonylbenzolsulfonamid, einer Verbindung mit aromatischer *N*-Hydroxysulfonamidstruktur und eher hydrophilem Substituenten.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei der Entwicklung von HNO-Donoren hydrophile Verbindungen mit aromatischem Charakter der *N*-Hydroxysulfonamidstruktur im Vordergrund stehen sollten, da diese vermutlich in geringerem Ausmaß mARC-vermittelt reduziert und somit inaktiviert werden als entsprechend lipophilere Verbindungen mit aliphatischer *N*-Hydroxysulfonamidstruktur. Zur Prüfung dieser Hypothese sollten QSAR-Studien mit einer ausreichenden Anzahl an Verbindungen durchgeführt werden, welche beispielsweise anstelle des Benzolrings Heterocyclen aufweisen, sich in Art und Lokalisation des Substituenten unterscheiden und zwischen Aromat und *N*-Hydroxysulfonamidstruktur aliphatische Ketten unterschiedlicher Länge aufweisen. Ziel sollte es hierbei sein, eine Verbindung zu generieren, welche optimale HNO-Freisetzungseigenschaften und geringe mARC-katalysierte *N*-Reduktion vereint.

Sparacino-Watkins *et al.* (2014) konnten zeigen, dass das mARC-Enzymsystem un-

ter anaeroben Bedingungen die Freisetzung von NO aus Nitrit katalysiert. Beschrieben ist außerdem die Reduktion zahlreicher *N*-hydroxylierter und *N*-oxygenierter Verbindungen unter aeroben Bedingungen durch das mARC-Enzymsystem. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte erstmals getestet werden, ob auch aromatische Nitro- bzw. Nitrosoverbindungen mARC-vermittelt reduziert werden.

Anhand von 4-Nitrobenzamidoxim, 4-Nitrobenzamidin und Nitrobenzol konnte gezeigt werden, dass unter den verwendeten aeroben Versuchsbedingungen keine mARC-katalysierte Reduktion abläuft. Als aromatische Nitrosoverbindung wurde 4-Nitrosophenol gewählt, da in der Literatur beschrieben ist, dass diese Verbindung, anders als beispielsweise Nitrosobenzol, nicht bereits rein chemisch durch NADH reduziert wird (Bernheim, 1972; Maskos und Winston, 1994). Unter den verwendeten Versuchsbedingungen wurde jedoch in Abwesenheit von Proteinen eine NADH-vermittelte Reduktion zum 4-Aminophenol detektiert, so dass die Frage, ob das mARC-Enzymsystem an der Reduktion aromatischer Nitrosoverbindungen beteiligt ist, unter den gewählten Bedingungen anhand dieser Verbindung nicht zu beantworten war. In weiterführenden Versuchen könnte untersucht werden, ob die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff einen Einfluss auf die Reduktion der getesteten Nitro- bzw. Nitrosoverbindungen hat.

Während die physiologische Funktion des mARC-Enzymsystems bisher nicht eindeutig geklärt ist, ist die Beteiligung des Enzymsystems an der Aktivierung von Amidoxim-Prodrugs sowie Inaktivierung von Arzneistoffen mit *N*-hydroxylierten Strukturen, welche zur Erzielung der Wirkung *in vivo* essentiell sind, allgemein akzeptiert. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen am mARC-Enzymsystem können somit einen wesentlichen Beitrag im Rahmen der Arzneimittelforschung liefern und sollten neben der Aufklärung der physiologischen Bedeutung des Enzymsystems Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

7 Materialien und Geräte

7.1 Substanzen und sonstige Materialien

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

Substanz/Material	Hersteller
96-Well Microplate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Acetonitril (HPLC-Grade)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin Standard (2 mg/ml)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Amersham Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Amersham TM ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
4-Aminobenzamidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Aminophenol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniak	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ammoniumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Anilin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BCA Protein Assay Kit Pierce [®]	Thermo Scientific, Rockford, USA
Benzamidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Benzamidoxim	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

7 Materialien und Geräte

Substanz/Material	Hersteller
1,4-Benzochinon	abcr GmbH & Co KG, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
4-Hydroxybenzamidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Hydroxybenzamidoxim	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (HPLC-Grade)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
4-Methoxybenzamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Methoxybenzamidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NADH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumoctylsulfonat	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Nitrobenzol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nitrosobenzol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4-Nitrosophenol	abcr GmbH & Co KG, Karlsruhe
<i>N</i> -Phenylhydroxylamin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	Merck KGaA, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

7.1 Substanzen und sonstige Materialien

Substanz/Material	Hersteller
Plastibrand UV-Küvette mikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
PVDF Transfer Membrane Amersham Hybond TM -P	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Reaktionsgefäße 1,5 ml/2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Salzsäure, 36 %	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Trifluoressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Whatman [®] Polyamidmembranfilter 0,45 µm	Whatman GmbH, Dassel

7.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Cary 50 Scan UV-Visible Microplate Reader	Varian GmbH, München
Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer	Varian GmbH, München
Cary Win UV Software Version 2.0	Varian GmbH, München
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA10	Beckman Coulter, Krefeld
Jupiter Fleischwolf Typ 885	Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf
Messer-Homogenisator	Eigenbau der Universität Austin, Texas
Millipore Schlauchpumpe für Organ-perfusion Model XX8200230	Millipore GmbH, Schwalbach
pH-Messgerät inoLab [®] pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim
Pipetten Reference [®] Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill	B. Braun Biotech International, Melsungen
Schüttelwasserbad GFL 1087	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
SDS-PAGE Mini Protean [®] Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Ultraschallbad, Sonorex, Super RK 510H	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Vortex Genie [®] 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Vortexer IKA-Vibrax-VXR	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage Sartorius CP 225D	Sartorius AG, Göttingen
Waage Sartorius L 2200P	Sartorius AG, Göttingen

Literaturverzeichnis

- Aguilar, M., Kalakoutsii, K., Cárdenas, J., and Fernández, E. (1992). Direct transfer of molybdopterin cofactor to aponitrate reductase from a carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 307:162–163.
- Albert, A., Goldacre, R., and Phillips, J. (1948). The strength of heterocyclic bases. *Journal of the Chemical Society*, 2240–2249.
- Anantharaman, V. and 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.
- Aono, T., Sakamoto, Y., Miura, M., Takeuchi, F., Hori, H., and Tsubaki, M. (2010). Direct electrochemical analyses of human cytochromes b_5 with a mutated heme pocket showed a good correlation between their midpoint and half wave potentials. *Journal of Biomedical Science*, 17:90.
- Ask, K., Dijols, S., Giroud, C., Casse, L., Frapart, Y.-M., Sari, M.-A., Kim, K.-S., Stuehr, D. J., Mansuy, D., Camus, P., and Boucher, J.-L. (2003). Reduction of nitlutamide by NO synthases: implications for the adverse effects of this nitroaromatic antiandrogen drug. *Chemical Research in Toxicology*, 16:1547–1554.
- Barber, M. J., Trimboli, A. J., Nomikos, S., and Smith, E. T. (1997). Direct electrochemistry of the flavin domain of assimilatory nitrate reductase: effects of NAD^+ and NAD^+ analogs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 345:88–96.
- Bard, A. J. and Faulkner, L. R. (2000). *Electrochemical methods and applications*. Wiley, New York, 2. Auflage.
- Bartberger, M. D., Liu, W., Ford, E., Miranda, K. M., Switzer, C., Fukuto, J. M., Farmer, P. J., Wink, D. A., and Houk, K. N. (2002). The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:10958–10963.
- Becker, H. G. O. and Beckert, R. (2004). *Organikum: Organisch-chemisches Grundpraktikum*. Wiley-VCH, Weinheim, 22. Auflage.
- Bernhardt, P. V. (2006). Enzyme Electrochemistry - Biocatalysis on an Electrode. *Australian Journal of Chemistry*, 59:233–256.

- Bernhardt, P. V. (2011). Exploiting the versatility and selectivity of Mo enzymes with electrochemistry. *Chemical Communications*, 47:1663–1673.
- Bernheim, M. L. (1972). The non-enzymic oxidation of NADH by nitrosobenzene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46:1598–1602.
- Betso, S. R., Klapper, M. H., and Anderson, L. B. (1972). Electrochemical studies of heme proteins. Coulometric, polarographic, and combined spectroelectrochemical methods for reduction of the heme prosthetic group in cytochrome *c*. *Journal of the American Chemical Society*, 94:8197–8204.
- Blasco, F., Dos Santos, J P, Magalon, A., Frixon, C., Guigliarelli, B., Santini, C. L., and Giordano, G. (1998). NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 28:435–447.
- Böhm, H.-J., Klebe, G., and Kubinyi, H. (2002). *Wirkstoffdesign: Der Weg zum Arzneimittel*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg [u.a.], 1. Auflage.
- Bonner, F. T. and Ko, Y. (1992). Kinetic, isotopic, and ^{15}N -NMR study of *N*-hydroxybenzenesulfonamide decomposition: an nitrosyl hydride (HNO) source reaction. *Inorganic Chemistry*, 31:2514–2519.
- Borgese, N., D'Arrigo, A., Silvestris, M. d., and Pietrini, G. (1993). NADH-cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*, 325:70–75.
- Brain, S. D. and Grant, A. D. (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiological Reviews*, 84:903–934.
- Brown, A. C. and Fraser, T. R. (1868). On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action; with special reference to the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia. *Journal of Anatomy and Physiology*, 2:224–242.
- Brown, S. D. M. and Moore, M. W. (2012). The International Mouse Phenotyping Consortium: past and future perspectives on mouse phenotyping. *Mammalian Genome*, 23:632–640.
- Campbell, W. H. (1996). Nitrate Reductase Biochemistry Comes of Age. *Plant Physiology*, 111:355–361.
- Campbell, W. H. (1999). Nitrate Reductase Structure, Function and Regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50:277–303.

- Carlson, B. W. and Miller, L. L. (1985). Mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes. *Journal of the American Chemical Society*, 107:479–485.
- Cerdá, V., Jara, R., and Forteza, R. (1985). Analytical properties of the amidoxime group. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 195:335–343.
- Christen, P. and Jaussi, R. (2005). *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. Springer, Berlin [u.a.].
- Clark, L. C. and Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102:29–45.
- Clement, B. (2002). Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metabolism Reviews*, 34:565–579.
- Clement, B. and 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*, 31:645–651.
- Clement, B., Mau, S., Deters, S., and 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*, 33:1740–1747.
- Clement, B. and Raether, W. (1985). Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittel-Forschung*, 35:1009–1014.
- Clement, B. and Zimmermann, M. (1988). Mechanism of the microsomal *N*-hydroxylation of *para*-substituted benzamidines. *Biochemical Pharmacology*, 37:4747–4752.
- Coe, K. J., Jia, Y., Ho, H. K., Rademacher, P., Bammler, T. K., Beyer, R. P., Farin, F. M., Woodke, L., Plymate, S. R., Fausto, N., and Nelson, S. D. (2007). Comparison of the cytotoxicity of the nitroaromatic drug flutamide to its cyano analogue in the hepatocyte cell line TAMH: evidence for complex I inhibition and mitochondrial dysfunction using toxicogenomic screening. *Chemical Research in Toxicology*, 20:1277–1290.
- Cramer, R. D., Patterson, D. E., and Bunce, J. D. (1988). Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 110:5959–5967.
- Da Cruz, S., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P. A., and Martinou, J.-C. (2003). Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:41566–41571.

- Dai, T., Tian, Y., Tocchetti, C. G., Katori, T., Murphy, A. M., Kass, D. A., Paolocci, N., and Gao, W. D. (2007). Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. *The Journal of Physiology*, 580:951–960.
- de Kroon, A. I. P. M., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R., and Kruijff, B. d. (1997). Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1325:108–116.
- de Oliveira, I. M., Zanotto-Filho, A., Moreira, J. C. F., Bonatto, D., and Henriques, J. A. P. (2010). The role of two putative nitroreductases, Frn2p and Hbn1p, in the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 27:89–102.
- Eddowes, M. J. and Hill, A. O. (1977). Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 771–772.
- Ellis, K. J. and Morrison, J. F. (1982). Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods in Enzymology*, 87:405–426.
- Estabrook, R. W. and Werringloer, J. (1978). The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods in Enzymology*, 52:212–220.
- Fent, K. (2003). *Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie*. Thieme, Stuttgart [u.a.], 2. Auflage.
- Ferapontova, E. E. (2004). Direct Peroxidase Bioelectrocatalysis on a Variety of Electrode Materials. *Electroanalysis*, 16:1101–1112.
- Ferapontova, E. E. and Gorton, L. (2005). Direct electrochemistry of heme multifactor-containing enzymes on alkanethiol-modified gold electrodes. *Bioelectrochemistry*, 66:55–63.
- Ferapontova, E. E., Shleev, S., Ruzgas, T., Stoica, L., Christenson, A., Tkac, J., Yaropolov, A. I., and Gorton, L. (2005). Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes. *Perspectives in Bioanalysis*, 1:1–81.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408:239–247.
- Fischer, K., Barbier, G. G., Hecht, H.-J., Mendel, R. R., Campbell, W. H., and Schwarz, G. (2005). Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site. *The Plant Cell*, 17:1167–1179.
- Free, S. M. and Wilson, J. W. (1964). A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 7:395–399.

- Friedman, J. E., Watson, J. A., Lam, D. W.-H., and Rokita, S. E. (2006). Iodotyrosine deiodinase is the first mammalian member of the NADH oxidase/flavin reductase superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:2812–2819.
- Froriep, D. (2013). *Reduktion N-oxygenerter Verbindungen durch die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC)*. Dissertation, Kiel.
- Froriep, D., Clement, B., Bittner, F., Mendel, R. R., Reichmann, D., Schmalix, W., and Havemeyer, A. (2013). Activation of the anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica*, 43:780–784.
- Fukuto, J. M., Dutton, A. S., and Houk, K. N. (2005). The chemistry and biology of nitroxyl (HNO): a chemically unique species with novel and important biological activity. *ChemBiochem*, 6:612–619.
- Giles, L. J., Ruppelt, C., Yang, J., Mendel, R. R., Bittner, F., and Kirk, M. L. (2014). Molybdenum site structure of MOSC family proteins. *Inorganic Chemistry*, 53:9460–9462.
- Girreser, U., König, M., and Clement, B. (2002). Characterization of *para*-substituted benzamidoximes and benzamidinium salts by ^{15}N NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40:202–206.
- Grätzel, M., Taniguchi, S., and Henglein, A. (1970). Pulsradiolytische Untersuchung kurzlebiger Zwischenprodukte der NO-Reduktion in wässriger Lösung. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 1003–1010.
- Gruenewald, S., Wahl, B., Bittner, F., Hungeling, H., Kanzow, S., Kotthaus, J., Schwing, U., Mendel, R. R., and 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.
- Hammett, L. P. (1937). The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 59:96–103.
- Hansch, C. and Fujita, T. (1964). $\rho - \sigma - \pi$ Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 86:1616–1626.
- Hansch, C. and Leo, A. (1979). *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*. Wiley, New York.
- Hansch, C., Maloney, P. P., Fujita, T., and Muir, R. M. (1962). Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. *Nature*, 194:178–180.

- Havemeyer, A., Bittner, F., Wollers, S., Mendel, R., Kunze, T., and Clement, B. (2006). Identification of the missing component in the mitochondrial benzamido-xime 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., and Clement, B. (2010). Reduction of *N*-hydroxy-sulfonamides, including *N*-hydroxy-valdecoxib, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metabolism and Disposition*, 38:1917–1921.
- Havemeyer, A., Lang, J., and Clement, B. (2011). The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metabolism Reviews*, 43:524–539.
- Heering, H. A., Hirst, J., and Armstrong, F. A. (1998). Interpreting the Catalytic Voltammetry of Electroactive Enzymes Adsorbed on Electrodes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102:6889–6902.
- Heyrovský, J. and Babička, J. (1930). Polarographic studies with the dropping mercury kathode. Part XIII. The effect of albumins. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2:370–379.
- Hildebrandt, A. and Estabrook, R. W. (1971). Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 143:66–79.
- Hille, R. (1996). The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical Reviews*, 96:2757–2816.
- Hille, R. and Nishino, T. (1995). Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB Journal*, 9:995–1003.
- Hille, R., Nishino, T., and Bittner, F. (2011). Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination Chemistry Reviews*, 255:1179–1205.
- Ikeda, T., Kobayashi, D., Matsushita, F., Sagara, T., and Niki, K. (1993). Bioelectrocatalysis at electrodes coated with alcohol dehydrogenase, a quinoxinoprotein with heme c serving as a built-in mediator. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 361:221–228.
- Irvine, J. C., Favalaro, J. L., and Kemp-Harper, B. K. (2003). NO^- activates soluble guanylate cyclase and K_v channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension*, 41:1301–1307.
- Irvine, J. C., Ritchie, R. H., Favalaro, J. L., Andrews, K. L., Widdop, R. E., and Kemp-Harper, B. K. (2008). Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29:601–608.

- Islinger, M., Lüers, G. H., Li, K. W., Loos, M., and Völkl, A. (2007). Rat liver peroxisomes after fibrates treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry*, 282:23055–23069.
- Ivanov, N. V., Hubálek, F., Trani, M., and Edmondson, D. E. (2003). Factors involved in the assembly of a functional molybdopyranopterin center in recombinant *Comamonas acidovorans* xanthine dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 270:4744–4754.
- Iyanagi, T. (1977). Redox properties of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅. *Biochemistry*, 16:2725–2730.
- Iyanagi, T. and Anan, K. F. (1984). One-electron oxidation-reduction properties of hepatic NADH-cytochrome b₅ reductase. *Biochemistry*, 23:1418–1425.
- Iyanagi, T., Makino, N., and Mason, H. S. (1974). Redox properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b₅ reductases. *Biochemistry*, 13:1701–1710.
- Jakobs, H. H. (2014). *Studien zur Verknüpfung der mitochondrialen Amidoxim reduzierenden Komponente (mARC) mit dem Energiestoffwechsel. Dissertation*, Kiel.
- Jakobs, H. H., Froriep, D., Havemeyer, A., Mendel, R. R., Bittner, F., and Clement, B. (2014a). The Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Involvement in Metabolic Reduction of *N*-Oxides, Oximes and *N*-Hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem*, 9:2381–2387.
- Jakobs, H. H., Mikula, M., Havemeyer, A., Strzalkowska, A., Borowa-Chmielak, M., Dzwonek, A., Gajewska, M., Hennig, E. E., Ostrowski, J., and Clement, B. (2014b). 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:e105371.
- Johnson, J. L., Hainline, B. E., and Rajagopalan, K. V. (1980). Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase, and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component. *The Journal of Biological Chemistry*, 255:1783–1786.
- Karhan, W. (2002). *Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems. Dissertation*, Kiel.
- Kay, C. J., Barber, M. J., Notton, B. A., and Solomonson, L. P. (1989). Oxidation-reduction midpoint potentials of the flavin, haem and Mo-pterin centres in spinach (*Spinacia oleracea* L.) nitrate reductase. *The Biochemical Journal*, 263:285–287.

- Kay, C. J., Barber, M. J., and Solomonson, L. P. (1988). Circular dichroism and potentiometry of FAD, heme and Mo-pterin prosthetic groups of assimilatory nitrate reductase. *Biochemistry*, 27:6142–6149.
- Keyes, S. R. and Cinti, D. L. (1980). Biochemical properties of cytochrome b₅-dependent microsomal fatty acid elongation and identification of products. *The Journal of Biological Chemistry*, 255:11357–11364.
- Kimura, S., Kawamura, M., and Iyanagi, T. (2003). Role of Thr⁶⁶ 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.
- King, B. C. and Hawkrode, F. M. (1987). A study of the electron transfer and oxygen binding reactions of myoglobin. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 237:81–92.
- Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W. A., Garrett, R. M., Rajagopalan, K. V., Enemark, J. H., and Rees, D. C. (1997). Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*, 91:973–983.
- Klein, J. M., Busch, J. D., Potting, C., Baker, M. J., Langer, T., and 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.
- Koder, R. L., Oyedele, O., and Miller, A. F. (2001). Retro-nitroreductase, a putative evolutionary precursor to *Enterobacter cloacae* strain 96-3 nitroreductase. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3:747–755.
- Kotthaus, J., Wahl, B., Havemeyer, A., Kotthaus, J., Schade, D., Garbe-Schönberg, D., Mendel, R., Bittner, F., and Clement, B. (2011). Reduction of N^ω-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *The Biochemical Journal*, 433:383–391.
- Kovacic, P. and Somanathan, R. (2014). Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *Journal of Applied Toxicology*, 34:810–824.
- Krischkowski, C. (2010). *mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen Organen. Diplomarbeit*, Kiel.
- Krischkowski, C. (2014). *mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen und humanen Geweben und Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC. Dissertation*, Kiel.
- Krompholz, N. (2013). *Reduktion von aliphatischen Amidoximen und N-hydroxylierten Basenanaloga durch neue molybdänhaltige Enzymsysteme. Dissertation*, Kiel.

- Krompholz, N., Krischkowski, C., Reichmann, D., Garbe-Schönberg, D., Mendel, R.-R., Bittner, F., Clement, B., and 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.
- Kubinyi, H. (1994). Der Schlüssel zum Schloß II. Hansch-Analyse, 3D-QSAR und De novo-Design. *Pharmazie in Unserer Zeit*, 23:281–290.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Laviron, E. (1979). General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 101:19–28.
- Leroux, A., Mota Vieira, L., and Kahn, A. (2001). Transcriptional and translational mechanisms of cytochrome *b*₅ reductase isoenzyme generation in humans. *The Biochemical Journal*, 355:529–535.
- Lewis, N. J., Hurt, P., Sealy-Lewis, H. M., and Scazzocchio, C. (1978). The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans* IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. *European Journal of Biochemistry*, 91:311–316.
- Löffler, G. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Heidelberg, 8. Auflage.
- Lozán, J. L. and Kausch, H. (2004). *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*. Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg, 3. Auflage.
- Malik, A. N., Rossios, C., Al-Kafaji, G., Shah, A., and 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.
- March, J. (1985). *Advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms, and structure*. Wiley, New York, 3. Auflage.
- Maskos, Z. and Winston, G. W. (1994). Mechanism of *p*-nitrosophenol reduction catalyzed by horse liver and human π -alcohol dehydrogenase (ADH). *The Journal of Biological Chemistry*, 269:31579–31584.
- Massey, V. and Edmondson, D. (1970). On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *The Journal of Biological Chemistry*, 245:6595–6598.
- Meckstroth, M. L., Norris, B. J., and Heineman, W. R. (1981). Mediator-titrants for thin-layer spectroelectrochemical measurement of biocomponent U^0 and n values. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 8:63–70.
- Mendel, R. R. and Bittner, F. (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763:621–635.

- Mendel, R. R. and Kruse, T. (2012). Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823:1568–1579.
- Méndez-Vilas, A. (2010). *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Formatex Research Center, Badajoz.
- Meyer, H. (1901). Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 46:338–346.
- Mikula, M., Rubel, T., Karczmarski, J., Goryca, K., Dadlez, M., and Ostrowski, J. (2010). Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Functional & Integrative Genomics*, 11:215–224.
- Miranda, K. M., Nagasawa, H. T., and Toscano, J. P. (2005). Donors of HNO. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5:649–664.
- Mortimer, C. E. and Müller, U. (2003). *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. Thieme, Stuttgart, 8. Auflage.
- Moss, R. A., Terpinski, J., Cox, D. P., Denny, D. Z., and Krogh-Jespersen, K. (1985). Azide and fluoride exchange reactions of halodiazirines. *Journal of the American Chemical Society*, 107:2743–2748.
- Mulrooney, S. B. and Waskell, L. (2000). High-level expression in *Escherichia coli* and purification of the membrane-bound form of cytochrome b₅. *Protein Expression and Purification*, 19:173–178.
- Mutschler, E. (2012). *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 10. Auflage.
- Neve, E. P. A., Nordling, A., Andersson, T. B., Hellman, U., Diczfalusy, U., Johansson, I., and 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.
- Olekhovich, I. N., Goodwin, A., and Hoffman, P. S. (2009). Characterization of the NAD(P)H oxidase and metronidazole reductase activities of the RdxA nitroreductase of *Helicobacter pylori*. *FEBS Journal*, 276:3354–3364.
- Opallo, M. and Bilewicz, R. (2011). Recent Developments of Nanostructured Electrodes for Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction. *Advances in Physical Chemistry*, 2011:1–21.
- Oshino, N., Imai, Y., and Sato, R. (1971). A function of cytochrome b₅ in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *Journal of Biochemistry*, 69:155–167.

- Ott, G. (2013). *Untersuchungen zu genetischen Variationen im mARC-haltigen N-reduktiven Enzymsystem. Dissertation*, Kiel.
- Ott, G., Havemeyer, A., and Clement, B. (2014a). The mammalian molybdenum enzymes of mARC. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, DOI:10.1007/s00775-014-1216-4.
- Ott, G., Plitzko, B., Krischkowski, C., Reichmann, D., Bittner, F., Mendel, R. R., Kunze, T., Clement, B., and Havemeyer, A. (2014b). Reduction of Sulfamethoxazole Hydroxylamine (SMX-HA) by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC). *Chemical Research in Toxicology*, 27:1687–1695.
- Overton, E. (1901). *Studien über die Narkose*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Paolucci, N., Jackson, M. I., Lopez, B. E., Miranda, K., Tocchetti, C. G., Wink, D. A., Hobbs, A. J., and Fukuto, J. M. (2007). The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO. *Pharmacology & Therapeutics*, 113:442–458.
- Paolucci, N., Saavedra, W. F., Miranda, K. M., Martignani, C., Isoda, T., Hare, J. M., Espey, M. G., Fukuto, J. M., Feelisch, M., Wink, D. A., and Kass, D. A. (2001). Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:10463–10468.
- Plitzko, B. (2010). *Optimierung der in-vitro Rekonstitution des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems. Diplomarbeit*, Kiel.
- Plitzko, B. (2014). *Die Komponenten des mARC-Enzymsystems im N-reduktiven Metabolismus humaner Zellen. Dissertation*, Kiel.
- Plitzko, B., Ott, G., Reichmann, D., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Mendel, R., Bittner, F., Clement, B., and 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.
- Race, P. R., Lovering, A. L., Green, R. M., Ossor, A., White, S. A., Searle, P. F., Wrighton, C. J., and Hyde, E. I. (2005). Structural and mechanistic studies of Escherichia coli nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:13256–13264.
- Rajagopalan, K. V. and Johnson, J. L. (1992). The pterin molybdenum cofactors. *The Journal of Biological Chemistry*, 267:10199–10202.

- Ratnam, K., Shiraishi, N., Campbell, W. H., and Hille, R. (1995). Spectroscopic and kinetic characterization of the recombinant wild-type and C242S mutant of the cytochrome b reductase fragment of nitrate reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:24067–24072.
- Ratnam, K., Shiraishi, N., Campbell, W. H., and Hille, R. (1997). Spectroscopic and kinetic characterization of the recombinant cytochrome c reductase fragment of nitrate reductase. Identification of the rate-limiting catalytic step. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:2122–2128.
- Reddy, V. V., Kupfer, D., and Caspi, E. (1977). Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 252:2797–2801.
- Reichl, F.-X., Benecke, J., and Hammelehle, R. (2002). *Taschenatlas der Toxikologie: Substanzen, Wirkungen, Umwelt*. Thieme, Stuttgart [u.a.], 2. Auflage.
- Reilly, T. P., Woster, P. M., and Svensson, C. K. (1999). Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapson: implications for differences in adverse drug reactions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288:951–959.
- Reiss, J. and Johnson, J. L. (2003). Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. *Human Mutation*, 21:569–576.
- Richet, C. R. (1893). *Physiologie. Travaux du laboratoire de M. Charles Richet*. Alcan, Paris.
- Rivera, M., Seetharaman, R., Girdhar, D., Wirtz, M., Zhang, X., Wang, X., and White, S. (1998). The reduction potential of cytochrome b₅ is modulated by its exposed heme edge. *Biochemistry*, 37:1485–1494.
- Rücker, G., Neugebauer, M., and Willems, G. G. (2008). *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 4. Auflage.
- Scheller, F. W., Bistolos, N., Liu, S., Jänchen, M., Katterle, M., and Wollenberger, U. (2005). Thirty years of haemoglobin electrochemistry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 116:111–120.
- Scheller, F. W., Wollenberger, U., Lei, C., Jin, W., Ge, B., Lehmann, C., Lisdat, F., and Fridman, V. (2002). Bioelectrocatalysis by redox enzymes at modified electrodes. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82:411–424.
- Schwarz, G., Santamaria-Araujo, J. A., Wolf, S., Lee, H.-J., Adham, I. M., Gröne, H.-J., Schwegler, H., Sass, J. O., Otte, T., Hänzelmann, P., Mendel, R. R., Engel,

- W., and Reiss, J. (2004). Rescue of lethal molybdenum cofactor deficiency by a biosynthetic precursor from *Escherichia coli*. *Human Molecular Genetics*, 13:1249–1255.
- Sha, X., Isbell, T. S., Patel, R. P., Day, C. S., and King, S. B. (2006). Hydrolysis of acyloxy nitroso compounds yields nitroxyl (HNO). *Journal of the American Chemical Society*, 128:9687–9692.
- Shafirovich, V. and Lyamar, S. V. (2002). Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:7340–7345.
- Shirabe, K., Landi, M. T., Takeshita, M., Uziel, G., Fedrizzi, E., and Borgese, N. (1995). A novel point mutation in a 3' splice site of the NADH-cytochrome b₅ reductase gene results in immunologically undetectable enzyme and impaired NADH-dependent ascorbate regeneration in cultured fibroblasts of a patient with type II hereditary methemoglobinemia. *American Journal of Human Genetics*, 57:302–310.
- Shoshan-Barmatz, V. and Ben-Hail, D. (2012). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion*, 12:24–34.
- Smith, P. A. S. and Hein, G. E. (1960). The Alleged Role of Nitroxyl in Certain Reactions of Aldehydes and Alkyl Halides. *Journal of the American Chemical Society*, 82:5731–5740.
- 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., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76–85.
- Soeiro, M. N. C., Werbovetz, K., Boykin, D. W., Wilson, W. D., Wang, M. Z., and Hemphill, A. (2013). Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology*, 140:929–951.
- Solomonson, L. P. and Barber, M. J. (1990). Assimilatory Nitrate Reductase: Functional Properties and Regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41:225–253.
- Sparacino-Watkins, C. E., Tejero, J., Sun, B., Gauthier, M. C., Thomas, J., Ragi-reddy, V., Merchant, B. A., Wang, J., Azarov, I., Basu, P., and 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.

- Spence, J. T., Kipke, C. A., Enemark, J. H., and Sunde, R. A. (1991). Stoichiometry of electron uptake and the effect of anions and pH on the molybdenum and heme reduction potentials of sulfite oxidase. *Inorganic Chemistry*, 30:3011–3015.
- Stallmeyer, B., Drugeon, G., Reiss, J., Haenni, A. L., and Mendel, R. R. (1999). Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames. *American Journal of Human Genetics*, 64:698–705.
- Streck, G. (2004). *Einführung in die Statistik für Geoökologen und andere Naturwissenschaftler*. Books on Demand, Norderstedt.
- Suprun, E. V., Shumyantseva, V. V., and Archakov, A. I. (2014). Protein Electrochemistry: Application in Medicine. A Review. *Electrochimica Acta*, 140:72–82.
- Tocchetti, C. G., Wang, W., Froehlich, J. P., Huke, S., Aon, M. A., Wilson, G. M., Di Benedetto, G., O'Rourke, B., Gao, W. D., Wink, D. A., Toscano, J. P., Zaccolo, M., Bers, D. M., Valdivia, H. H., Cheng, H., Kass, D. A., and Paolucci, N. (2007). Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling. *Circulation Research*, 100:96–104.
- Trimboli, A. J., Quinn, G. B., Smith, E. T., and Barber, M. J. (1996). Thiol modification and site directed mutagenesis of the flavin domain of spinach NADH:nitrate reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331:117–126.
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W., and Sawa, A. (2011). The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cellular Signalling*, 23:317–323.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552:335–344.
- Varfolomeev, S. D., Yaropolov, A. I., Berezin, I. V., Tarasevich, M. R., and Bogdanovskaya, V. A. (1977). Bioelectrocatalysis. Hydrogenase as catalyst of electrochemical hydrogen ionization. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 4:314–326.
- Veldman, A., Santamaria-Araujo, J. A., Sollazzo, S., Pitt, J., Gianello, R., Yaplito-Lee, J., Wong, F., Ramsden, C. A., Reiss, J., Cook, I., Fairweather, J., and Schwarz, G. (2010). Successful treatment of molybdenum cofactor deficiency type A with cPMP. *Pediatrics*, 125:e1249–54.
- Vergères, G. and Waskell, L. (1995). Cytochrome b_5 , its functions, structure and membrane topology. *Biochimie*, 77:604–620.
- Wahl, B., Reichmann, D., Niks, D., Krompholz, N., Havemeyer, A., Clement, B., Messerschmidt, T., Rothkegel, M., Biester, H., Hille, R., Mendel, R. R., and 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.
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108:814–825.
- Warner, C. K. and Finnerty, V. (1981). Molybdenum hydroxylases in *Drosophila*. II. Molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase. *Molecular & General Genetics*, 184:92–96.
- Whitby, L. G. (1953). A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *The Biochemical Journal*, 54:437–442.
- Wiese, S., Gronemeyer, T., Ofman, R., Kunze, M., Grou, C. P., Almeida, J. A., Eisenacher, M., Stephan, C., Hayen, H., Schollenberger, L., Korosec, T., Waterham, H. R., Schliebs, W., Erdmann, R., Berger, J., Meyer, H. E., Just, W., Azevedo, J. E., Wanders, Ronald J A, and Warscheid, B. (2007). Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6:2045–2057.
- Wink, D. A., Miranda, K. M., Katori, T., Mancardi, D., Thomas, D. D., Ridnour, L., Espey, M. G., Feelisch, M., Colton, C. A., Fukuto, J. M., Pagliaro, P., Kass, D. A., and Paolocci, N. (2003). Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285:2264–2276.
- Yeh, P. and Kuwana, T. (1977). Reversible electrode reaction of cytochrome c. *Chemistry Letters*, 1145–1148.
- Yu, Q. and Heikal, A. A. (2009). Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95:46–57.
- Zamora, R., Grzesiok, A., Weber, H., and Feelisch, M. (1995). Oxidative release of nitric oxide accounts for guanylyl cyclase stimulating, vasodilator and anti-platelet activity of Piloty's acid: a comparison with Angeli's salt. *The Biochemical Journal*, 312:333–339.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Themas, die Freiheit bei der Gestaltung und die mir gewährte Unterstützung möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

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

Dr. Antje Havemeyer danke ich für die engagierte Betreuung und Hilfsbereitschaft sowie etliche hilfreiche Ratschläge in allen mARC-Fragen.

Dr. Ulrich Girreser danke ich für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei NMR- und MS-Analysen sowie statistischen Auswertungen.

Dr. Florian Bittner und Dr. Debora Reichmann (TU Braunschweig) danke ich für die Bereitstellung der rekombinanten Proteine und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Kurz (Bioanorganik Freiburg) danke ich für die Kooperation bei der Bestimmung der Redoxpotentiale der *para*-substituierten Benzamidoxime, die gute Einarbeitung in die Methoden der Elektrochemie sowie seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Seinem gesamten Team möchte ich für die herzliche Aufnahme und Betreuung während meines Messaufenthalts in Freiburg danken.

Frau Prof. Dr. Elena Ferapontova (iNano Aarhus, Dänemark) danke ich für die Kooperation im Bereich der Proteinelektrochemie. Auch hier gilt mein Dank ihrem gesamten Team für die großartige Unterstützung während meines Messaufenthalts in Aarhus.

Bei Petra Köster und Sven Wichmann bedanke ich mich herzlich für die technische Unterstützung im Labor, insbesondere für etliche Inkubationen sowie Reparaturen und sonstige Hilfestellungen an der HPLC.

Ebenso danke ich allen Kollegen des Instituts, insbesondere der mARC-Gruppe, für die gute Zusammenarbeit. Bei Thomas, Nina, Karin, Birte, Helene, Merle und Jenny

bedanke ich mich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Semesterbetreuung. Laura, Danilo und Swetlana danke ich für die angenehme Bürogemeinschaft.

Ganz herzlich bedanke ich mich außerdem bei Heyka, Karin und Antje für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Mann Sebastian, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Eva Bauch, geb. Treuer
Geburtsdatum	25.02.1985
Geburtsort	Preetz
Staatsangehörigkeit	deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

seit März 2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
Januar 2011	Erteilung der Approbation
Juli 2010 - Dezember 2010	Pharmaziepraktikum, Apotheke im familia Mettenhof, Kiel
Januar 2010 - Juni 2010	Pharmaziepraktikum, Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Berlin, Anfertigung einer Diplomarbeit
Oktober 2005 - November 2009	Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Juni 2004	Abitur am Ernst-Barlach-Gymnasium, Kiel

Erklärung zu §8 der Promotionsordnung

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

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Bauch E., Reichmann D., Mendel R. R., Bittner F., Manke A.-M., Kurz P., Girreser U., Havemeyer A., Clement B. (2014)

Electrochemical and mARC-catalyzed enzymatic reduction of *p*-substituted benzamidoximes: Consequences for the prodrug concept “amidoximes instead of amidines“
ChemMedChem (2014) DOI: 10.1002/cmdc.201402437

Treuer E., Reichmann D., Bittner F., Mendel R. R., Clement B., Havemeyer A. (2012)

QSAR studies of the *N*-reduction of *p*-substituted benzamidoximes
Posterbeitrag, DPhG Jahrestagung, Greifswald

Treuer E., Reichmann D., Bittner F., Mendel R. R., Clement B., Havemeyer A. (2013)

N-reduction of *p*-substituted benzamidoximes by the mARC-containing enzyme system
Posterbeitrag, 2013 Molybdenum & Tungsten Enzymes Conference, Sintra, Portugal

Kiel, im Februar 2015

Eva Bauch

Kurzfassung

Die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC) wurde 2006 als viertes Molybdoenzym neben der Sulfitoxidase, Xanthinoxidoreduktase und Aldehydoxidase im menschlichen Organismus identifiziert. Gemeinsam mit Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 Reduktase bildet mARC ein Enzymsystem, welches die *N*-Reduktion zahlreicher *N*-hydroxylierter bzw. *N*-oxygenierter Verbindungen katalysiert und somit an der Aktivierung von Prodrugs und Inaktivierung von Arzneistoffen *in vivo* beteiligt ist. Ziel dieser Arbeit war es, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen am mARC-Enzymsystem zu untersuchen.

Anhand unterschiedlich substituierter Derivate des Modellsubstrats Benzamidoxim konnte gezeigt werden, dass die elektronischen Eigenschaften des Substituenten in *para*-Position, dargestellt durch die Hammett-Konstante, die physikochemischen Eigenschaften der Amidoximfunktion, repräsentiert durch die chemischen Verschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ und die Redoxpotentiale, beeinflussen. Zur Charakterisierung der enzymatischen Reduktion dieser Verbindungen wurden die kinetischen Parameter K_M und V_{\max} unter Verwendung der äußeren mitochondrialen Membranfraktion der Schweineleber sowie des humanen mARC1- bzw. mARC2-haltigen rekombinanten Enzymsystems als Proteinquelle bestimmt. Mittels Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass die hierbei detektierten Unterschiede weder durch die elektronischen Eigenschaften der Substituenten noch deren Lipophilie begründet sind. Bei der rationalen Entwicklung neuer Amidoxim-Prodrugs können diese Substituenteneigenschaften somit zumindest hinsichtlich der Bioaktivierung vernachlässigt werden. Elektronenziehende Substituenten begünstigten die elektrochemische Reduktion der untersuchten *para*-substituierten Benzamidoxime, nicht jedoch die enzymatische, mARC-katalysierte Reduktion.

Das Redoxverhalten von humanem mARC1 wurde mittels direkter Proteinelektrochemie analysiert und ein Prozess detektiert, an dem zwei Elektronen und zwei Protonen beteiligt waren.

Die mARC-vermittelte Inaktivierung *N*-hydroxylierter Sulfonamide, Entwicklungsprodukte aus der Klasse neuartiger HNO-Donoren zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen, wurde verglichen. Erste Hypothesen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen konnten formuliert werden, welche in weiteren Studien zu überprüfen sind.

Am Beispiel von 4-Nitrobenzamidoxim, 4-Nitrobenzamidin und Nitrobenzol konnte gezeigt werden, dass Nitrogruppen aromatischer Verbindungen unter aeroben Bedingungen nicht durch das mARC-Enzymsystem reduziert werden.

Abstract

The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) was identified in 2006 as the fourth molybdenum containing enzyme besides sulfite oxidase, xanthine oxidase, and aldehyde oxidase in humans. Together with cytochrome b₅ and cytochrome b₅ reductase, mARC forms an enzyme system which catalyzes the *N*-reduction of numerous *N*-hydroxylated and *N*-oxygenated compounds and is thus involved in activation of prodrugs and inactivation of drugs in vivo.

This study was conducted to gain knowledge about structure-activity relationships of the mARC-containing enzyme system.

The influence of the electronic properties of the substituent in *para*-position, represented by Hammett's σ , on the physicochemical properties of the amidoxime function, represented by the chemical shifts in ¹H-NMR and the redox potentials, was demonstrated using several derivatives of the model substrate benzamidoxime. The kinetic parameters K_M and V_{max} of the enzymatic reduction of these compounds were determined using outer mitochondrial membrane vesicles of porcine liver as well as the human mARC1- and mARC2-containing recombinant enzyme system. Correlation analysis led to the conclusion that differences detected for K_M and V_{max} are not due to the electronic properties or the lipophilicity of the substituents. Thus, these substituent properties can be ignored during the rational development of new amidoxime prodrugs, at least regarding bioactivation. Electron-withdrawing substituents facilitated the electrochemical reduction of the investigated *para*-substituted benzamidoximes, but not the enzymatic, mARC-catalyzed reduction.

The redox behavior of recombinant mARC1 was studied by direct proteinelectrochemistry and a process was detected in which two electrons and two protons were involved.

The mARC-mediated inactivation of *N*-hydroxylated sulfonamides, new drug candidates belonging to the class of HNO-donors for the treatment of cardiovascular diseases, was investigated. As a result, first assumptions about structure-activity relationships were formulated which need to be verified by further research.

Regarding 4-nitrobenzamidoxime, 4-nitrobenzamidine, and nitrobenzene, it could be demonstrated that the mARC-containing enzyme system is not capable of reducing nitro groups of aromatic compounds under aerobic conditions.