

Studien zur Beteiligung des mARC-Enzymsystems an kardiovaskulär relevanten Prozessen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Jennifer Schneider

Kiel 2018

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

29.03.2018

Erteilung der Druckreife:

29.03.2018

Dekanin Prof. Dr. Natascha Oppelt

Ist man in kleinen Dingen nicht geduldig, bringt man die großen Vorhaben zum Scheitern.

Konfuzius

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	1
1.1.1 Definition und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Verbreitung und Bedeutung	1
1.1.3 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose	3
1.1.4 Biomarker zur Früherkennung eines erhöhten kardiovaskulären Risikos.....	4
1.2 Trimethylamin-<i>N</i>-oxid.....	5
1.2.1 Entdeckung und Bedeutung für Bakterien.....	5
1.2.2 Vorkommen und Bedeutung in Eukaryoten.....	6
1.2.2.1 Wasserlebewesen.....	6
1.2.2.2 Menschen – über Trimethylaminurie bis zum humanen Darmmikrobiom.....	6
1.2.2.3 Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen	8
1.3 Stickstoffmonoxid	9
1.3.1 Entstehung und Wirkung im Organismus.....	9
1.3.2 Stickstoffmonoxid in der Arzneimitteltherapie.....	11
1.4 Molybdoenzyme.....	12
1.4.1 Übersicht.....	12
1.4.2 Molybdäncofaktorsynthese.....	13
1.4.3 Einteilung der eukaryotischen Molybdoenzyme in zwei Familien	15
1.4.4 Eukaryotische Molybdoenzyme.....	15
1.4.4.1 Pyridoxaloxidase und Nikotinathydroxylase	15
1.4.4.2 Nitratreduktase.....	15
1.4.4.3 Sulfitoxidase.....	16
1.4.4.4 Xanthinoxidoreduktase.....	16

1.4.4.5	Aldehydoxidase	16
1.4.4.6	Mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente	17
1.5	Das mARC-haltige N-reduktive Enzymsystem	18
1.5.1	Zusammensetzung, Lokalisation und Elektronentransport	18
1.5.2	Cytochrom b ₅	20
1.5.3	Cytochrom b ₅ Reduktase	21
1.5.4	Beteiligung des N-reduktiven Enzymsystems am Fremdstoffmetabolismus	21
1.5.5	Physiologische Funktion von mARC	22
1.5.5.1	Genetische Variabilität von mARC	22
1.5.5.2	Reduktion von N ^ω -Hydroxy-L-arginin	23
1.5.5.3	Reduktion und Detoxifizierung N-hydroxylierter Basenanaloga	24
1.5.5.4	Beteiligung von mARC am Energiestoffwechsel	24
1.5.5.5	mARC2-Knockout in Mäusen	25
1.6	Zielsetzung	29
2	METHODENENTWICKLUNG	31
2.1	Analytik von Trimethylamin	31
2.1.1	¹ H-NMR-Spektroskopie	31
2.1.2	Bildung und Vermessung von Pikraten	31
2.1.3	FIGD-IC-Analytik	32
2.1.4	HPLC-Analytik	32
2.1.5	Gaschromatographie	33
2.1.6	Massenspektrometrie	33
2.2	Anforderungen an Trimethylaminanalytik	34
2.3	Entwicklung einer Methylierungsstrategie zur Vorsäulenderivatisierung	34
2.4	Vorsäulenderivatisierung mit Benzylbromid	38
2.4.1	Interner Standard	38

2.4.2	Synthese des perdeuterierten Benzyltrimethylammoniumbromids	40
2.4.3	Derivatisierung	40
2.4.4	Umstellung auf LC/MS/MS Vermessung	40
2.4.5	<i>In situ</i> Derivatisierung	43
2.4.6	Testung verschiedener Trimethylamin- <i>N</i> -oxid-Chargen	43
2.5	Vorsäulenderivatisierung mit Benzylchlorid	44
2.5.1	Wiederfindung	44
2.5.2	Kalibrierung	45
2.6	Finale Methode	45
2.6.1	Auswahl Reagenz und Substrat-Charge	45
2.6.2	Nebenreaktion mit Trimethylamin- <i>N</i> -oxid	46
2.6.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	48
2.6.4	Probenvorbereitung	49
2.6.5	LC/MS/MS	49
3	EXPERIMENTELLE METHODEN	52
3.1	Gewinnung und Charakterisierung verschiedener Proteinquellen	52
3.1.1	Kultivierung von ZR-75-1 Zellen	52
3.1.2	Gewinnung der zellulären Proteine aus ZR-75-1 Zellen	52
3.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.1.4	SDS-PAGE und Westernblot	53
3.1.5	Gewinnung der porcinen Lebersubfraktionen	54
3.1.6	Expression und Reinigung der rekombinanten, humanen Proteine	55
3.1.7	Häm-Saturierung von Cytochrom b ₅	55
3.1.8	Bestimmung des Cofaktorgehalts der rekombinanten Proteine	55
3.1.8.1	Bestimmung des Mo-Gehalts von mARC	55
3.1.8.2	Bestimmung des Häm-Gehalts in Cytochrom b ₅	56

3.1.8.3	Bestimmung des FAD-Gehalts in Cytochrom b ₅ Reduktase.....	56
3.1.9	Gewinnung der murinen Leberhomogenate	56
3.2	Biotransformationsstudien	57
3.2.1	Überprüfung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität mit Benzamidoxim als Modellsubstrat	57
3.2.1.1	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit humanen ZR-75-1 Zellen.....	57
3.2.1.2	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit porcinen Lebersubfraktionen	57
3.2.1.3	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen	57
3.2.1.4	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit murinen Leberhomogenaten.....	58
3.2.1.5	HPLC-Analytik.....	58
3.2.2	Überprüfung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung aus Nitrit bzw. Glyceroltrinitrat	60
3.2.2.1	Stickstoffmonoxid-Bestimmung im Stickstoffmonoxid-Analyzer	60
3.2.2.2	Anaerobe <i>in vitro</i> Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen.....	60
3.2.2.3	Aerobe <i>in vitro</i> Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen.....	61
3.2.3	Überprüfung der <i>N</i> -Reduktion von Trimethylamin- <i>N</i> -oxid.....	62
3.2.3.1	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit humanen ZR-75-1 Zellen.....	62
3.2.3.2	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit porcinen Lebersubfraktionen	62
3.2.3.3	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen	62
3.2.3.4	<i>In vitro</i> Biotransformationsstudien mit murinen Leberhomogenaten.....	62
3.2.3.5	LC/MS/MS-Analytik	63
3.3	Knockout von mARC1 mittels CRISPR/Cas	63
3.3.1	Knockout-Methode	63
3.3.2	Design der sgRNAs.....	66
3.3.3	Klonierung.....	69
3.3.4	Transformation	71
3.3.5	Sequenzierung	72
3.3.6	Transfektion humaner ZR-75-1 Zellen	72
3.3.7	Selektion transfizierter Zellen	74

4	ERGEBNISSE	76
4.1	mARC-abhängige Stickstoffmonoxid-Freisetzung	76
4.2	Entgiftung von Trimethylamin- <i>N</i> -oxid	80
4.2.1	Untersuchung enzymatischer <i>in vitro</i> Testsysteme	80
4.2.2	Untersuchung der Trimethylamin- <i>N</i> -oxid-Reduktion mittels Knockoutmausmodell	87
4.3	Knockout von hmARC1 in ZR-75-1 Zellen	88
5	DISKUSSION	93
5.1	mARC-abhängige Stickstoffmonoxid-Freisetzung	93
5.1.1	Untersuchung von Nitrit und Glyceroltrinitrat als potentielle mARC-Substrate	93
5.1.2	Ausblick	94
5.2	Entgiftung von Trimethylamin- <i>N</i> -oxid	95
5.2.1	Trimethylamin-Analytik	95
5.2.2	Enzymatische Trimethylamin- <i>N</i> -oxid-Reduktion	97
5.2.3	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid-Reduktion durch mARC2-Knockoutmäuse	100
5.2.4	Ausblick	101
5.3	Knockout von hmARC1 in ZR-75-1 Zellen	102
5.3.1	Generierung eines Knockouts mittels CRISPR/Cas	102
5.3.2	Ausblick	107
6	ZUSAMMENFASSUNG	110
7	MATERIALIEN UND GERÄTE	114
7.1	Materialien und Reagenzien	114
7.2	Geräte	116
7.3	Antikörper, Enzyme und Plasmide	117
8	LITERATUR	118

ANHANG	135
Erklärung zu §7 und §8 der Promotionsordnung	148
Danksagung	150
Kurzfassung	152
Abstract	153

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AUC	Peakfläche (<i>area under the curve</i>)
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
bp	Basenpaare
BTMA	Benzyltrimethylammoniumkation
BTMA-d ₉	perdeutertes BTMA
Cas	CRISPR-assoziierte Proteine
cPMP	zyklisches Pyranopterinmonophosphat
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced palindromic repeat</i>
crRNA	CRISPR-RNA
CVD	kardiovaskuläre Erkrankungen (<i>cardiovascular diseases</i>)
Cyb5	Cytochrom b ₅
Cyb5R	Cytochrom b ₅ Reduktase
CYP450	Cytochrom P450
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronenspinresonanz (<i>electron paramagnetic resonance</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
FIGD-IC	<i>flow injection gas diffusion-ion chromatography</i>
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HDR	<i>homology-directed repair</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
IPGTT	intraperitonealer Glukose-Toleranztest
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
KO	Knockout
l	Liter (m = milli; μ = mikro)
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
M	molar (mol/l; m = milli; μ = mikro; n = nano; p = pico)
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
mARC	mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente
MeOH	Methanol
MES	2-(Morpholino)ethansulfonsäure

Min.	Minuten
Mo	Molybdän
Moco	Molybdäncofaktor
MOCS	Molybdäncofaktorsynthese
mol	Mol (m = milli; μ = mikro; n = nano; p = pico)
MOSC	Moco Sulfurase C-terminale Domäne
MPT	Molybdopterin
MPT-AMP	Molybdopterin-Adenosinmonophosphat
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form als Dinatriumsalz)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NHEJ	<i>nonhomologous end-joining</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOHA	<i>N^ω-Hydroxy-L-arginin</i>
OMV	äußere mitochondriale Membranfraktion (<i>outer mitochondrial membrane vesicles</i>)
PAM	<i>protospacer-adjacent-motif</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PNS	postnukleärer Überstand (<i>post nuclear supernatant</i>)
PPI	Präpulsinhibition
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
sgRNA	<i>single guide</i> RNA
SHIRPA	<i>SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment</i>
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SO	Sulfitoxidase
Std.	Stunde
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween®-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMA	Trimethylamin Hydrochlorid
TMA-d ₉	perdeuteriertes TMA
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
TMAU	Trimethylaminurie
tracrRNA	<i>transactivating cr</i> RNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreduktase

1 EINLEITUNG

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

1.1.1 Definition und Risikofaktoren

Der Überbegriff kardiovaskuläre Erkrankungen, im Englischen *cardiovascular diseases* (CVD), beschreibt eine Vielzahl von Erkrankungen, die alle das Herz bzw. das Blutgefäßsystem betreffen. [1] Sie können langfristig, aber auch akut zur Minderversorgung verschiedener Gewebe führen, die schwerwiegende Folgen für den Betroffenen haben kann. Bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) beispielsweise können die Herzkranzgefäße durch atherosklerotische Veränderungen verhärten und verdicken und somit keine ausreichende Sauerstoffversorgung des Herzmuskels mehr gewährleisten. Je nach Schweregrad kann diese Erkrankung symptomlos verlaufen, sie kann aber auch zur Herzinsuffizienz und/oder zu akuten Ereignissen wie der Angina pectoris oder dem Myokardinfarkt führen. [2] Neben der KHK zählen zum Beispiel zerebrovaskuläre Erkrankungen, periphere Arterienerkrankungen, rheumatische Herzerkrankung, angeborene Herzfehler und tiefe Beinvenenthrombosen zu den CVD. Oftmals bleiben diese Erkrankungen unentdeckt, bis es zu einem akuten Ereignis wie einem Myokard- oder einem Hirninfarkt kommt. Es ist allgemein akzeptiert, dass klinisch messbare Parameter wie ein erhöhter Blutdruck, erhöhte Blutglukose, erhöhte Blutfette, Übergewicht und Adipositas Risikofaktoren für CVD darstellen. Sie gelten allerdings als intermediäre Risikofaktoren, die selbst sehr verschiedene Ursachen haben können. Diese sind oftmals im Verhalten und in der Lebensweise der Betroffenen zu suchen. Rauchen, Alkoholabusus, körperliche Inaktivität und eine ungesunde Ernährung stehen dabei im Fokus und verursachen letztendlich ein erhöhtes Risiko, einen Myokard- oder Hirninfarkt zu erleiden. Durch Anpassung des Lebensstils lässt sich das CVD-Risiko jedoch senken, beispielsweise durch Verzicht auf Tabak und regelmäßige körperliche Aktivität. Zusätzlich müssen die intermediären Risikofaktoren, also z.B. ein Bluthochdruck oder ein Diabetes mellitus, adäquat behandelt werden. [1]

1.1.2 Verbreitung und Bedeutung

Durch den häufig symptomlosen Verlauf werden viele CVD nicht erkannt, bis sie zu einem Myokard- oder Hirninfarkt führen. [1] Trotz einer ständigen Weiterentwicklung der Therapiemaßnahmen bleiben diese Ereignisse lebensbedrohlich und fordern eine intensivmedizinische Behandlung. Der Myokardinfarkt ist in Deutschland aktuell die zweithäufigste Todesursache insgesamt, unter den Krankheiten sind CVD mit ca. 39 % die häufigste Todesursache (s. Abbildung 1.1). Damit sterben

ca. 14 % mehr Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems als an Krebs. [3] Doch nicht nur in der Bundesrepublik zählen die meisten krankheitsbedingten Todesfälle zu den CVD, allein im Jahr 2015 starben weltweit ca. 17,7 Millionen Menschen auf Grund von Herz-Kreislauf-erkrankungen. Prozentual betrachtet sind das etwa 31 % aller weltweiten Todesfälle und damit die häufigste Todesursache. [1]

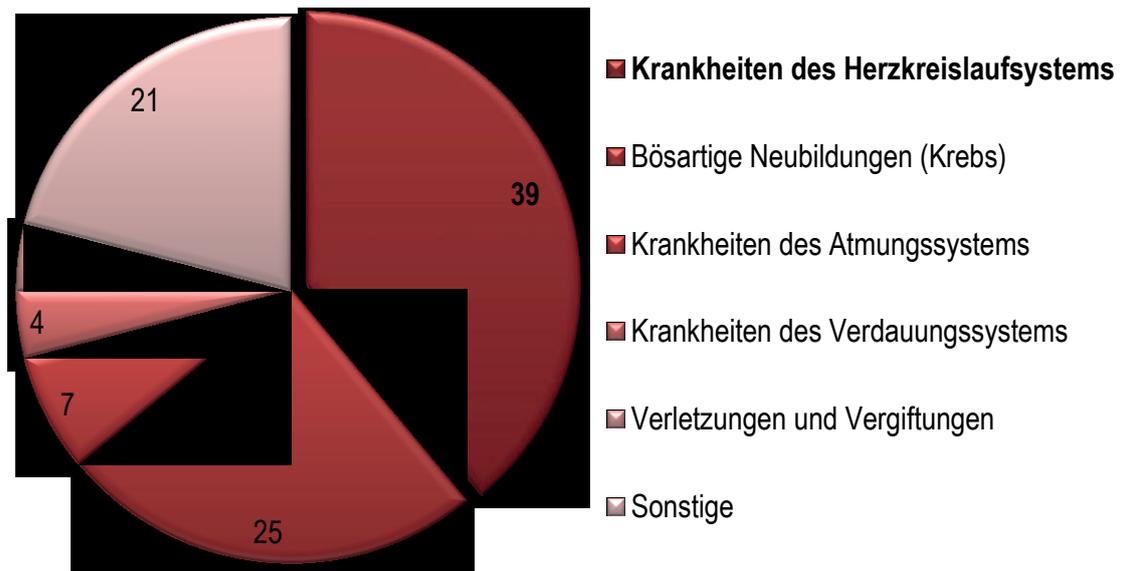


Abbildung 1.1: Todesursachen nach Krankheitsarten in Deutschland

Die Abbildung zeigt eine Auswertung des Statistischen Bundesamts (aktualisiert 2017) von insgesamt 925200 Todesfällen im Jahr 2015 und gibt eine prozentuale Verteilung der Todesursachen nach Krankheitsart wieder. [3]

CVD verursachten allein im Jahr 2015 46,4 Milliarden Euro Kosten und belegen damit auch in der Kategorie Krankheitskosten in Deutschland den ersten Platz. Somit haben CVD eine große Bedeutung in der deutschen Volkswirtschaft und gelten als eine der wichtigsten Volkskrankheiten. [4]

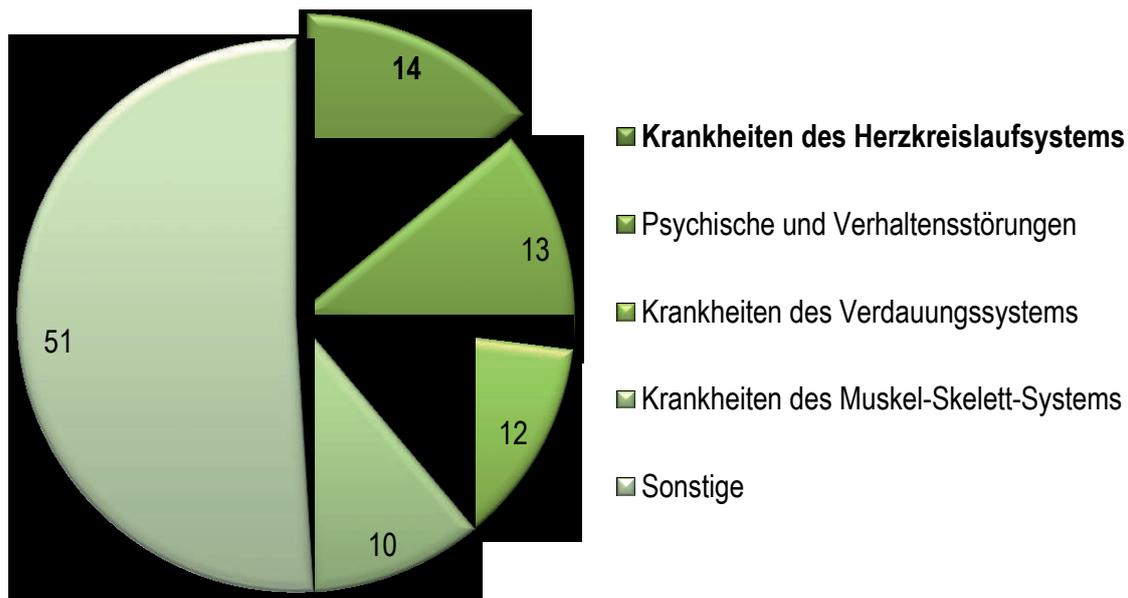


Abbildung 1.2: Krankheitskosten nach Krankheitsarten in Deutschland

Die Abbildung zeigt eine Auswertung des Statistischen Bundesamts (aktualisiert 2017) von insgesamt 338,2 Milliarden Euro Krankheitskosten im Jahr 2015 und gibt eine prozentuale Verteilung der Kosten nach Krankheitsart wieder. [4]

1.1.3 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

Die endotheliale Dysfunktion ist häufig an der Pathogenese von CVD beteiligt und bezeichnet eine Funktionsstörung des Gefäßendothels. Das gesunde Endothel reguliert den Gefäßtonus, die antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand sowie deren Architektur und Permeabilität. [5] Stickstoffmonoxid (NO), bei seiner Entdeckung zunächst *Endothelium-Derived Relaxing Factor* (EDRF) genannt, wird durch das intakte Endothel freigesetzt und wirkt als Vasodilatator. [6] Insbesondere die NO-Freisetzung ist bei der endothelialen Dysfunktion gestört, daher werden die endotheliale Dysfunktion und die Störung des endothelialen NO-Metabolismus häufig als Synonyme verstanden. [5] Die vaskuläre Homöostase gerät aus dem Gleichgewicht und es kommt zu einer Beeinträchtigung der Endothel-gesteuerten Vasodilatation. Zusätzlich wird durch proinflammatorische, proliferative und prokoagulatorische Prozesse die Entstehung von Atherosklerose gefördert. [7, 8]

Bei der Atherosklerose kommt es zur Verhärtung von Arterien. Dieser Prozess basiert auf strukturellen und funktionellen Veränderungen innerhalb der Gefäßwände. Zum einen lässt sich beobachten, dass glatte Muskelzellen aus der Media heraus in die Intima einwandern und dort proliferieren. Zum anderen findet eine Einlagerung von Lipiden und Cholesterinestern in der Intima statt, wobei hier sowohl glatte Muskelzellen als auch Makrophagen beteiligt sind. Insbesondere Makrophagen können über Scavenger-Rezeptoren oxidiertes *low density lipoprotein* (LDL) aufnehmen, was als einer der

Kernprozesse bei der Bildung sogenannter Schaumzellen angesehen wird. Solche Schaumzellen sind im Grunde fettbeladene Makrophagen und glatte Muskelzellen, die zu einer Entzündung der Gefäßwand führen können. Es kommt zum Gewebeumbau und zur Entstehung atherosklerotischer Plaques. Sie engen das arterielle Lumen ein, erhöhen den Gefäßtonus bei gleichzeitigem Verlust der Elastizität und beeinflussen die Strömungseigenschaften des Bluts. Stabile Plaques sind für die meisten Patienten dennoch zunächst symptomlos. Kommt es jedoch zur Ruptur eines Plaques, so ist ein Gefäßverschluss die Folge. Je nach Lokalisation kann es zu einer Lungenembolie, einem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall kommen. [9, 10, 8]

1.1.4 Biomarker zur Früherkennung eines erhöhten kardiovaskulären Risikos

Trotz der in 1.1 und 1.1.3 beschriebenen Kenntnis über Risikofaktoren bleiben die kausalen Auslöser kardiovaskulärer, akuter Ereignisse in den meisten Fällen unbekannt. [11] Neben einer gesunden Lebensweise und einer regelmäßigen Überwachung der intermediären Risikofaktoren besteht daher ein großer Bedarf nach verbesserten Therapie- und auch Diagnosemethoden, um die Mortalitätsrate insgesamt zu senken. Dabei spielen metabolomische Studien eine große Rolle. Durch die Untersuchung des Metaboloms verspricht man sich tiefere und umfassendere Einblicke in komplexe biologische Abläufe, sodass pathophysiologische Prozesse aufgeklärt und die Diagnose und Behandlung verschiedener Erkrankungen verbessert werden können. [12] Das Metabolom beschreibt dabei die Gesamtheit aller Metabolite eines Organismus und lässt sich unterteilen in das endogene Metabolom (bestehend aus endogenen Metaboliten), das mikrobielle Metabolom (bestehend aus Metaboliten der Mikroflora) und das Xenometabolom (bestehend aus Fremdstoffmetaboliten aus beispielsweise Umweltgiften, Nahrung oder Arzneistoffen). [13, 14] Bei einer Erkrankung, so die Annahme, entsteht durch eine Störung verschiedener biochemischer Prozesse ein charakteristischer, metabolomischer Fingerabdruck, der eine weitaus größere Aussagekraft hat als einzelne Metaboliten. [12] Eine solche Signatur wurde in einer metabolomischen Studie für CVD entdeckt, die die Arbeitsgruppe um Hazen im Jahr 2011 veröffentlichte. [15] Bei der Suche nach neuen Biomarkern im Plasma, die eine Vorhersage über das individuelle, kardiovaskuläre Risiko eines Patienten erlauben, konnten drei Verbindungen identifiziert werden: Cholin, Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Betain. Alle drei Verbindungen sind Metabolite des Nahrungslipids Phosphatidylcholin. Es stellte sich heraus, dass es einen bis dahin unbekanntem Zusammenhang zwischen Nahrungsfetten, der Darmflora und Atherosklerose gibt. Phosphatidylcholin- bzw. cholinhaltige Lebensmittel werden im Darm durch Darmbakterien zu Trimethylamin (TMA) metabolisiert. Dieses wird resorbiert, zur Leber transportiert und dort durch Flavinhaltige Monooxygenasen (FMOs) zu TMAO oxidiert. Es konnte gezeigt werden, dass TMAO proatherosklerotische Effekte aufweist und dadurch das kardiovaskuläre Risiko erhöht. [15]

Diese neue Erkenntnis rückte den physiologischen Metaboliten TMAO in den Fokus aktueller Forschung. Obwohl TMAO bereits seit vielen Jahren bekannt war, wurden dieser Verbindung jedoch bislang keine pathologischen bzw. toxischen Eigenschaften zugeordnet. Seither haben sich viele verschiedene Arbeitsgruppen mit dem Metabolismus von TMAO und dem kausalen Zusammenhang zwischen erhöhten TMAO-Plasmaspiegeln und erhöhtem CVD-Risiko beschäftigt. In Kapitel 1.2 soll ein Überblick über den aktuellen Kenntnisstand gegeben werden.

1.2 Trimethylamin-*N*-oxid

1.2.1 Entdeckung und Bedeutung für Bakterien

Die erste wissenschaftliche Betrachtung von TMAO ist einem Zufall zu verdanken. Bei der Erforschung des Stoffwechsels von Knorpelflossern stieß Suwa zufällig auf das Aminoxid TMAO. [16] Es war bereits bekannt, dass der charakteristische Geruch von verrottendem Fisch hauptsächlich durch das Amin TMA verursacht wird. [17] So schloss Suwa, dass TMA durch die mikrobielle Reduktion von TMAO entstehen könnte. [18] Zahlreiche Wissenschaftler konnten diese Hypothese bestätigen. Inzwischen ist gesichert, dass TMAO als Elektronenakzeptor im anaeroben Stoffwechsel verschiedener Bakterien dient. [19] Hierzu zählen insbesondere Bakterien aus der marinen Umgebung wie *Alteromonas* oder *Vibrio* sowie Enterobakterien, aber auch Photosynthese betreibende Bakterien aus stehenden Gewässern wie *Rhodobacter* species. [19, 20] Das entsprechende Enzym wurde kurzerhand TMAO-Reduktase genannt. [19] Bereits in den 70er und 80er Jahren fanden verschiedene Arbeitsgruppen Hinweise darauf, dass die TMAO-Reduktase in *E. coli* und *Salmonella* ein molybdänhaltiges Enzym sein muss. [19] So konnte beispielsweise festgestellt werden, dass die Synthese der TMAO-Reduktase davon abhängig ist, dass das Nährmedium Molybdän enthält. [21] Außerdem kann die inaktive Form des Enzyms, die unter dem Einfluss von Wolfram-haltigem Nährmedium entsteht, durch den Zusatz von Natriummolybdat in die aktive Form überführt werden. [22] Bestätigt wurde die Hypothese letztendlich mit dem Nachweis, dass *E. coli*-Mutanten, die in ihrer Molybdäncofaktor (Moco)-Synthese eingeschränkt sind, keine TMAO-Reduktion durchführen können. [21] Diese bakteriellen Molybdoenzyme lassen sich nach ihrer Substratspezifität in zwei Gruppen einteilen: a) TMAO-Reduktasen mit einer hohen Substratspezifität für TMAO und b) DMSO/TMAO-Reduktasen, die sowohl *N*- als auch *S*-Oxide reduzieren können. [20] Die Reduktion von TMAO zu TMA ermöglicht den Bakterien dabei, den Stoffwechsel auch unter anaeroben Bedingungen aufrecht zu erhalten, indem TMAO als alternativer Elektronenakzeptor der Atmungskette genutzt wird. [20]

1.2.2 Vorkommen und Bedeutung in Eukaryoten

1.2.2.1 Wasserlebewesen

Viele Lebewesen leben im Medium Wasser und sind damit einem gewissen Umgebungsstress ausgesetzt, der zum Beispiel auf einem hohen Salzgehalt, möglicher Austrocknung und/oder tiefen Temperaturen und der Gefahr des Gefrierens beruht. Zum Schutz enthalten einige Spezies Osmolyte, die sich intra- oder auch extrazellulär befinden können. Urea ist beispielsweise eine Verbindung, die in sehr vielen Organismen vorkommt. Sie entsteht beim Stickstoffmetabolismus und kann von manchen Spezies angereichert werden, um so als Osmolyt im Blut bzw. in den Zellen zu wirken. Die Urea-Konzentrationen können dabei sehr hohe Werte bis zu ca. 400 mM erreichen, was insofern bemerkenswert ist, als Urea bereits in geringeren Konzentrationen störenden Einfluss auf Proteine und Makromoleküle hat. Das Vorhandensein weiterer Osmolyte, nämlich Methylamine wie TMAO, kann diesen schädlichen Effekt allerdings begrenzen. Beispielweise kann Urea ein Enzym derart beeinflussen, dass der K_m -Wert einer Reaktion steigt, während TMAO allein diesen senkt. Im richtigen Verhältnis zueinander können beide gemeinsam den K_m -Wert stabil erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass ein Konzentrationsverhältnis von Urea zu Methylaminen von ca. 2:1 die störenden Effekte ausgleicht und so ein ideales Osmolytengemisch entsteht. [23, 24]

Untersuchungen zeigten, dass es zwischen TMAO und dem Proteinbackbone zu eher ungünstigen thermodynamischen Wechselwirkungen kommt, die den denaturierten Zustand des Proteins destabilisieren und dadurch eine Rückführung in den Zustand nativer Faltung begünstigen. TMAO fördert die Proteinfaltung zu spezifischen, biologisch relevanten Zuständen und übt somit eine Schutzwirkung gegenüber schädigenden Einflüssen aus, wie sie durch den oben beschriebenen Umgebungsstress auftreten können. [23–27]

Wie in 1.2.1 beschrieben gibt es insbesondere in der marinen Umgebung Prokaryoten, die TMAO als Substrat zu TMA umsetzen können. Die TMA-Bildung führt zu dem charakteristischen Geruch verrottenden Fisches, der durch die niedrige Geruchsschwelle von TMA schon frühzeitig erkennbar ist und einen Indikator für die Frische von Fisch und Meeresfrüchten darstellt. Damit ist die TMA-Analytik für die Lebensmittelindustrie von Interesse (s. auch 2.1). [28–30]

1.2.2.2 Menschen – über Trimethylaminurie bis zum humanen Darmmikrobiom

1970 berichteten Humbert und Kollegen erstmals über einen Fall von Trimethylaminurie (TMAU), auch *Fish-Odor-Syndrome* genannt. Ihre junge Patientin sonderte einen fischartigen Geruch ab, der bei weiterführenden Untersuchungen einer übermäßigen TMA-Produktion zugeordnet werden konnte. Im

Verlauf der nächsten zwei Jahre erforschten die Wissenschaftler den Ursprung der hohen TMA-Konzentrationen und fanden heraus, dass TMA in einer gesunden Leber zu TMAO oxidiert wird, dies jedoch bei der betroffenen Patientin nicht der Fall war. [31, 32] TMAU ist aber keineswegs eine Erkrankung des neueren Zeitalters, sondern findet bei genauerer Betrachtung bereits Erwähnung in einigen historischen Schriften. So beschreibt bereits Shakespeare in seinem Stück *The Tempest* einen Menschen, der nach heutigem Kenntnisstand an TMAU litt: *“What have we here? a man or a fish? Dead or alive? A fish: he smells like a fish; a very ancient and fish-like smell; a kind of not of the newest Poor John”* (*The Tempest* II. ii. 26–29) (Als *“Poor John”* bezeichnete man damals einen gesalzenen und getrockneten Hecht.) [33]

Inzwischen ist bekannt, dass Nahrungsbestandteile, die Phosphatidylcholin, Cholin oder L-Carnithin enthalten, durch Bakterien des humanen, im Darm angesiedelten Mikrobioms zu TMA metabolisiert werden. Nach der Resorption wird TMA durch hepatische FMOs zu TMAO oxidiert und mit einer renalen Clearance von 219 ± 78 ml/Min. eliminiert. [15, 33–36]

Hauptverantwortlich für die TMA-Oxidation ist dabei die Isoform 3 der FMO (FMO3). Es sind Mutationen der FMO3 bekannt, die die Aktivität des Enzyms lediglich reduzieren, es gibt jedoch auch solche, die zu einer vollständigen Inaktivität führen. Mitchell und Smith (2001) zeigen in ihrer Arbeit eine Übersicht über bekannte Polymorphismen der FMO3, die auf beeindruckende Weise verdeutlicht, wie es durch eine genetische Disposition zu einer TMAU kommen kann. [33, 37] Die klinischen Folgen für betroffene Patienten manifestieren sich hauptsächlich in psychosozialen Einschränkungen. Durch die Ausscheidung von TMA in Urin, Atem, Schweiß und anderen Körperflüssigkeiten und dem damit verbundenem Körpergeruch kann es zu sozialer Isolation mit Folgen für die persönliche Entwicklung kommen. Nicht selten wird auch von Depressionen berichtet, wobei nicht abschließend aufgeklärt ist, ob diese aus sozialer Isolation oder aus einem gestörten Metabolismus endogener Amine wie beispielsweise Tyramin resultieren. [33]

Um eine TMAU zu diagnostizieren, wird der Urin des Patienten untersucht und die TMA- und TMAO-Konzentrationen bestimmt. Es wird das Verhältnis von TMAO zu TMA ermittelt, das bei Gesunden größer 20 ist. Bei einem Wert kleiner 2 spricht man von TMAU. Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt Schätzungen zufolge bei etwa 1 %, wobei von einer großen Dunkelziffer ausgegangen wird. [33, 38, 39]

Der Begriff des Mikrobioms wurde erstmals von Joshua Lederberg geprägt, seines Zeichens Molekularbiologe, Genetiker und Nobelpreisträger (1958 Nobelpreis in Physiologie oder Medizin für *Entdeckungen über genetische Neukombinationen und Organisation des genetischen Materials bei Bakterien* [40]). Er erkannte, dass die Betrachtung des menschlichen Genoms, bestehend aus der

chromosomalen DNA des Zellkerns (Karyom) und der mitochondrialen DNA (Chondriom) nicht ausreicht, um die komplexen Zusammenhänge des menschlichen Organismus zu beleuchten. Vielmehr muss auch das Mikrobiom als Gesamtheit aller Gene der den Menschen besiedelnden Mikroorganismen mit berücksichtigt werden. [41] Wir existieren als sogenannter Metaorganismus, ein Zusammenschluss mehrerer Organismen, die auf einander angewiesen sind und sich gegenseitig beeinflussen. [42] Hervorzuheben ist, dass ein Mensch von ca. 10^{14} Mikroorganismen besiedelt wird und damit etwa 10- bis 100-mal mehr Bakterienzellen enthält als körpereigene Zellen. Die meisten Bakterien befinden sich im Gastrointestinaltrakt, man spricht hier auch vom Darmmikrobiom. [43] Das Darmmikrobiom gilt auf Grund seiner Fähigkeit, Botenstoffe zu sezernieren, auch als Pseudo-Organ bzw. endokrines Organ. Durch die Bakterien entstehen Verbindungen wie TMA/TMAO, kurzkettige Fettsäuren, Katecholamine und andere Verbindungen, die im Wirtsorganismus diverse Reaktionen hervorrufen. Sie gelten folglich als Hormone bzw. hormonartige Verbindungen. Obwohl das Darmmikrobiom relativ widerstandsfähig ist, unterliegt es doch einer gewissen Dynamik. Seine Zusammensetzung kann durch Prozesse wie die Alterung des Wirts oder äußere Umweltfaktoren beeinflusst werden, darüber hinaus verändern verschiedene Erkrankungen oder medikamentöse Therapien die Bakterienvielfalt. Als Beispiel sei hier die Antibiose genannt, die das Gleichgewicht des Darmmikrobioms unter Umständen empfindlich stören kann. [42]

Des Weiteren beeinflussen unsere Ernährungsgewohnheiten unser Darmmikrobiom. So ist bei Omnivoren beispielsweise eine deutliche TMA/TMAO-Produktion nachzuweisen, während Vegetarier und Veganer kaum TMA/TMAO produzieren können. Zum einen liegt das daran, dass Vegetarier und Veganer weniger cholin-, L-carnithin- und phosphatidylcholinreiche Lebensmittel zu sich nehmen. Hierzu zählen insbesondere rotes Fleisch, Eier, Milch und Milchprodukte, Fisch und Meerestiere. Interessanterweise konnten aber auch nach oraler Gabe von L-Carnithin keine erhöhten TMAO-Level festgestellt werden, was auf einen verminderten mikrobiellen Metabolismus des L-Carnithins hindeutet. Zum anderen scheint also das Darmmikrobiom von Vegetariern und Veganern anders zusammengesetzt zu sein als das von Omnivoren. Obwohl schon einige TMA-produzierende bakterielle Enzyme und damit auch die jeweilige Spezies des Darmmikrobioms identifiziert werden konnten, ist das Bild noch unvollständig und Gegenstand aktueller Forschung. [42, 44]

1.2.2.3 Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen

Wie bereits in 1.1.4 beschrieben, gilt TMAO nach jüngsten Erkenntnissen als Risikofaktor für CVD. Ein kausaler Zusammenhang ist dabei unbestritten, jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Zahlreiche Forschungsgruppen weltweit beschäftigen sich mit der Aufgabe, die pathogenen Mechanismen zu

ergründen. Tang und Hazen, zwei der Wissenschaftler, die seit der ersten Stunde maßgeblich an der aktuellen TMAO-Forschung beteiligt sind, fassen die bisherigen Kenntnisse in einem aktuellen Review (2017) zusammen. [11] Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte TMAO-Plasma-Konzentrationen proatherosklerotische Effekte haben. Der TMAO-Plasma-Spiegel korreliert dabei mit der Größe atherosklerotischer Plaques. Zusätzlich ist TMAO assoziiert mit vulnerablen Koronarplaques und Plaquerupturen. [45, 46] TMAO hat auch einen direkten Einfluss auf Thrombozyten, indem es die Calciumfreisetzung beeinflusst. Die vermehrte Calciumfreisetzung wird Stimulus-unabhängig über verschiedene Agonisten wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin, Kollagen, Arachidonsäure und andere vermittelt. TMAO-abhängig kommt es schließlich zur Thrombozytenaktivierung und folglich zu einem erhöhten Thromboserisiko. [47] Auch ein Zusammenhang zwischen TMAO und Diabetes mellitus bzw. einer Insulinresistenz wird diskutiert. Beispielweise wurden bei Diabetes-Patienten teils höhere TMAO-Plasma-Spiegel gefunden als bei der gesunden Kontrollgruppe. Weitere Untersuchungen stehen allerdings noch aus. [11] TMAO stört den Cholesteroltransport, genauer gesagt fördert es den vorwärts gerichteten Cholesteroltransport bei gleichzeitiger Verminderung des reversen Cholesteroltransports. Zusätzlich werden die Zusammensetzung und die Größe des Gallensäurepools beeinflusst. [44] Auch auf die Niere und die Entwicklung einer chronischen Nierenfunktionsstörung wurden pathogene Effekte entdeckt. Insgesamt weisen die bisherigen Daten darauf hin, dass TMAO Gefäßentzündungen und -verletzungen sowie prothrombotische und fibrotische Prozesse fördert, was die Entstehung von CVD begünstigen kann. [11] Bisher ist noch kein eukaryotisches Enzym beschrieben, das TMAO *in vivo* reduzieren könnte.

1.3 Stickstoffmonoxid

1.3.1 Entstehung und Wirkung im Organismus

Stickstoffmonoxid (NO) ist eine radikalische Verbindung aus Sauerstoff und Stickstoff, die zur Gruppe der Stickoxide gehört. Um das ungepaarte Elektron zu stabilisieren, kann NO verschiedene Reaktionen eingehen. Zum einen können Verbindungen, die ebenfalls ein ungepaartes Elektron besitzen, als Reaktionspartner dienen, zum anderen kann NO mit Übergangsmetallen interagieren. [48]

Die Entdeckung, dass der bereits in den 80er Jahren von Furchgott entdeckte *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) NO ist, wurde 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin honoriert. [6, 48, 49] NO wird durch NO-Synthasen (NOS) produziert. Bisher sind drei Isoformen der NOS bekannt: die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Zusätzlich wurde über eine mitochondriale NOS (mtNOS) berichtet, bei der es sich um eine Variante der nNOS handeln soll, die durch posttranslationale Modifikationen entsteht. [50] Alle NOS nutzen L-Arginin als Substrat und

setzen es mit Hilfe von Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH) und Sauerstoff zu NO und L-Citrullin um. Als Intermediat entsteht dabei *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA). [51] NO kann auch durch Reduktion von Nitrit entstehen. Eine NO-Freisetzung aus Nitrit unter anaeroben Bedingungen konnte für das molybdänhaltige Enzym mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) in *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden. [52] Die Wirkungen von NO sind vielfältig und noch heute Gegenstand der Forschung. Im Folgenden soll ein Überblick gegeben werden.

Da NO ungeladen und gut löslich in hydrophoben Umgebungen ist, kann es biologische Barrieren wie Zellmembranen überwinden und auch entfernt seines Entstehungsortes Wirkung entfalten. Die Halbwertszeit von NO hängt dabei davon ab, welchen Reaktionspartnern es ausgesetzt ist und liegt zwischen 2 mSek. bis >2 Sek. [48] Über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase bewirkt NO einen Anstieg der zyklischen Guanosinmonophosphatkonzentration (cGMP-Konzentration), die zur Relaxation glatter Muskelzellen führt. Im Endothel bedeutet dies eine Vasodilatation. [53] Weiterhin inhibiert NO die Aktivierung und Adhäsion neutrophiler Granulozyten, die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die Expression proinflammatorischer Zytokine. Insgesamt übt NO damit wichtige Funktionen zum Schutz des Endothels aus. [54] Durch die hohe Affinität von NO zu Häm-Eisen und Nicht-Häm-Eisen kann es zu Interaktionen mit Häm-haltigen Enzymen kommen. Die NO-vermittelte Hemmung der mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase ist dabei gut untersucht. Die Cytochrom-c-Oxidase ist ein Enzym der mitochondrialen Atmungskette und reduziert Sauerstoff zu Wasser. Gleichzeitig vermittelt sie den Protonentransport über die Mitochondrienmembran. Der Einfluss von NO auf dieses Enzym wird als modulierender Effekt auf den Sauerstoffverbrauch und damit auf die Bioenergetik der Zellen gewertet. Zugleich wird der Elektronenfluss durch die Elektronentransportkette vermindert und vermehrt Superoxidanionen generiert. Außerdem wird diskutiert, dass NO durch Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase die Signaltransduktion beeinflusst, indem es die Bildung von Wasserstoffperoxid fördert. [54, 55] Trifft NO mit Superoxidanionen zusammen, so kommt es zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻). Diese reaktive Verbindung ist an der Oxidation und Nitrierung von Proteinen, Lipiden und DNA beteiligt. Sie reagiert beispielsweise mit Methionin und Cystein, aber auch mit Tryptophan oder Tyrosin. 3-Nitrotyrosin konnte insbesondere in entzündeten Geweben nachgewiesen werden. Durch die Nitrierung des Tyrosins ist die Proteinphosphorylierung vermindert, was die Signaltransduktion beeinflusst. ONOO⁻ gilt damit als proinflammatorisch. [48, 54, 55] Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht über die Entstehung und Reaktionen von NO.

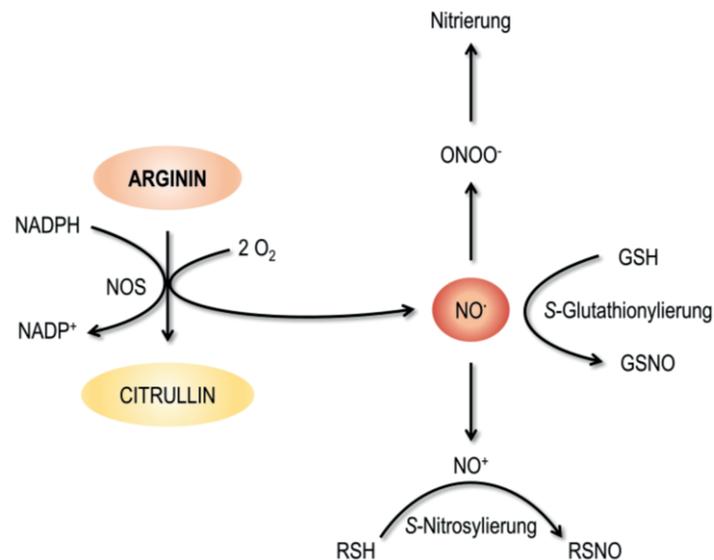


Abbildung 1.3: Entstehung und Reaktionen von Stickstoffmonoxid (modifiziert nach Singh und Gupta [55])

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch NO-Synthasen (NOS) freigesetzt, dabei wird Arginin unter Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH)- und Sauerstoffverbrauch zu NO und Citrullin umgesetzt. NO kann Membranen überwinden und je nach Umgebung mit verschiedenen Reaktionspartnern interagieren. S-Nitrosylierungen sowie S-Glutathionylierungen sind die Folge, es kann aber auch zur Entstehung von Peroxynitrit (ONOO⁻) kommen, was wiederum zu Nitrierungen führt. Durch S-Nitrosylierungen wird eine NO-Gruppe an ein Schwefel angefügt, sodass Nitrosothiole (RSNO) entstehen. Hiervon sind z. B. Cysteinreste betroffen. Bei den S-Glutathionylierungen entsteht aus Glutathion (GSH) Nitrosoglutathion (GSNO), welches NO auf andere Proteine übertragen kann. Unter der Nitrierung versteht man die Einführung einer Nitrogruppe (-NO₂), die im Falle von Tyrosin zum 3-Nitrotyrosin führt.

1.3.2 Stickstoffmonoxid in der Arzneimitteltherapie

Der Einsatz sogenannter NO-Donatoren begann bereits lange bevor die vasodilatierende Wirkung von NO bekannt war und ist in der Entdeckung von Glyceroltrinitrat (GTN) begründet (s. Abbildung 1.4). Sobrero stellte erstmals GTN her und veröffentlichte seine Ergebnisse 1847. Aus ungeklärten Beweggründen probierte er seine Entdeckung und stellte fest, dass selbst kleinste Mengen der Substanz zu andauernden, schwerwiegenden Kopfschmerzen führen. Der Homöopath Hering unternahm daraufhin 1849 Untersuchungen mit gesunden Probanden und konnte die Berichte Sobreros bestätigen. GTN wurde in Glonoin umbenannt und fand als Mittel gegen Kopfschmerzen Einzug in die homöopathische Heilkunde. Erst 1858 wurde GTN erstmals bei einer Patientin mit starken Schmerzen in der Brust eingesetzt, was sowohl auf die Erfahrungen mit GTN als Homöopathikum, insbesondere auf dessen Nebenwirkungen, als auch auf vorherige Versuche mit Amylnitrat zurückzuführen ist. GTN wurde letztlich Ende des 19ten Jahrhunderts als Therapeutikum der Angina pectoris etabliert. 1890 gehörte Alfred Nobel zu den Patienten, denen GTN verordnet wurde. Nobel erfuhr wenige Jahre nach Sobreros Entdeckung von GTN und erkannte das Potential dieser Verbindung als Sprengstoff. Er entwickelte eine sichere Zündvorrichtung (die Initialzündung) und schließlich mit dem Dynamit eine

sicher handhabbare Formulierung von GTN. Es unterliegt einer gewissen Ironie, dass Nobel, der sein Leben lang mit GTN experimentierte, seine als Sprengstoff bekannte und etablierte Verbindung als Arzneimittel einnehmen sollte. [56]

Heute ist bekannt, dass GTN seine Wirkung durch die Freisetzung von NO entfaltet. Es wird meist als Spray zur sublingualen/bukkalen Anwendung bzw. als Zerbeikapseln eingesetzt und ist u. a. zur Behandlung des akuten Angina pectoris Anfalls, zur Prophylaxe der Angina pectoris und bei akutem Myokardinfarkt indiziert. [57] Bei der Therapie mit GTN wird die sogenannte Nitratoleranz beobachtet. Trotz gleichbleibender Dosierung nimmt die Wirksamkeit ab. Eine Nitratpause von acht bis zehn Stunden kann die Toleranzentwicklung allerdings verhindern. Die Nitratoleranz ist allen enzymatischen NO-Donatoren gemein. Dazu zählen neben GTN Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN) und Pentaerithryltetranitrat (PETN). Die Toleranzentwicklung wird durch eine Hemmung der an der NO-Freisetzung beteiligten Enzyme erklärt. Für GTN konnte nachgewiesen werden, dass die Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2) maßgeblich an der enzymatischen Freisetzung von NO und damit an der Wirksamkeit dieser Verbindung beteiligt ist. Gleichzeitig entsteht durch die NO-Freisetzung vermehrt Peroxynitrit, das wiederum hemmend auf die ALDH2 wirkt. Somit kommt es zur Nitratoleranz. [58] In der Nitratpause können nicht-enzymatische NO-Donatoren eingesetzt werden. Auf dem Markt sind derzeit Nitroprussidnatrium und Molsidomin.

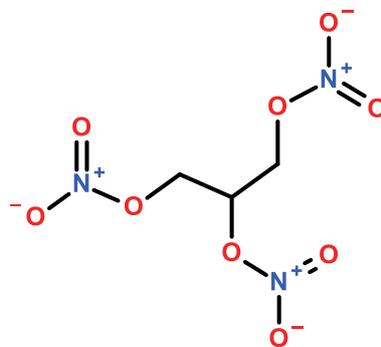


Abbildung 1.4: Strukturformel von Glyceroltrinitrat (GTN)

1.4 Molybdoenzyme

1.4.1 Übersicht

Molybdän (Mo) ist ein Spurenelement und wird in Form des Molybdats (MoO_4^{2-}) ber spezifische Transportsysteme aufgenommen. Es wird jedoch auch eine unspezifische Aufnahme über Sulfattransporter diskutiert. Unabhängig von seiner Verfügbarkeit bleibt Mo solange biologisch inaktiv, bis es zu einer Komplexierung mit einem Pyranopterin kommt, dabei entsteht der sogenannte

Molybdäncofaktor (Moco). In Molybdänhaltigen Metalloenzymen ist der Moco Bestandteil des aktiven Zentrums und stellt neben dem Eisen-Molybdän-Cofaktor, der ausschließlich in der bakteriellen Nitrogenase zu finden ist, den einzigen natürlich vorkommenden Molybdänhaltigen Cofaktor dar. [59] Von den mehr als 50 bekannten Molybdoenzymen ist der Großteil in Bakterien zu finden (vgl. auch 1.2.1 und 1.2.2) und lediglich sieben in Eukaryoten. Sie alle spielen eine wichtige Rolle im Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoffmetabolismus. Bei den katalysierten Reaktionen werden zwei Elektronen übertragen, wobei ein Sauerstoffatom aus einem Wassermolekül oder in ein solches übertragen wird. Die Oxidationsstufe des Mo variiert dabei zwischen +IV und +VI. [60, 61]

1.4.2 Molybdäncofaktorsynthese

Die Synthese des Moco lässt sich in vier Schritte aufteilen (s. Abbildung 1.5). Zunächst entsteht aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Pyranopterinmonophosphat (cPMP). Diese Reaktion ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und wird sowohl in Bakterien, Pflanzen als auch Menschen durch zwei Enzyme katalysiert. [62] Die humanen Enzyme sind nach der MOCS (Molybdän-Cofaktor-Synthese) Nomenklatur benannt und heißen MOCS1A und MOCS1B. [63] Da alle weiteren Schritte im Cytosol lokalisiert sind, muss cPMP aus der Mitochondrienmatrix ins Cytosol transportiert werden. Im Menschen erfolgt dies mittels des Transportproteins ABCB7, das zur Familie der ABC-Transporter gehört. [62] Im Cytosol wird durch Einführung einer Dithiolenfunktion cPMP zu Molybdopterin (MPT) umgewandelt, katalysiert durch die MPT-Synthase. Nun kann in zwei weiteren Schritten das Metall eingefügt werden, was in Bakterien unter Mitwirkung zweier Enzyme (MogA und MoeA) und in Säugern eines Enzyms (Gephyrin) abläuft (vgl. auch MogA-defizienter *E. coli* Stamm zur Synthese Moco-freier Enzyme in 3.1.5). Zuerst wird das MPT zu MPT-Adenosinmonophosphat (MTP-AMP) adenyliert, wofür die G-Domäne des Gephyrins verantwortlich ist. Schließlich wird Mo in die Dithiolengruppe des MPT eingeführt, gesteuert durch die E-Domäne des Gephyrins. Bemerkenswert hierbei ist, dass es sich um einen Austausch von Kupfer (Cu) zu Mo handelt, denn zunächst liegt Cu als Ligand am MPT vor. Es ist davon auszugehen, dass Cu bereits nach dem zweiten Schritt der Moco-Synthese an die SH-Gruppen des MPT bindet, um diese vor Oxidation zu schützen. [60, 61]

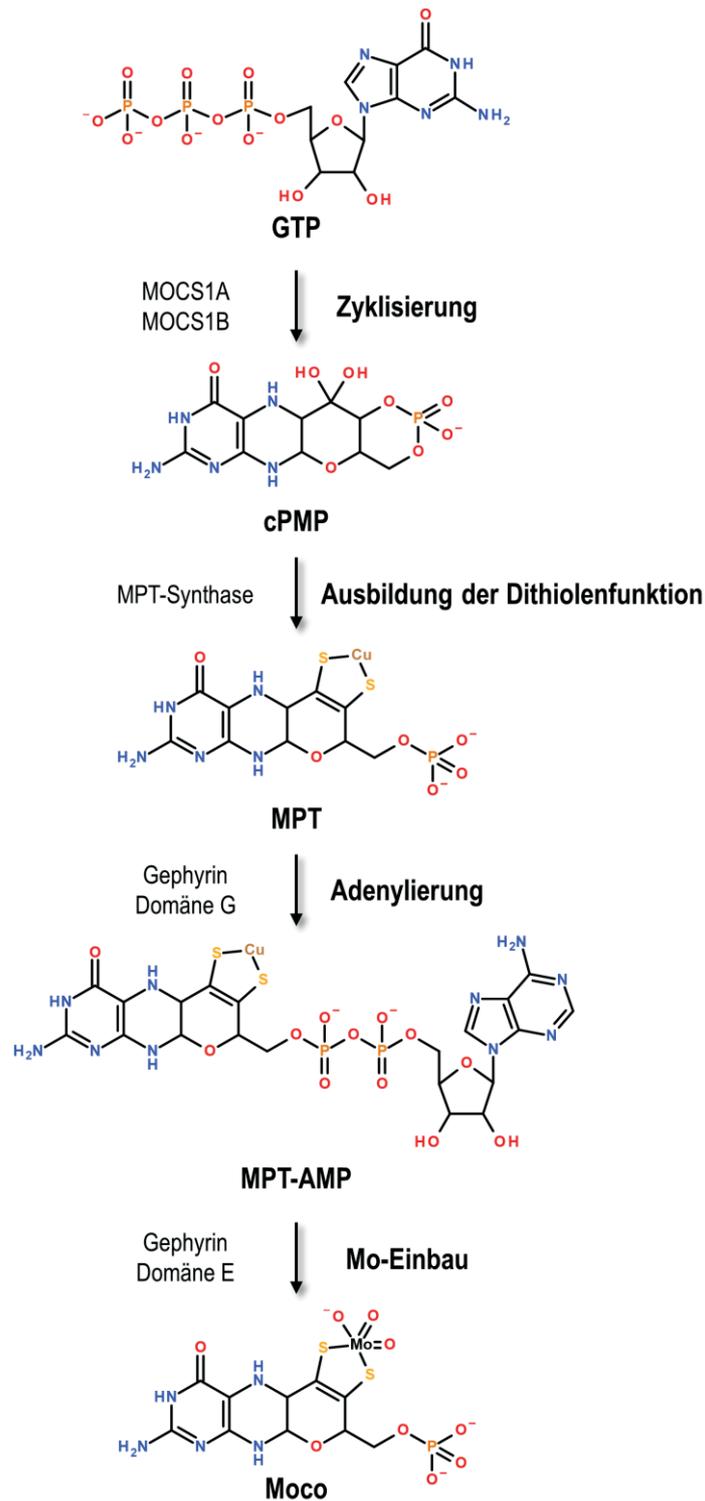


Abbildung 1.5: Biosynthese des eukaryotischen Molybdän-Cofaktors (modifiziert nach Mendel und Kruse [60])

Die Biosynthese des Molybdän-Cofaktors (Moco) beginnt in der mitochondrialen Matrix mit der Zyklisierung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Pyranopterinmonophosphat (cPMP), katalysiert durch die beiden Enzyme MOCS1A und MOCS1B. Nachdem cPMP durch den ABCB7-Transporter ins Cytosol gelangt (nicht gezeigt), entsteht mittels MPT-Synthase Molybdopterin (MPT). Die Beladung mit Molybdän (Mo) erfolgt in zwei weiteren Schritten, beide durch Gephyrin katalysiert. Die G-Domäne des Enzyms adenyliert zunächst MPT zu MPT-Adenosinmonophosphat (MPT-AMP), bevor die E-Domäne Mo in die Dithiolenstruktur des MPT einführt.

1.4.3 Einteilung der eukaryotischen Molybdoenzyme in zwei Familien

Die bekannten, eukaryotischen Molybdoenzyme werden nach der Koordination des Mo im Moco in zwei unterschiedliche Familien eingeteilt. Zum einen gibt es Dioxo-Molybdoenzyme, bei denen das über die Dithiolengruppe des MPT gebundene Mo zwei Oxo-Liganden sowie einen über den Schwefel gebundenen Cysteinrest aufweist. Diese Enzyme gehören zur Familie der Sulfitoxidase und bestehen aus der Sulfitoxidase (SO) selbst, der Nitratreduktase (NR) und der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC). Zum anderen gibt es Monooxo-Molybdoenzyme, die einen Oxo-Liganden, eine Hydroxylgruppe und einen Thioxo-Liganden aufweisen (s. Abbildung 1.6). Die Aldehydoxidase (AO) und die Xanthinoxidoreduktase (XOR) besitzen einen solchen Moco und sind Mitglieder der Xanthinoxidase-Familie. [60, 61]

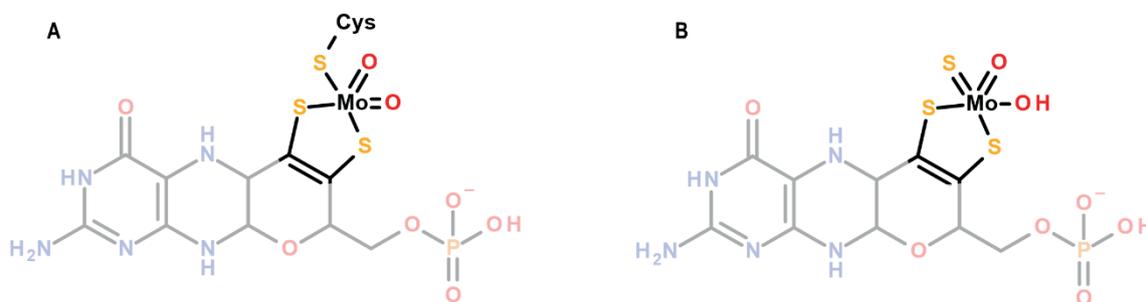


Abbildung 1.6: Molybdän-Cofaktoren eukaryotischer Enzymfamilien

A: Der Molybdän-Cofaktor (Moco) der Sulfitoxidase-Familie besitzt neben zwei Oxo-Liganden einen Schwefel, der von einem Cysteinrest zur Verfügung gestellt wird. **B:** Der Moco der Xanthinoxidase-Familie hingegen ist durch eine Oxo- und eine Hydroxygruppe gekennzeichnet, der Schwefel liegt als Thioxo-Gruppe vor. [60, 61]

1.4.4 Eukaryotische Molybdoenzyme

1.4.4.1 Pyridoxaloxidase und Nikotinathydroxylase

Diese beiden Enzyme kommen ausschließlich in *Drosophila melanogaster* und *Aspergillus nidulans* vor. [60] Sie werden der Vollständigkeit halber hier aufgeführt, sind im Weiteren aber nicht Gegenstand dieser Arbeit.

1.4.4.2 Nitratreduktase

Die Nitratreduktase (NR) kommt in autotrophen Organismen wie Pflanzen, Algen und Pilzen vor und spielt eine wichtige Rolle in der Nitratassimilation. Mit NADH oder NADPH als Cosubstrat reduziert NR Nitrat zu Nitrit. Letzteres kann teilweise weiter zu Stickstoffmonoxid (NO) reduziert werden. Das Enzym

besitzt drei Domänen, die an der Bindung prosthetischer Gruppen beteiligt sind sowie eine dimerisierende Domäne und eine NAD(P)H bindende Subdomäne. Die Anordnung der Domänen ist dabei bei allen eukaryotischen NR gleich. N-Terminal befindet sich die Moco-Domäne, gefolgt von einer Häm-bindenden Cytochrom b_5 Domäne und der C-terminalen Flavinadenindinukleotid (FAD)-bindenden Domäne. [60]

1.4.4.3 Sulfitoxidase

Die Sulfitoxidase (SO) oxidiert Sulfit zu Sulfat und trägt damit zur Sulfitentgiftung bei. Anders als bei der NR unterscheiden sich die pflanzliche und die Säugerform des Enzyms in ihrer Domänenstruktur. Während die Säugerform eine N-terminale Häm- und eine C-terminale Moco-Domäne aufweist, besitzt die pflanzliche Form nur letztere (s. auch Abbildung 1.7). Sie unterscheiden sich weiterhin in der Lokalisation und im Elektronenakzeptor. Die humane SO nutzt Cytochrom c als Elektronenakzeptor und ist im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert. Die pflanzliche SO nutzt molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor und ist in den Peroxisomen lokalisiert. [60, 64]

1.4.4.4 Xanthinoxidoreduktase

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) oxidiert Hypoxanthin zu Xanthin und letzteres weiter zu Harnsäure. Dieser Ablauf spielt eine zentrale Rolle im Purinstoffwechsel. Sie kann in zwei verschiedenen Formen vorliegen, abhängig davon, ob NAD^+ oder molekularer Sauerstoff als Substrat bevorzugt werden. Die Xanthindehydrogenase (XDH) präferiert NAD^+ und die Xanthinoxidase (XO) O_2 . In Säugerzellen können beide Formen ineinander überführt werden, was in Pflanzen nicht der Fall ist. Die Domänen bestehen aus zwei Domänen zur Bindung zweier $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster, einer FAD-bindenden Domäne und einer Moco-bindenden Domäne, wobei die dimerisierende Domäne an letztere fusioniert ist. Die XOR ist im Cytosol lokalisiert (s. auch Abbildung 1.7). [60, 61, 65]

1.4.4.5 Aldehydoxidase

Die Aldehydoxidase (AO) oxidiert ein breites Spektrum an Substraten wie beispielsweise aliphatische und aromatische Heterozyklen, Aldehyde, Purine und Pteridine. Als Elektronenakzeptor nutzt sie ausschließlich molekularen Sauerstoff. Sie entstand ursprünglich durch Genduplikation aus der XDH und zeigt daher eine hohe Sequenzähnlichkeit zur XDH, auch erkennbar an der Anzahl und Anordnung der Domänen (s. auch Abbildung 1.7). Die Säugerform der AO generiert sowohl Superoxid als auch Wasserstoffperoxid als Nebenprodukte, was sie von der Pflanzenform unterscheidet. Diese produziert ausschließlich Wasserstoffperoxid. Die AO ist ebenso wie die XOR im Cytosol lokalisiert. [60, 65]

Die physiologische Bedeutung der AO ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Während es im Menschen eine AO gibt (AO1), kommen beispielsweise in Nagern gleich vier Isoformen (AO1-AO4) vor. In den letzten Jahren ist die AO immer mehr in den Fokus aktueller Forschung gerückt, da sie eine nicht zu vernachlässigende Rolle im Phase-I Metabolismus von Xenobiotika spielt. Insbesondere für die rationale Arzneistoffentwicklung ist eine weitergehende Aufklärung des Zusammenspiels von AO und Arzneistoffinteraktionen von Bedeutung. [66, 67]

1.4.4.6 Mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) ist neben den bereits beschriebenen Enzymen SO, XOR und AO das vierte molybdänhaltige Enzym, das in Säugern identifiziert wurde und gehört zur SO-Familie. [68–71] Mit nur 37 kDA und einer Cofaktor-bindenden Domäne, die den Moco bindet, ist mARC sehr viel kleiner als die anderen Vertreter eukaryotischer Molybdoenzyme (s. Abbildung 1.7). Eine dimerisierende Domäne, wie sie die anderen drei Molybdoenzyme enthalten, fehlt, so werden heterologe mARC-Proteine aus *E. coli* als Monomere erhalten. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass in eukaryotischen Systemen auch Dimere oder Oligomere vorliegen. [65, 72] Alle bisher untersuchten Säugergenome enthalten zwei mARC-Gene, die für zwei mARC-Proteine kodieren, mARC1 und mARC2. Im Menschen befinden sich die Gene *MARC1* und *MARC2* in einer Tandem-Orientierung auf Chromosom 1 (1q41). Die Sequenzidentität/-ähnlichkeit beträgt 66 % bzw. 80 %. [69] Während mARC1 337 Aminosäuren enthält, besitzt mARC2 335 Aminosäuren. In allen bisher untersuchten Säugerspezies sind beide mARC-Proteine hochkonserviert. [73] Durch Sequenzalignements zu den humanen Proteinen werden die mARC-Proteine anderer Säugerspezies klassifiziert und entweder mARC1 oder mARC2 zugeordnet. Durch datenbankgestützte Sequenzanalysen konnten die mARC-Proteine der MOSC (Moco-Sulfurase C-terminale Domäne)-Familie zugeordnet werden, die neben mARC1 und mARC2 nur die Moco-Sulfurase umfasst. Sie alle haben die MOSC-Domäne gemein. In Prokaryoten zählen u. a. noch die Proteine YcbX und YiiM zur MOSC-Familie. Die MOSC-Domäne zeichnet sich durch ein hochkonserviertes Cystein an Position 273 für mARC1 und 272 für mARC2 aus. [74] Die Untersuchungen ergaben weiterhin eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz und eine β -Barrel-Domäne für mARC. [74] mARC ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Für mARC1 wurde eine N_(innen)-C_(außen) Membranorientierung festgestellt, sodass die C-terminale katalytische Domäne dem Cytosol ausgesetzt ist. [65] In Ratten und in Mäusen konnte außerdem für mARC2 eine Lokalisation in Peroxisomen nachgewiesen werden. [75, 76]

Im Gegensatz zu den Molybdoenzymen SO, XOR und AO ist mARC nicht allein aktiv, sondern bildet mit zwei weiteren Enzymen ein Drei-Komponenten-Enzymsystem. Zusammen mit Cytochrom b₅ B (Cyb5) und seiner NADH-abhängigen Cytochrom b₅ Reduktase (Cyb5R) ist mARC in der Lage, diverse *N*-hydroxylierte und *N*-oxygenierte Verbindungen zu reduzieren. Dies ist insbesondere im Arzneistoffmetabolismus ein wichtiger und häufig unterschätzter Prozess. mARC-katalysierte Reaktionen stehen häufig im Zusammenhang mit Cytochrom P450 (CYP)-induzierten Oxidationen und können die so entstandenen, teils toxischen Metabolite reduzieren. [77] Auch bei der Aktivierung von Prodrugs spielt mARC eine herausragende Rolle. Insbesondere Amidoxim-Prodrugs werden durch das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem aktiviert. Allerdings ist bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe auch zu berücksichtigen, dass eine Inaktivierung potentieller Arzneistoffkandidaten durch das mARC-haltige Enzymsystem erfolgen kann. Trotz intensiver Forschungen bleibt die physiologische Funktion von mARC weitestgehend ungeklärt. Im folgenden Kapitel wird der aktuelle Kenntnisstand genauer beleuchtet. [77, 78]

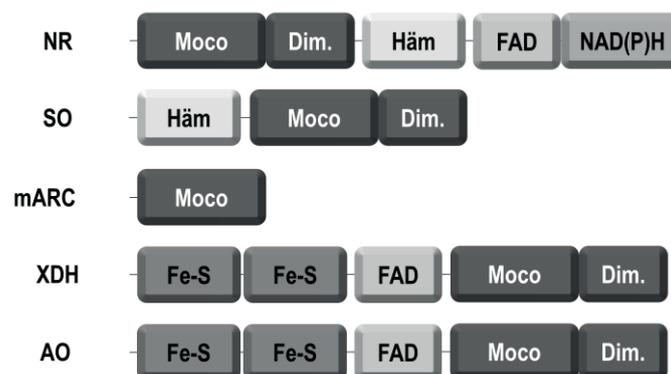


Abbildung 1.7: Domänenstruktur eukaryotischer Molybdoenzyme (modifiziert nach Mendel und Kruse [60])

Die Domänenstrukturen der eukaryotischen Molybdoenzyme haben die Molybdän-Cofaktor (Moco)-bindende Domäne gemein. Mit Ausnahme der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC) besitzen auch alle eine dimerisierende Domäne (Dim.) mARC stellt mit Abstand das kleinste molybdänhaltige Enzym dar. Die Nitratreduktase (NR), Sulfitoxidase (SO) und mARC gehören zur Familie der SO, die Xanthindehydrogenase (XDH) und die Aldehydoxidase (AO) zur Xanthinoxidase-Familie. [60, 61] Abkürzungen: FAD = Flavinadeninindinukleotid; Fe-S = Eisen-Schwefel-Cluster; NAD(P)H = Nicotinamidadeninindinukleotid(phosphat).

1.5 Das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem

1.5.1 Zusammensetzung, Lokalisation und Elektronentransport

Das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem oder auch Dreikomponenten-Enzymsystem besteht aus mARC, Cyb5 und Cyb5R. [68, 79] Da mARC lediglich eine Moco-bindende Domäne aufweist, muss der Elektronentransport mit Hilfe der beiden zusätzlichen Proteine gewährleistet werden. Cyb5R ist ein

FAD-haltiges Enzym, wohingegen Cyb5 Häm als Cofaktor enthält. Zusammengenommen ähnelt die Struktur des *N*-reduktiven Enzymsystems damit der Domänenstruktur der NR, die ebenfalls Moco, Häm und FAD als Cofaktoren aufweist (vgl. auch Abbildung 1.7). Es ist folglich anzunehmen, dass auch der Elektronenfluss dem der NR gleicht. Hier werden die Elektronen von NADH zunächst auf das FAD übertragen und gelangen anschließend über das Häm auf den Moco, wo die Substratreduktion erfolgt. *N*-hydroxylierte bzw. *N*-oxygenierte Substrate werden durch die Spaltung der N-O-Bindung reduziert. [80]

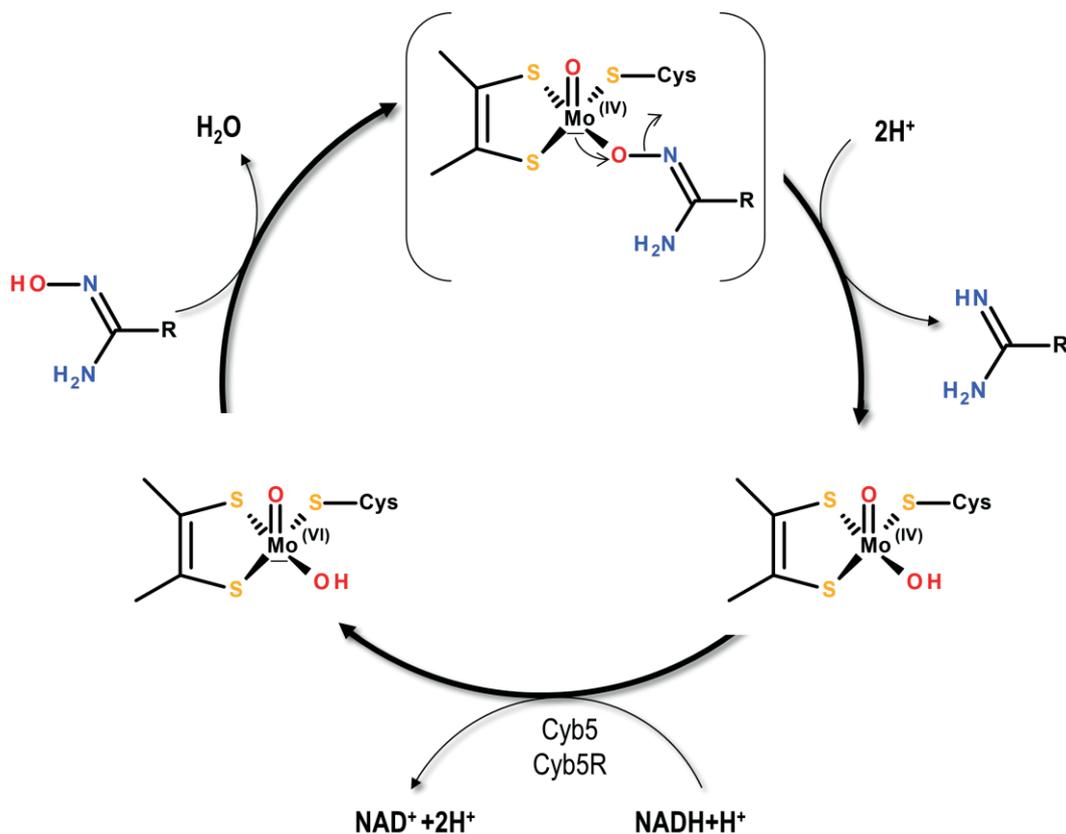


Abbildung 1.8: Reaktionszyklus von mARC (nach Havemeyer et al.) [80]

Angelehnt an den katalytischen Mechanismus der Nitratreduktase (NR) zeigt die Abbildung den theoretischen Reaktionszyklus der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC) als Zwei-Elektronenübertragung mit einem Amidoxim als Substrat.

Neben der Übertragung zweier Elektronen bei der Reduktion eines Substrates wird auch ein Ein-Elektronen-Transfer diskutiert. Hierfür wäre zunächst ein initialer Protonierungsschritt erforderlich, der dann eine Spaltung der N-O-Bindung und eine Übertragung eines Hydroxylradikals auf Mo ermöglicht (s. Abbildung 1.9). [81] Dieser Mechanismus könnte unter anaeroben Bedingungen eine Rolle spielen, wie sie bei der Umsetzung von Nitrit gewählt wurden (s. 3.2.2 bzw. 5.1.1). [52, 81]

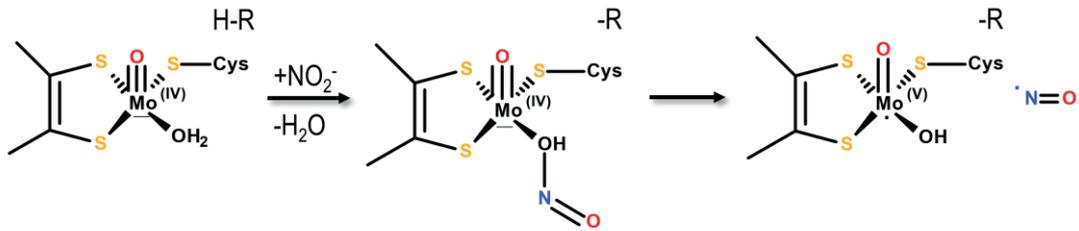


Abbildung 1.9: Hydroxylradikaltransfer von mARC (nach Yang *et al.*) [81]

Unter Zusatz einer Säure (H-R) könnte ein Ein-Elektronentransfer durch Übertragung eines Hydroxylradikals ablaufen. Als Modellsubstrat dient hierbei Nitrit (NO_2^-).

Das Dreikomponenten-Enzymsystem ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Obwohl für mARC auch eine Lokalisation in Peroxisomen gefunden wurde (s. dazu auch 1.4.4.6), sind dort weder Cyb5 noch Cyb5R vorhanden, somit konnte auch keine *N*-reduktive Aktivität gezeigt werden. [65, 68, 75, 76, 79, 82] Es ist jedoch denkbar, dass mARC hier eine andere Funktion erfüllt, die bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte.

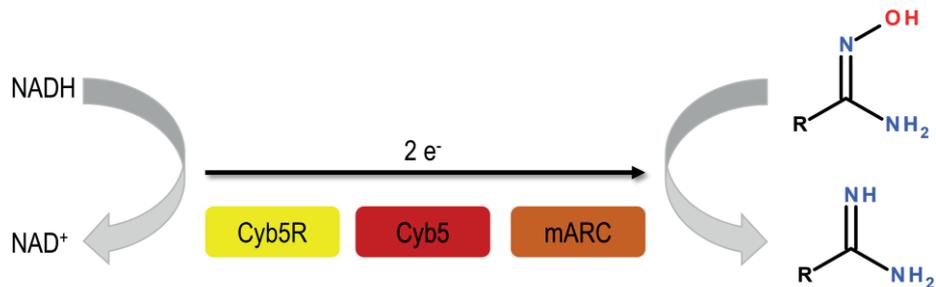


Abbildung 1.10: Reduktion eines Modellsubstrats durch das *N*-reduktive Enzymsystem

Die Reduktion eines Modellsubstrats, hier gezeigt an Hand eines Amidoxims, verläuft durch die Elektronenübertragung ausgehend von NADH über das FAD der Cytochrom b_5 Reduktase (Cyb5R), anschließend über das Häm des Cytochrom b_5 (Cyb5) sowie über den Moco der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC) und schließlich auf das Substrat.

1.5.2 Cytochrom b_5

Das Häm-Protein Cyb5 kann von seiner Reduktase Cyb5R ein Elektron aufnehmen und auf einen Akzeptor übertragen. Man bezeichnet dieses Protein daher auch als Elektronentransportprotein. Das humane Genom besitzt zwei Gene, die für unterschiedliche Isoformen der Cyb5 kodieren. *CYB5A* ist auf Chromosom 18 lokalisiert und kodiert für die mikrosomale, membrangebundene Isoform Cyb5A. Sie befindet sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Des Weiteren kodiert *CYB5A* für die lösliche Form von Cyb5A, die sich im Cytosol von Erythrozyten befindet. Es ist anzunehmen, dass sie durch gewebespezifisches, alternatives Splicing entsteht. Die zweite Isoform, Cyb5B, wird

durch *CYB5B* auf Chromosom 16 kodiert. Cyb5B ist die mitochondriale, membrangebundene Isoform und befindet sich ausschließlich in der äußeren mitochondrialen Membran. Sie ist es auch, die zusammen mit mARC und Cyb5R Teil des *N*-reduktiven Enzymsystems ist. [83–86]

1.5.3 Cytochrom b₅ Reduktase

Die Cyb5R ist wie Cyb5 auch ein Elektronentransportprotein und vermittelt den Elektronentransfer von NADH auf Cyb5. Als Cofaktor enthält Cyb5R FAD. [87] Es gibt vier Cyb5 Reduktasen, die durch vier Gene kodiert werden. Davon ist die Cyb5R3 die mengenmäßig am meisten vorkommende Reduktase und ist am besten untersucht. Sie wird durch das auf Chromosom 22 liegende *CYB5R3* kodiert und kann in zwei Isoformen vorkommen. Isoform 1 ist ein membrangebundenes Protein und ist im ER und in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Die Isoform 2 hingegen besitzt keine Membranankerdomäne und ist als lösliches Protein in Erythrozyten lokalisiert. Cyb5R3 ist neben mARC und Cyb5B Teil des *N*-reduktiven Enzymsystems. [85, 88, 89] Andere Elektronenüberträger werden diskutiert. [82]

1.5.4 Beteiligung des *N*-reduktiven Enzymsystems am Fremdstoffmetabolismus

Die Entdeckung von mARC geht auf die Untersuchung der sogenannten „Amidoxime statt Amidine“ Prodrug-Strategie zurück. Amidinfunktionen finden sich in vielen Arzneistoffen und –kandidaten und liegen auf Grund ihrer Basizität unter physiologischen Bedingungen protoniert vor. Für die orale Applikation und Bioverfügbarkeit sind dies jedoch schlechte Bedingungen. Wandelt man die Amidine in Amidoxime um, so wird die Basizität deutlich herabgesetzt. Unter physiologischen Bedingungen kommt es nicht mehr zur Protonierung und die Verbindung kann nun wesentlich effektiver absorbiert werden. [90, 91] Eine der Voraussetzungen für eine sinnvolle Prodrug-Strategie ist die schnelle und umfassende Aktivierung durch chemische oder enzymatische Umwandlung in die Wirkform, das Drug. Für die Amidoxime konnte eine Aktivierung durch ein *N*-reduktives System aus insgesamt drei Bestandteilen mit Lokalisation in Mitochondrien nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei zum einen um Cyb5 und zum anderen um seine NADH-abhängige Cyb5R. Der dritte Bestandteil war zunächst unbekannt und wurde *die dritte Komponente* oder *das dritte Enzym* genannt. [92–94] Durch intensive Forschung an Hand von Benzamidoxim (BAO) als Modellsubstrat konnte letztlich die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente als dritte Komponente isoliert und identifiziert werden. Die Namensgebung des Enzyms erfolgte entsprechend der funktionellen Gruppe des Modellsubstrats und der Lokalisation. [68] Alle bisher untersuchten Amidoxim Prodrugs werden durch das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem aktiviert, sodass das Prodrug-Konzept inzwischen für verschiedene Arzneistoffe, beispielsweise für antiparasitäre und antibakterielle Wirkstoffe, eingesetzt werden konnte. [95, 96]

Neben Amidoximen werden auch andere *N*-hydroxylierte und *N*-oxygenierte Verbindungen reduziert. Zu den bereits getesteten Substraten zählen Vertreter der *N*-hydroxylierten Guanidine, Hydroxylamine, Sulfhydroxamsäuren, *N*-hydroxylierte Amidinohydrazone, Oxime, Hydroxamsäuren und auch *N*-Oxide (s. Abbildung 1.12). [77, 97–99] Zu den Hydroxylaminen gehört Sulfamethoxazolhydroxylamin, das aus dem Sulfonamid Sulfamethoxazol entsteht. Das Antibiotikum Sulfamethoxazol wird im Phase I Metabolismus durch CYP450 zum Hydroxylamin umgesetzt. Da dieser Metabolit für Überempfindlichkeitsreaktionen verantwortlich gemacht wird, kann dessen Bildung auch als Toxifizierung bezeichnet werden. [100, 101] Sowohl mARC1 als auch mARC2 sind im Zellsystem in der Lage, Sulfamethoxazolhydroxylamin zu reduzieren. Sie stellen somit den Gegenspieler zu CYP450 dar. [102]

Alle bisher getesteten Substrate werden sowohl von mARC1 als auch von mARC2 umgesetzt, wobei beide Proteine *in vitro* in etwa gleiche Umsetzungsraten aufzeigen. Die Substanzklasse der *N*-Oxide bildet hier bisher die einzige Ausnahme. Die beiden getesteten Substrate Amitriptylin-*N*-oxid und Nicotinamid-*N*-oxid werden zwar vom mARC1-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystem reduziert, jedoch nicht durch das mARC2-haltige System. [98] Möglicherweise ist die abweichende Substratspezifität auf ein unterschiedliches katalytisches Zentrum zurückzuführen. Es ist ebenso denkbar, dass die beiden Enzyme verschiedene physiologische Funktionen erfüllen und daher unterschiedliche Substrate akzeptieren. Genaueres ist bisher jedoch nicht bekannt und Gegenstand intensiver Forschung.

1.5.5 Physiologische Funktion von mARC

1.5.5.1 Genetische Variabilität von mARC

Die physiologische Funktion von mARC konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Beide mARC-kodierenden Gene *MARC1* und *MARC2* sind jedoch auf Basis der Nukleinsäuren hochkonserviert. [69] Durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single-nucleotide polymorphisms*, SNPs) kann es dennoch zur Entstehung von Proteinvarianten kommen. SNPs bezeichnen die Änderung eines Basenpaares innerhalb der DNA. Man unterscheidet bei SNPs, die im kodierenden Bereich der DNA liegen, zwischen synonymen und nicht-synonymen SNPs. Synonyme SNPs führen nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, wohingegen nicht-synonyme SNPs einen Aminosäurewechsel zur Folge haben. Letztere können folglich zu Proteinvarianten führen, die in ihrer Funktion verändert sein können. [103, 104] Auch für beide mARC-Gene sind SNPs bekannt. Um die Auswirkungen für die *N*-reduktive Aktivität zu untersuchen, wurden ausgewählte Proteinvarianten, die durch bekannte SNPs entstehen, in *in vitro* Biotransformationsstudien getestet. Eine signifikante Reduktion der kinetischen Parameter konnte nur für Varianten von mARC2 beobachtet werden, welche jedoch nur selten vorkommen. In einer Kohorte

von 334 getesteten Kaukasiern wurden keine homozygoten Träger identifiziert. Um für mARC1 einen Verlust der Aktivität herbeizuführen, mussten mehr als zwei Aminosäuren geändert werden. Diese Varianten sind sehr selten und haben vermutlich, wie auch die mARC2-Varianten, keine klinische Relevanz. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch durch Untersuchungen von vier Varianten der Cyb5B erhalten. [73, 105] Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass mARC und seinem *N*-reduktiven Enzymsystem eine essentielle Rolle für den Organismus zukommt. Um diese Funktion zu entschlüsseln, wurden einige endogene Verbindungen als potentielle Substrate für mARC getestet.

1.5.5.2 Reduktion von *N*^ω-Hydroxy-L-arginin

Erster Vertreter physiologischer Testsubstrate war *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA, s. Abbildung 1.11). Wie bereits in 1.3.1 beschrieben, ist NOHA ein Intermediat, das bei der Oxidation von L-Arginin entsteht und weiter zu NO oxidiert werden kann. Diese zweistufige Reaktion wird durch NOS katalysiert. NOHA kann Arginasen inhibieren, da es sich vor der Oxidation zu NO vom katalytischen Zentrum der NOS lösen kann. [106–108] Arginasen konkurrieren mit den NOS um das gemeinsame Substrat Arginin. Wird die Arginase gehemmt, steht somit mehr Substrat für die NOS zur Verfügung und die NO-Produktion kann vermehrt ablaufen. NOHA ist folglich nicht nur ein Intermediat, sondern auch ein Regulator der NO-Synthese. [109–112] Des Weiteren wird diskutiert, ob NOHA NOS-unabhängig durch beispielsweise Hämproteine zu NO umgesetzt werden kann. Somit stellte NOHA einen transportfähigen und relativ stabilen NO-Vorläufer dar. [113–115] Bei Biotransformationsstudien von NOHA mit verschiedenen porcinen Gewebepreparationen sowie rekombinanten humanen Enzymen konnte eine mARC-abhängige Reduktion von NOHA zu Arginin festgestellt werden. Damit war zum ersten Mal gezeigt worden, dass auch endogene Verbindungen Substrate des *N*-reduktiven Enzymsystems darstellen und mARC möglicherweise einen regulativen Einfluss auf die NO-Synthese ausübt. [116]

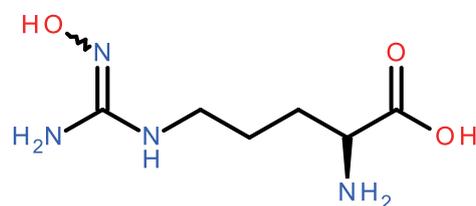


Abbildung 1.11: Strukturformel von *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA)

1.5.5.3 Reduktion und Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basenanaloga

Auch *N*-hydroxylierte Basenanaloga sind als endogene Substrate untersucht worden und werden mARC-abhängig reduziert und somit entgiftet. Insbesondere mARC2 spielt eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von 6-*N*-Hydroxyadenin (HAP) in HeLa-Zellen. HAP kann aus Adenin entweder vermittelt durch CYP450 oder durch Peroxylradikale bei oxidativem Stress entstehen. Durch die Ähnlichkeit zu natürlichen Nukleinbasen kann es zur Umsetzung zu Nucleosidtriphosphaten und schließlich zum Falscheinbau in die DNA kommen, was Mutationen begünstigen kann. Die physiologische Funktion von mARC könnte folglich darin bestehen, die Akkumulation mutagener Substanzen zu vermeiden. [77, 117] Diese Hypothese wird gestützt von der Entdeckung, dass in humanen Kolonkarzinomzellen mARC2 signifikant herunterreguliert ist. [118]

1.5.5.4 Beteiligung von mARC am Energiestoffwechsel

Die Expression von mARC hängt möglicherweise mit dem Glukosestoffwechsel zusammen. Malik *et al.* (2007) konnten nachweisen, dass mARC2 in den Nieren eines Diabetes-Ratten-Modells (Goko-Kakizaki Ratten, die bereits früh Typ 2 Diabetes mellitus entwickeln) hochreguliert ist. Weiterhin stellten sie fest, dass auch in humanen und Ratten-Nierenzellen Glukose-induziert vermehrt mARC2 nachweisbar ist. [119, 120] Diese Ergebnisse passen zu einer Studie über Kopienzahlvariationen der DNA (CNV, *copy number variations*), in der für *MARC2* CNVs in Zusammenhang mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus entdeckt wurden. [121] Im diabetischen Streptozocin-Mausmodell konnte bestätigt werden, dass mARC2 bei Typ 1 Diabetes mellitus vermehrt vorkommt und dadurch auch die *N*-reduktive Aktivität in Leber und Niere gesteigert ist. Es sind bisher jedoch keine mechanistischen Zusammenhänge aufgeklärt worden. [122]

Einige Hinweise deuten auch auf einen möglichen Zusammenhang zwischen mARC und dem Fettstoffwechsel hin. So weist das Fettgewebe von Nagern eine hohe *N*-reduktive Aktivität auf. [79] Es konnte beobachtet werden, dass Fettzellen von Mäusen im Verlauf ihrer Differenzierung sowohl an mARC2 als auch an *N*-reduktiver Aktivität zunehmen. Gleichzeitig reduziert die Herunterregulation von mARC2 die Lipidsynthese. [123] Teslovich *et al.* beschrieben 2011 einen SNP im Bereich des mARC1 Locus, der mit veränderten Blutlipidprofilen einhergeht und Aslibekyan *et al.* (2012) zeigten für denselben SNP ein verändertes Ansprechen auf den Lipidsenker Fenofibrat. [124, 125] In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Expression als auch Aktivität des *N*-reduktiven Enzymsystems durch Fasten und hoch fetthaltige Diät in Mäusen beeinflusst wurde. [126]

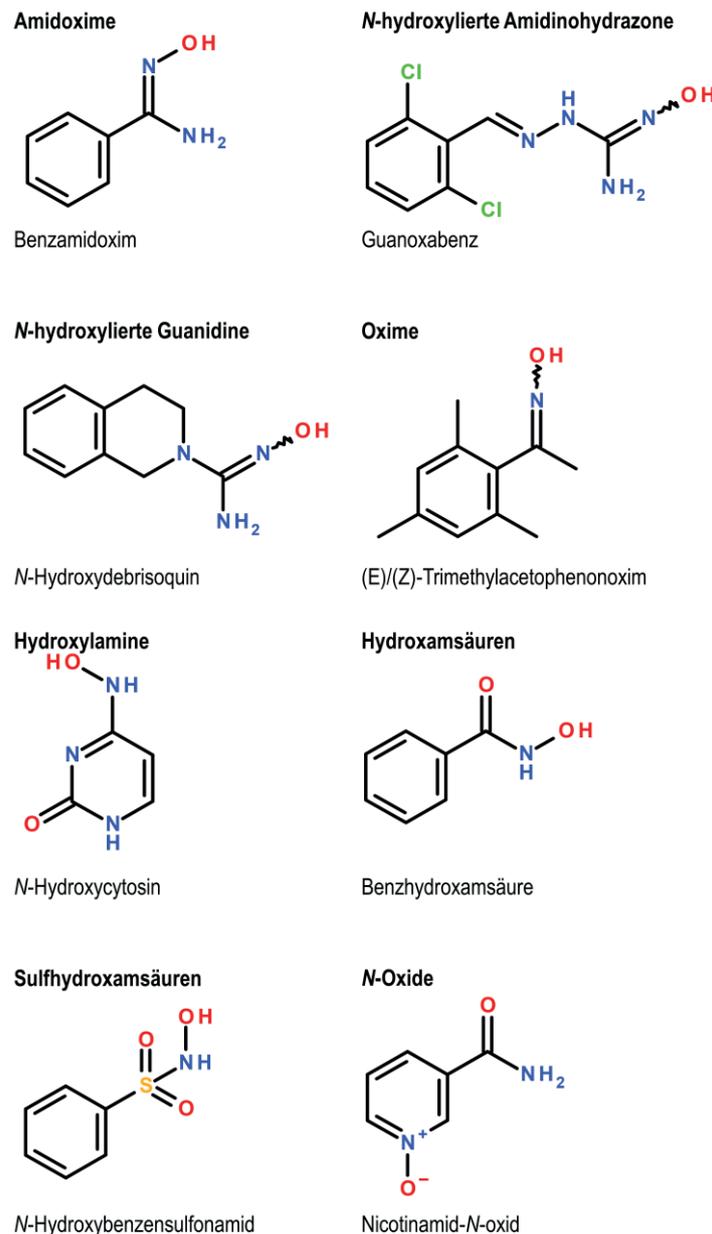


Abbildung 1.12: Beispiele für Substrate des N-reduktiven Enzymsystems

Gezeigt sind einige Beispiele für Verbindungsklassen mit jeweils einem Vertreter, deren Umsetzung durch das N-reduktive Enzymsystem bereits erfolgreich gezeigt werden konnten. [80, 78, 98]

1.5.5.5 mARC2-Knockout in Mäusen

Um die Funktion eines Proteins in einem Organismus zu untersuchen, bietet sich ein Knockout (KO)-Modell an. Durch gezieltes Inaktivieren eines bestimmten Gens in der DNA eines Modellorganismus lässt sich die Erbinformation verändern, sodass beispielsweise ein bestimmtes Protein nicht mehr exprimiert werden kann. Vergleicht man den so erhaltenen KO-Organismus mit dem unveränderten Wildtyp (WT)-Organismus, können Rückschlüsse auf die Funktion des betroffenen Proteins gezogen werden. Die Maus stellt einen typischen Modellorganismus dar, da sie eine hohe Homologie zum

Menschen aufweist. Die ähnliche Physiologie und Anatomie lässt somit den Vergleich zum Menschen zu. Außerdem ist die Genetik der Maus bereits umfassend untersucht. Das *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC) hat es sich zur Aufgabe gemacht, jedes Proteinkodierende murine Gen durch gezielte Knockouts zu untersuchen und die resultierenden Phänotypen zu bestimmen. Dadurch sollen insbesondere pathophysiologische Prozesse näher aufgeklärt werden. Das IMPC untersuchte auch eine mARC2-KO-Maus. [127] Sie ist lebensfähig, was bedeutet, dass ein Fehlen von mARC2 nicht letal ist. Entweder sind keine lebenswichtigen Stoffwechselprozesse betroffen oder das noch vorhandene mARC1 kann die Funktion von mARC2 teilweise oder ganz übernehmen. Signifikante Unterschiede im Phänotyp der mARC2-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen ergaben sich durch einen erhöhten Schreckreflex, eine verminderte Präpulsinhibition und vermindertes Körpergewicht (s. Abbildung 1.14 und Abbildung 1.15). [127] Letzteres lässt sich eindrucksvoll in einem Foto zweier männlicher Mäuse erkennen, von denen eine den mARC2-KO trägt und die andere den Wildtyp (s. Abbildung 1.13).

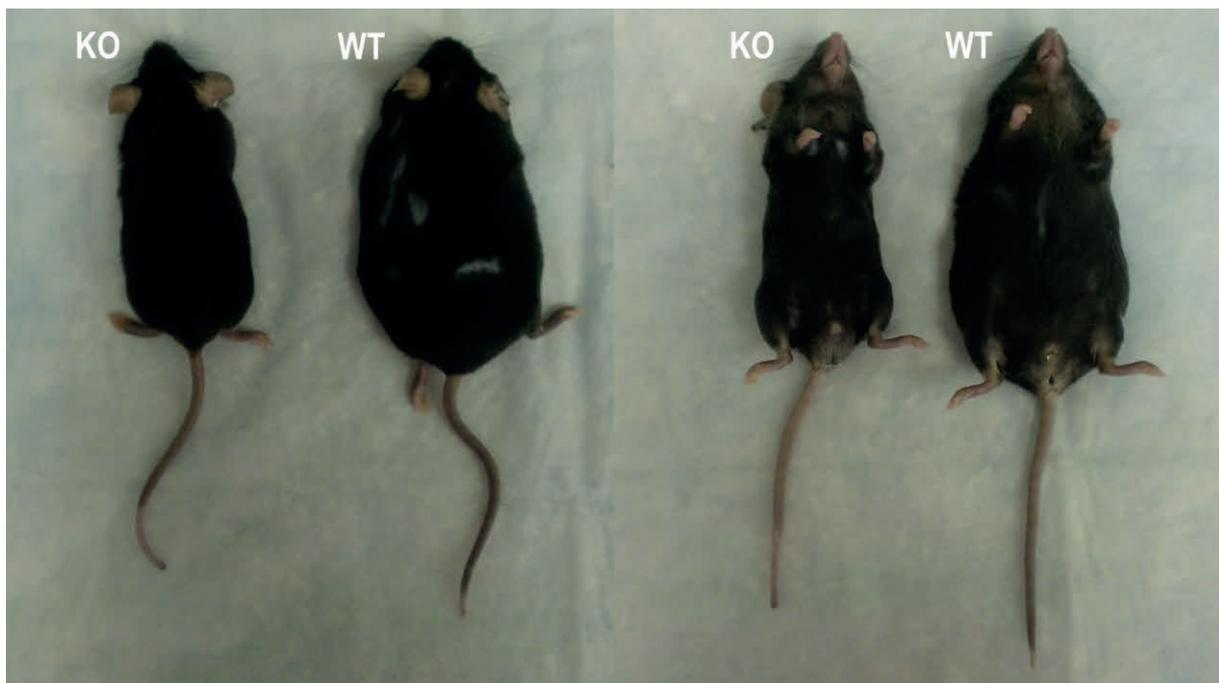


Abbildung 1.13: Foto einer Wildtyp- und einer mARC2(-/-)-Knockoutmaus

Das Foto zeigt zwei männliche, 12 Wochen alte Mäuse in Rücken- sowie in Bauchlage. Die Wildtypmaus (WT, jeweils rechts zu sehen) hat eine deutlich höhere Körpermasse als die homozygote mARC2(-/-)-Knockoutmaus (KO, jeweils links zu sehen). Die Bilder wurden freundlicherweise von Frau Dr. C. Sparacino-Watkins, Universität von Pittsburgh, USA, zur Verfügung gestellt.

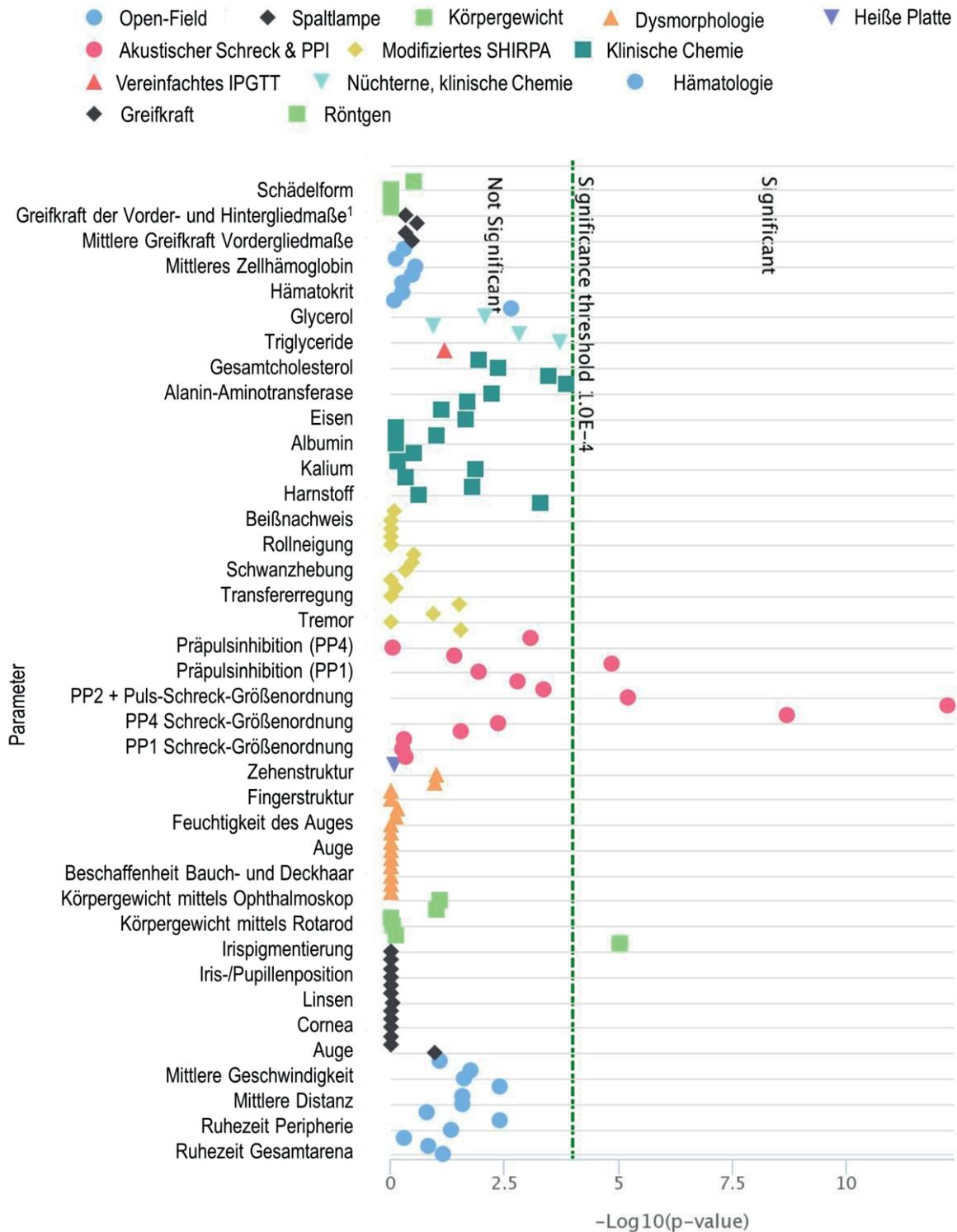


Abbildung 1.14: Übersicht über den mARC2-Knockout-Phänotyp

Die Übersicht zeigt getestete Parameter und die Einordnung der Ergebnisse in einen nicht-signifikanten und einen signifikanten Bereich. Alle Messerwerte und die grafische Darstellung wurden vom IMPC erstellt und zur Verfügung gestellt. [127] Abkürzungen: PPI = Präpulsinhibition; SHIRPA = SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment; IPGTT = intraperitonealer Glukose-Toleranztest. ¹normalisiert auf das Körpergewicht.

In vivo und *in vitro* Studien zeigten, dass mARC2-KO-Mäuse dem WT gegenüber einen signifikant verminderten *N*-reduktiven Metabolismus aufweisen. Da mARC2 in murinen Geweben dominant exprimiert wird, mARC1 jedoch von dem KO unbeeinflusst bleibt, entsprechen diese Beobachtungen den Erwartungen. [128, 129, 82] Das signifikant reduzierte Körpergewicht der mARC2-KO-Mäuse stützt die Hypothese, dass es einen Zusammenhang zwischen mARC und dem Fett- bzw. Glukosestoffwechsel geben könnte. Bei der Untersuchung des Phänotyps wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede entsprechender Parameter gefunden. Dennoch liegen die Werte für Triglyceride, freie Fettsäuren und Glucose alle nahe der Signifikanzgrenze (vgl. Abbildung 1.15). Gleiches gilt für die Alpha-Amylase und die Alkalische Phosphatase. Für die Untersuchungen standen jeweils nur sechs bis acht homozygote KO-Mäuse und sechs bis 500 Wildtypmäuse zur Verfügung. Ein größerer Stichprobenumfang könnte genauere Daten zu weiteren Merkmalen liefern. [127]

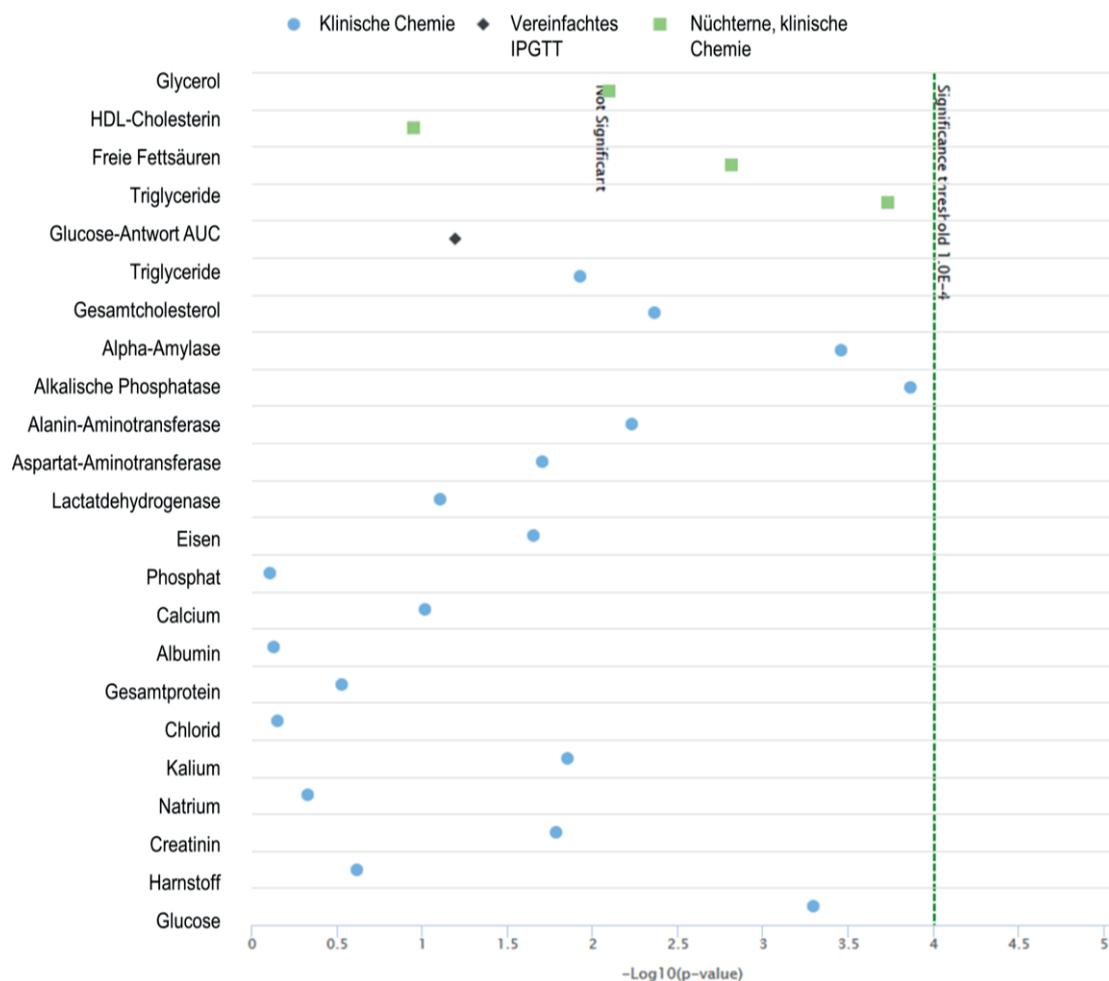


Abbildung 1.15: Homöostatischer/Metabolomischer Phänotyp der mARC2-Knockoutmäuse

Die Abbildung zeigt den homöostatischen/metabolomischen Ausschnitt des Gesamtphänotyps der mARC2-Knockoutmäuse. Obwohl kein Parameter die Signifikanzgrenze überschreitet, so liegen einige doch dicht daran. Dazu gehören mit den freien Fettsäuren, den Triglyceriden und der Glukose auch Parameter des Energiestoffwechsels. [127] Abkürzungen: IPGTT = intraperitonealer Glukose-Toleranztest; AUC = Peakfläche (*area under the curve*).

1.6 Zielsetzung

Das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem ist an der Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter und *N*-oxygenierter Verbindungen beteiligt. Auf Grund der geringen genetischen Variabilität ist anzunehmen, dass mARC eine lebenswichtige Funktion im Organismus erfüllt. [73] Dennoch ist über die physiologische Funktion des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems bisher wenig bekannt. Durch die Identifizierung von NOHA als endogenes Substrat für mARC wurde erstmals die Beteiligung von mARC am NO-Stoffwechsel und damit an einem kardiovaskulären Stoffwechselprozess als potentielle physiologische Funktion postuliert. [116] NOHA hat als Intermediat der NO-Synthese regulative Eigenschaften, die zum einen auf der Hemmung der Arginase, welche mit der NOS um das Substrat L-Arginin konkurriert, und zum anderen auf der Funktion als transportfähigem NO-Vorläufer beruhen. Die mARC-abhängige NOHA-Reduktion beeinflusst diese Funktionen. [116] Gestützt wird die Hypothese der Beteiligung von mARC am NO-Metabolismus durch die mARC-vermittelte Nitrit-Reduktion. Diese Reaktion findet im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Reduktionen nur anaerob statt und setzt NO als Metaboliten frei. [52] Der bekannteste NO-liefernde Arzneistoff ist GTN, aus dem NO enzymatisch freigesetzt wird. Zwar konnte die ALDH2 als maßgeblich an der NO-Freisetzung aus GTN beteiligtes Enzym identifiziert werden, jedoch werden so nur 5-10 % des GTNs direkt zu NO umgesetzt. Aus einem Teil des GTNs entsteht auch Nitrit, was weiter zu NO reagiert. [58] Dieser Schritt könnte mARC-vermittelt ablaufen. Ob eine direkte Reduktion und somit Aktivierung von GTN durch mARC möglich ist, wurde bisher nicht untersucht.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob das mARC-Enzymsystem an beiden Prozessen, sowohl der anaeroben Nitrit-Reduktion als auch der direkten Reduktion von GTN zu NO, beteiligt ist. Sollte dies der Fall sein, so könnte die Aktivierung eines der wichtigsten NO-Donatoren näher aufgeklärt und somit das Verständnis der NO-Freisetzung aus Arzneistoffen ergänzt werden. Die Beteiligung des mARC-Enzymsystems an diesen kardiovaskulär relevanten Prozessen könnte nachgewiesen werden.

Mit der Entdeckung von TMAO als Risikofaktor für CVD stellte sich die Frage nach einem endogenen Entgiftungssystem, das die schädlichen Einflüsse von TMAO vermindern oder vollständig vermeiden könnte. TMAO ist ein Metabolit phosphatidylcholinhaltiger Nahrungsbestandteile, dem, abhängig von der individuellen Darmflora und den jeweiligen Ernährungsgewohnheiten, alle Menschen ausgesetzt sind. [15] Bisher ist kein humanes Enzym identifiziert worden, das TMAO reduzieren kann. Es sind jedoch bakterielle Enzyme bekannt, die TMAO als Substrat akzeptieren und das *N*-Oxid zu seinem Vorläufer, dem TMA, reduzieren können. Diese Enzyme gehören zu den molybdänhaltigen Enzymen und tragen Moco als prosthetische Gruppe. [19] Auch mARC ist ein Moco-haltiges Enzym, daher wäre eine mARC-abhängige TMAO-Reduktion vorstellbar. Mit Nicotinamid-*N*-oxid und Amitriptylin-*N*-oxid sind

bereits zwei *N*-Oxide identifiziert worden, die durch mARC reduziert werden können. Die Besonderheit hierbei ist, dass mit diesen Verbindungen erstmals ein Unterschied in der Substratspezifität der beiden mARC-Proteine, mARC1 und mARC2, festgestellt werden konnte, denn beide *N*-Oxide werden exklusiv von mARC1 reduziert. Außerdem waren die Umsetzungsraten im Vergleich zu anderen bekannten Substraten gering. [77]

Diese Sachverhalte führten zu der Hypothese, dass TMAO analog der bereits getesteten *N*-Oxide reduziert werden kann. Um dies zu überprüfen, sollte eine geeignete analytische Methode entwickelt und etabliert werden. Der potentielle Metabolit der TMAO-Reduktion, TMA, sollte somit qualitativ und quantitativ erfasst werden können. Da auf Grund der vorliegenden Ergebnisse zur Reduktion von Nicotinamid-*N*-oxid und Amitriptylin-*N*-oxid von einer geringen Umsetzungsrate auszugehen war, musste die neue Methode eine ausreichende Empfindlichkeit aufweisen. Zusätzlich sollten die Versuchsbedingungen für *in vitro* Biotransformationsassays berücksichtigt werden. Mit der entsprechenden Methode sollte dann getestet werden, ob TMAO mARC-abhängig reduziert werden kann. Dazu sollten *in vitro* Biotransformationsstudien mit verschiedenen enzymatischen Testsystemen durchgeführt werden. Als zelluläres Testsystem sollten humane Zellen dienen. Des Weiteren sollten porcine Gewebepreparationen sowie das rekombinante, humane Enzymsystem untersucht werden. An Hand der rekombinanten Enzyme sollte überprüft werden, ob TMAO ebenfalls ausschließlich durch mARC1 reduziert wird. Die mARC2-Knockoutmäuse sollten ebenfalls Bestandteil dieser Testungen sein. Der Nachweis einer mARC-abhängigen TMAO-Reduktion könnte einen Hinweis auf die physiologische Funktion des *N*-reduktiven Enzymsystems liefern, die in der Detoxifizierung von TMAO und somit in der Schutzfunktion vor CVD bestehen könnte. Dies wäre auch der erste Nachweis einer Entgiftung eines durch FMO entstandenen Metaboliten. Ein mARC1-Knockout in humanen Zellen sollte Aufschluss darüber geben, ob auch im Zellsystem nur eines der beiden mARC-Enzyme an der TMAO-Reduktion beteiligt ist oder ob mARC2 die *N*-reduktive Aktivität aufrechterhalten kann. Außerdem sollte auch der Phänotyp der Knockoutzellen begutachtet werden. Ein erfolgreicher mARC1-Knockout in humanen Zellen könnte zum einen eine Untersuchung der Substratspezifität des *N*-Oxids gegenüber beiden mARC-Proteinen ermöglichen und zum anderen zusätzlich zur Erfassung eines Phänotyps sowie als zukünftiges Modell zur Testung weiterer Substrate dienen.

2 METHODENENTWICKLUNG

2.1 Analytik von Trimethylamin

Die Identifizierung und die Quantifizierung von TMA spielen insbesondere in der Lebensmittelanalytik und in der Diagnostik eine wichtige Rolle. In der Lebensmittelanalytik wird mit Hilfe des TMA-Gehalts der Frischegrad von Fisch und Meeresfrüchten ermittelt. Eine steigende TMA-Konzentration zeigt dabei eine fortschreitende Zersetzung des organischen Materials an. [30, 28, 29] Die für den Verfall verantwortlichen Mikroorganismen nutzen das in Fisch und Meeresfrüchten enthaltene TMAO als Elektronenakzeptor, um die Atmungskette aufrechtzuerhalten. [19] Dabei entsteht TMA als Reduktionsprodukt und verströmt den charakteristischen Geruch nach verdorbenem Fisch. In der Diagnostik hingegen ist nicht allein der TMA- sondern auch der TMAO-Gehalt von Interesse. Besteht der Verdacht einer Trimethylaminurie, so wird der Urin des Patienten auf den Gehalt der beiden Metabolite hin untersucht. [38, 39]

Es gibt eine große Anzahl an analytischen Methoden, die beide o. g. Bereiche abdecken und TMA qualitativ und quantitativ nachweisen. Die besondere Herausforderung hierbei ist, dass TMA nicht nur ein kleines, sondern auch ein leicht flüchtiges Molekül mit einem Siedepunkt von 3 °C ist. Weiterhin besitzt TMA kein chromophores System, was einen direkten spektroskopischen Nachweis ausschließt. Im Folgenden wird ein Überblick über die wichtigsten Methoden zur TMA-Analytik gegeben.

2.1.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Verglichen mit den meisten anderen spektroskopischen und chromatografischen Methoden ist die ¹H-NMR-Spektroskopie relativ unempfindlich. [130] Gleichzeitig bietet sie jedoch den Vorteil, dass TMAO und TMA nebeneinander in der gleichen Probe erfasst werden können. [131] Mit einer Detektionsgrenze von 51,4 µM TMA und 58,9 µM TMAO und einer Bestimmungsgrenze von 171,4 µM TMA und 196,4 µM TMAO (gemessen bei 300 MHz) ist diese Methode sehr unempfindlich und eignet sich daher nur für Anwendungen, in denen mit entsprechend hohen Konzentrationen zu rechnen ist. Sie wird hauptsächlich für die Diagnostik und somit für die TMAO- und TMA-Bestimmung aus dem Urin verwendet. [38]

2.1.2 Bildung und Vermessung von Pikraten

Obwohl TMA selbst kein Chromophor besitzt, kann mit Hilfe der Bildung von Pikraten trotzdem eine photometrische Analyse erfolgen. Diese Methode entstammt der Lebensmittelanalytik, in der Fischmuskelgewebe auf den Gehalt an TMA untersucht wird. Zunächst muss das TMA aus der Probe

herausgelöst und mit Hilfe einer starken Säure oder auch einem organischen Lösungsmittel gefangen werden. Durch Anpassung des pH-Werts und Zugabe eines Pikrinsäurereagenzes bildet sich ein Pikrat, dessen Entstehung photometrisch verfolgt werden kann. So kann auf die TMA-Konzentration rückgeschlossen werden. Ein Teil des TMAs kann jedoch bei der Probenaufbereitung verloren gehen und stünde der anschließenden Reaktion somit nicht mehr zur Verfügung. Des Weiteren stören andere Amine wie z.B. Dimethylamin (DMA) die Extraktion und die Nachweisreaktion. Insgesamt ist diese Methode daher als zu unspezifisch und zu unempfindlich für die spezifische Analyse kleiner Mengen TMA zu bewerten. [29, 28]

2.1.3 FIGD-IC-Analytik

Die Abkürzung FIGD-IC steht für *flow injection gas diffusion-ion chromatography* und beschreibt eine Methode, die eine gleichzeitige Analyse von Ammoniak und verschiedenen Methylaminen aus wässrigen Proben erlaubt. Unter stark basischem pH und der Anwesenheit von EDTA können die Analyten durch eine selektive Membran aus der Probe in ein saures Milieu diffundieren, in dem sie gefangen werden. Anschließend folgt die Chromatografie, in der die nun als Kationen vorliegenden Analyten getrennt und danach konduktometrisch detektiert werden. Der apparative Aufwand ist relativ hoch, da beispielweise die Diffusionszellen speziell angefertigt werden müssen. Trotzdem ermöglicht die FIGD-IC den Nachweis von u.a. TMA im nanomolaren Bereich. Die Methode wurde zur Seewasseranalytik entwickelt und stellt daher unter den vorgestellten Methoden eine Ausnahme dar. Trotz der geringen Nachweisgrenze und der Automation der Analytik eignet sich die FIGD-IC nicht zum Nachweis von TMA aus einem Biotransformationsansatz. Der apparative Aufwand ist zu hoch, die verwendeten Proteine können mit der Membran wechselwirken und ob die Anwesenheit hoher TMAO-Konzentrationen stört, wurde nicht untersucht. [132]

2.1.4 HPLC-Analytik

Die Trennung verschiedener Amine aus Lebensmittelproben kann auch mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) erfolgen. Man nutzt dazu die Ionenaustauschchromatografie und eine geeignete Detektion. Einige Amine lassen sich beispielsweise photometrisch detektieren, was jedoch weder für TMA noch für TMAO eine sinnvolle Analytik darstellt. [133] Daher hat sich auch die konduktometrische Detektion etabliert. [134, 135] Eine Variante stellt die Vorsäulenderivatisierung mit Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc) dar, die eine photometrische Detektion ermöglicht. Fmoc ist bekannt als Schutzgruppe, die unter Abspaltung von HCl mit primären oder sekundären Aminen reagiert. Die Ausbeute bei der Umsetzung mit dem tertiären Amin TMA ist ebenso unklar wie die Anwendbarkeit in Gegenwart hoher TMAO-Konzentrationen und Proteinen. [135] Für

Biotransformationsanalysen werden außerdem üblicherweise ^{14}C -markierte Amine als Testsubstrate verwendet, die bei einer Umsetzung zum entsprechend markierten Metaboliten umgesetzt werden. Dies kann radiochemisch verfolgt werden. [37]

2.1.5 Gaschromatographie

Die gaschromatografische Analyse von TMA macht sich den leicht flüchtigen Charakter des Moleküls zu Nutze. Urinproben, die zunächst stark angesäuert und dann eingeeengt werden, geben nach Alkalisierung und Erwärmung das gelöste TMA in die Gasphase ab. Diese wird dann in den Gaschromatografen injiziert und entweder mit einem Flammenionisationsdetektor oder einem Massenspektrometer detektiert. TMAO kann die Analytik nicht beeinflussen, da es durch den pH-Shift nicht in die Gasphase überführt wird und somit eine gute Trennung von TMA und TMAO erfolgt. Trotzdem kann auch die TMAO-Konzentration bestimmt werden, in dem bei der Probenvorbereitung Zinkpulver zur Reduktion von TMAO zugesetzt wird. Man kann somit indirekt über TMA den TMAO-Gehalt ermitteln. Da die publizierten Methoden auf der Diagnostik und somit auf der Untersuchung von Urin basieren, werden üblicherweise auch alle Konzentrationsangaben auf den jeweiligen Creatiningehalt der Probe bezogen. Ohne weitere Angaben zu den gemessenen Creatininwerten oder den Gesundheitszustand der Patienten ist eine Einschätzung der Detektions- und Bestimmungsgrenze nicht möglich und erschwert die Übertragung der Methode(n) auf andere Probenmaterialien. [136, 137, 134]

2.1.6 Massenspektrometrie

In der Literatur lassen sich diverse massenspektrometrische Methoden zur TMA-Analytik finden. Dazu gehören *Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry* (FAB-MS) [138], *Direct Infusion Electrospray Quadrupol Time-of-Flight Mass Spectrometry* (Q-ToF mit ESI) [139] und *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC/MS/MS) [39]. Allen Methoden gemeinsam ist die Derivatisierung von TMA, da eine direkte Vermessung nicht möglich ist. Die Methylierung von TMA mit Methyljodid ist weit verbreitet, teilweise wird dazu auch perdeuteriertes Methyljodid verwendet. [139, 138] Durch die Quarternisierung desamins geht der leicht flüchtige Charakter verloren. Es bleibt jedoch dabei, dass ein kleines Molekül ohne charakteristische Fragmentierung untersucht wird. Führt man bei der Derivatisierung von TMA einen größeren Rest als eine Methylgruppe ein, wird ein höheres Molekulargewicht erreicht und es kann auch zu einer Fragmentierung des Moleküls kommen, die zu einer erhöhten Spezifität führt. Lee *et al.* haben 2010 dazu beispielsweise Bromessigsäureethylester verwendet und messen damit TMA-Konzentrationen im unteren $\mu\text{molaren}$ Bereich. [39] Eine wichtige Frage bleibt jedoch: Stört die Anwesenheit hoher Konzentrationen von TMAO? Bei allen Methoden sind

Urinproben untersucht worden, die natürlicherweise sowohl TMA als auch TMAO enthalten. Es muss daher sichergestellt werden, dass bei einer Derivatisierung der Proben keine unerwünschten Nebenreaktionen mit TMAO stattfinden, die zu einer falsch zu hohen TMA-Konzentration führen. Ob und in welchem Ausmaß solche Nebenreaktionen stattfinden können, ist bei keiner der vorgestellten Methoden untersucht worden.

2.2 Anforderungen an Trimethylaminanalytik

Um zu untersuchen, ob das *N*-reduktive mARC-Enzymsystem TMAO zu TMA reduzieren kann, muss eine geeignete analytische Methode verwendet werden. Dabei müssen nicht nur die Eigenschaften des Analyten TMA, sondern auch die Versuchsbedingungen der *in vitro* Assays berücksichtigt werden. Diese Assays werden üblicherweise in kleinen Volumina durchgeführt, um Proteinmaterial einzusparen. Da zusätzlich von einer geringen Umsetzungsrate der TMAO-Reduktion auszugehen ist, was auf früheren Untersuchungen exogener *N*-Oxide beruht [98], muss die Methode eine ausreichende Empfindlichkeit aufweisen, um auch kleine TMA-Konzentrationen genau zu ermitteln. Die Methode muss außerdem spezifisch TMA nachweisen und darf durch die Anwesenheit anderer Amine wie Dimethylamin nicht gestört werden. Als Untersuchungsmaterial dienen gepufferte, wässrige, proteinhaltige Proben, die zusätzlich einen Überschuss an Substrat, also TMAO, enthalten. Es ist also auch darauf zu achten, dass die jeweilige Proteinquelle, der verwendete Puffer und der Überschuss an TMAO nicht stören. Da TMA leicht flüchtig ist, muss darauf geachtet werden, dass es während der Inkubation bzw. möglicher Probenvorbereitungen nicht entweicht.

Diese Anforderungen sollten in einer LC/MS/MS-Methode, also einer Kombination aus Flüssigchromatografie und Tandem-Massenspektrometrie, vereint werden. Literaturbekannte Methoden wie in 2.1 beschrieben dienen hierbei als Orientierung. Eine spektroskopische Methode wurde auf Grund des fehlenden Chromophors ausgeschlossen.

2.3 Entwicklung einer Methylierungsstrategie zur Vorsäulenderivatisierung

Die Entwicklung einer LC/MS Methode inklusive der Methylierung von TMA zum Tetramethylammoniumsalz als Vorsäulenderivatisierung erschien auf Grund der guten Datenlage aus der Literatur naheliegend. [139, 138] Zu allererst wurde Tetramethylammoniumchlorid als Standardsubstanz mit einer im Arbeitskreis etablierten Routinemethode vermessen.

Massenspektrometer	Bruker Amazon SL Ionenfallen-Massen-Spektrometer (Ion Trap, Bruker Daltonik, Bremen), Serial No. 00066	
HPLC	Agilent 1260 HPLC-System	
Stationäre Phase	Waters Xterra MS C8, 4,6 × 50 mm, 3,5 µm	
	Vorsäule: Phenomenex Security Guard C18-Vorsäule 3 × 4 mm	
Mobile Phase	A: 0,1 % Essigsäure (v/v)	
	B: Acetonitril	
Flussrate	1,0 ml/Min., Gradient	
Injektionsvolumen	1,0 µl	
Split	zum Abfall	0 – 2,4 Min.
		11,0 – 13,5 Min.
Gradient		
	Laufzeit in Min.	Fließmittelanteil in Prozent
	0	A: 97
	0,1 – 2,5	A: 95
	2,6 – 5,5	A: 35
	5,6 – 10,0	B: 100
	10,1 – 11,9	B: 100
	12,0 – 13,5	A: 97

Das Tetramethylammoniumkation (TetraMA) zeigte dabei ein Signal bei dem gesuchten Masse-Ladungsverhältnis von m/z 74. Für die Derivatisierung von TMA wurde Methyljodid als Reagenz gewählt (Abbildung 2.1).

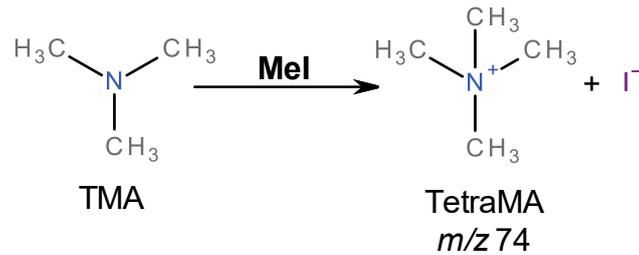


Abbildung 2.1: Reaktionsgleichung der Methylierung von Trimethylamin

Trimethylamin (TMA) reagiert mit Methyljodid (MeI) zu Tetramethylammoniumjodid, wobei das Tetramethylammoniumkation (TetraMA) ein Masse-Ladungs-Verhältnis von m/z 74 aufweist und als solches massenspektrometrisch erfasst werden kann.

Iodid ist eine gute Abgangsgruppe und die Einführung des vierten Rests am tertiären Amin erfolgt daher schnell und quantitativ. Da bei der Vermessung von TetraMA in Gegenwart von TMAO Störsignale detektiert wurden, sollte bereits vor der Derivatisierung von TMA zu TetraMA eine Abtrennung von TMAO erfolgen. Wie bei Mamer *et al.* (1999) beschrieben, sollte dies durch Flüssig-Flüssig-Extraktion realisiert werden. [138] Dabei wird mittels pH-Shift das protonierte TMA in seine freie Base überführt und kann anschließend mit einem organischen Lösungsmittel wie Diethylether aus der wässrigen Phase extrahiert werden. Da TMA eine hohe Basizität hat, liegt es erst im alkalischen Bereich als freie Base vor und ist dann mit organischen Lösungsmitteln ausschüttelbar. TMAO hingegen liegt bei allen pH-Werten als quartäres Ammoniumsalz vor und verbleibt somit im wässrigen Medium. Die organische Phase wird abgetrennt und mit Methyljodid derivatisiert. Das Lösungsmittel wird anschließend verdampft und das verbleibende Produkt mit Fließmittel aufgenommen und vermessen. Mit diesen Grundlagen wurde die Derivatisierung von TMA als Hydrochlorid in Gegenwart von TMAO durchgeführt und optimiert, wobei Tetramethylammoniumchlorid (TetraMA⁺Cl⁻) als Standard zur Kalibrierung diente (Abbildung 2.3). Bei den ersten Inkubationsversuchen zeigte sich jedoch, dass es ein Störsignal bei m/z 74 gab, das auch in jeder mitgeführten Kontrollprobe detektiert wurde und die Analyse des TetraMA-Peaks behinderte. Die Herkunft dieses Störsignals konnte nicht identifiziert werden, weshalb die Methylierung von TMA nicht weiter verfolgt worden ist.

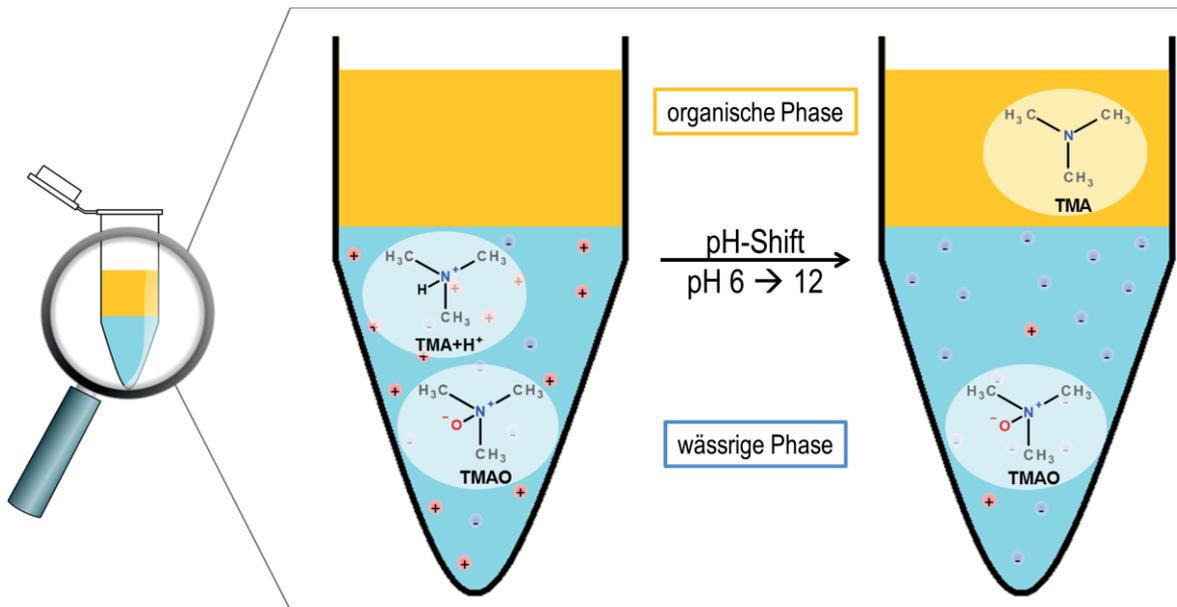


Abbildung 2.2: Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Abtrennung von Trimethylamin

In der wässrigen Phase bei pH 6,0 befinden sich sowohl Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) als auch das protonierte Trimethylamin (TMA+H⁺). Verschiebt sich der pH-Wert durch Zugabe einer Lauge nach ~ pH 12, so liegt TMA als freie Base vor und löst sich in der organischen Phase. TMAO hingegen verbleibt in der wässrigen Phase, somit können beide Verbindungen voneinander getrennt werden.

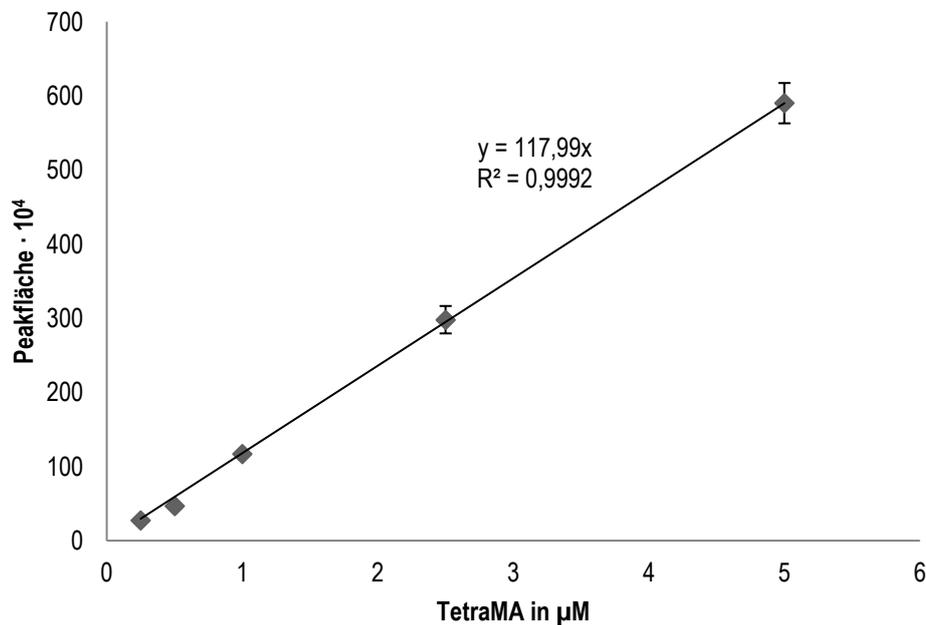


Abbildung 2.3: Kalibriergerade erstellt durch die Vermessung eines TetraMA-Standards

Durch die beschriebene Methode konnte Tetramethylammoniumchlorid (TetraMA⁺Cl⁻) nachgewiesen werden. Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Peakfläche und der Standardkonzentration. Das abgebildete Beispiel zeigt die Vierfachvermessung einer Konzentrationsreihe von 0,25 – 5 μM TetraMA Cl mit einer Richtigkeit von $(94 \pm 9) \%$.

2.4 Vorsäulenderivatisierung mit Benzylbromid

Statt einer Methylgruppe sollte nun eine Benzylgruppe als vierter Rest in das zu untersuchende Amin eingeführt werden. Als Reagenz wurde Benzylbromid (BnBr) gewählt. Bei der Reaktion von BnBr und TMA entsteht Benzyltrimethylammoniumbromid (BTMA⁺Br⁻), dessen Kation mit einem Masse-Ladungsverhältnis von m/z 150 keine Interferenzen mit möglichen Störsignalen bei m/z 74 aufzeigt (Abbildung 2.4). Die in 2.3 beschriebene Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Trennung von TMA und TMAO wurde zunächst beibehalten.

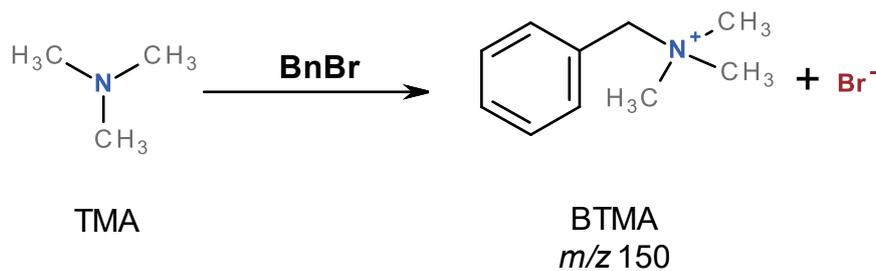


Abbildung 2.4: Reaktion von Trimethylamin mit Benzylbromid

Trimethylamin (TMA) und Benzylbromid (BnBr) reagieren zu Benzyltrimethylammoniumbromid (BTMA⁺Br⁻), dessen Kation (BTMA) ein Masse-Ladungsverhältnis von m/z 150 aufweist.

2.4.1 Interner Standard

Um mögliche Verluste bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion zu erfassen und die Quantifizierung zu verbessern, sollte zusätzlich ein interner Standard mitgeführt werden. Perdeuteriertes TMA als Deuteriumchlorid (TMA-d₉-DCI bzw. TMA-d₉) eignet sich aufgrund seiner leicht erhöhten Masse, die durch den Austausch von Wasserstoff zu Deuterium bei 68 g/mol im Vergleich zu 59 g/mol bei TMA liegt. Das Masse-Ladungsverhältnis der derivatisierten Verbindung ist entsprechend ebenso erhöht, während andere Eigenschaften wie die Löslichkeit, Reaktivität und pK_S nahezu unbeeinflusst bleiben. Der interne Standard wird den Proben für die Biotransformationsassays bereits vor der Inkubation zugesetzt und unterliegt den gleichen Einflüssen wie der Metabolit TMA. Bei der anschließenden Derivatisierung wird der interne Standard analog dem TMA umgesetzt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Korrekturfaktors, der nach folgender Formel ermittelt wird:

$$f = \frac{f_{IS}}{f_i} = \frac{m_i \cdot F_{IS}}{m_{IS} \cdot F_i} \quad (1)$$

Der Korrekturfaktor f kann mit der angegebenen Formel ermittelt werden. f = Korrekturfaktor; f_{IS} = Faktor des internen Standards; f_i = Faktor des Analyten; m_i = Einwaage Analyt bzw. Konzentration; m_{IS} = Einwaage interner Standard bzw. Konzentration; F_i = Peakfläche Analyt; F_{IS} = Peakfläche interner Standard.

Die Quantifizierung des Analyten muss jedoch nicht über den Korrekturfaktor selbst, sondern kann durch eine Umformung der Gleichung auch graphisch erfolgen. Zunächst wird die Formel nach m_i umgestellt und umgeformt.

$$m_i = \frac{f \cdot m_{IS} \cdot F_i}{F_{IS}} \quad (2)$$

$$m_i = f \cdot m_{IS} \cdot \frac{F_i}{F_{IS}} \quad (3)$$

Schließlich wird nochmals umgestellt, sodass die Gleichung einer Geradengleichung entspricht.

$$\frac{F_i}{F_{IS}} = m_i \cdot \frac{1}{f \cdot m_{IS}} \quad (4)$$

$$y = x \cdot m \quad (5)$$

Somit kann für die Kalibrierung das Peakflächenverhältnis des Analyten zum internen Standard auf der Y-Achse und die Konzentration des Analyten auf der X-Achse aufgetragen werden. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang, der auf der konstanten Konzentration des internen Standards und dem Korrekturfaktor f beruht.

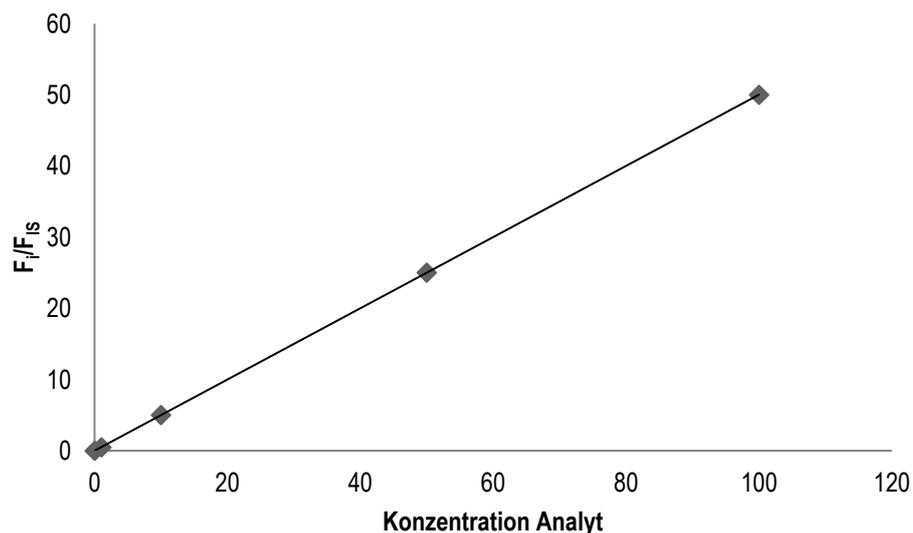


Abbildung 2.5: Beispielgraph für eine Kalibriergerade mit internem Standard

Wenn das Peakflächenverhältnis des Analyten (F_i) zum internen Standard (F_{IS}) auf der Y-Achse und die Analytkonzentration auf der X-Achse aufgetragen werden, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Man bestimmt zunächst das Peakflächenverhältnis der Probe und kann dann über die erhaltene Geradengleichung direkt die gesuchte Konzentration errechnen.

2.4.2 Synthese des perdeuterierten Benzyltrimethylammoniumbromids

Die Reaktion von BnBr mit TMA-d₉ verläuft analog der Reaktion mit TMA (Abbildung 2.6). Um das entstehende BTMA-d₉ zu testen, musste dies synthetisch hergestellt werden. Dazu wurde eine eisgekühlte, wässrige Lösung von TMA-d₉·DCl mit eisgekühltem Ether überschichtet und anschließend mit einer 0,1 M Natronlauge versetzt. Die dabei entstehende freie Base des TMA-d₉ wurde somit in die organische Phase überführt. Nach mehreren Waschschrinen wurde die organische Phase mit Benzylbromid, gelöst in Methanol, versetzt und über Nacht gerührt.

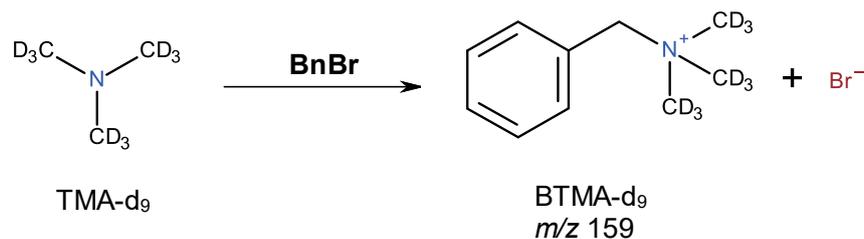


Abbildung 2.6: Synthese des perdeuterierten Benzyltrimethylammoniumbromids

Benzylbromid (BnBr) reagiert mit perdeuteriertem Trimethylamin (TMA-d₉) zum entsprechend deuterierten Benzyltrimethylammoniumbromid (BTMA-d₉⁺Br⁻), dessen Kation (BTMA-d₉) ein Masse-Ladungsverhältnis von *m/z* 159 besitzt.

2.4.3 Derivatisierung

Die Derivatisierung wurde im Inkubationspuffer PBS 100 mM, pH 6,0 durchgeführt. Auf den Zusatz von Protein und NADH wurde zunächst verzichtet. 300 µl der wässrigen Lösung aus Puffer, TMA (versch. Konzentrationen) und TMA-d₉ (0,2 µM) wurde mit dem gleichen Volumen eisgekühltem Ether überschichtet. Nach Zusatz von 60 µl 1 M NaOH wurden die Proben sorgfältig gevortext und die Etherphase abgetrennt. Der Waschschrin wurde zwei Mal wiederholt. Zur vereinigten Etherphase wurden 300 µl BnBr sowie jeweils 50 µl MeOH und Aqua bidest. hinzugegeben und gevortext. Die geschlossenen Reaktionsgefäße wurden 120 Min. bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen, anschließend konnte das Lösungsmittel über ca. 14 Std. abdampfen. Die Probe wurde mit 250 µl Aqua bidest. aufgenommen, gründlich gevortext und die wässrige Phase für die Vermessung abgenommen.

2.4.4 Umstellung auf LC/MS/MS Vermessung

Das Massenspektrometer ABSciex QTrap 5500 ermöglichte eine Vermessung im sogenannten Tandem-MS-Verfahren. Nach der Ionisierung durch Elektrospray (ESI) durchlaufen die Ionen einer Probe drei Quadrupole. Im ersten Quadrupol kann eine Selektion erfolgen, die nur Ionen mit einem

definierten Masse-Ladungsverhältnis passieren lässt. Der zweite Quadrupol ist die Kollisionskammer, in der die Ionen fragmentieren. Dabei können prinzipiell viele verschiedene Fragmente entstehen, es gibt jedoch charakteristische Fragmente, die man zur Qualifizierung und Quantifizierung nutzen kann. Daher gibt es im dritten Quadrupol wieder eine Selektion, sodass nur die charakteristischen Fragmente des gesuchten Analyten zum Detektor gelangen. Üblicherweise wählt man für jeden gesuchten Analyten zwei charakteristische Fragmente aus, sodass ein Massenübergang als sogenannter Qualifier, also zur Identifikation, und der andere als Quantifier, also zur Quantifizierung, herangezogen werden kann, wobei das Intensitätsverhältnis beider Ionen als zusätzlicher Kontrollparameter dient.

Dem ABSciex QTrap 5500 ist eine Shimadzu HPLC-Anlage vorgeschaltet. Durch die Einführung eines aromatischen Rests in den gesuchten Metaboliten TMA entsteht mit BTMA ein partiell lipophiles Molekül, das über eine Umkehrphasensäule von den restlichen Probenbestandteilen getrennt werden kann und dabei eine charakteristische Retention erfährt.

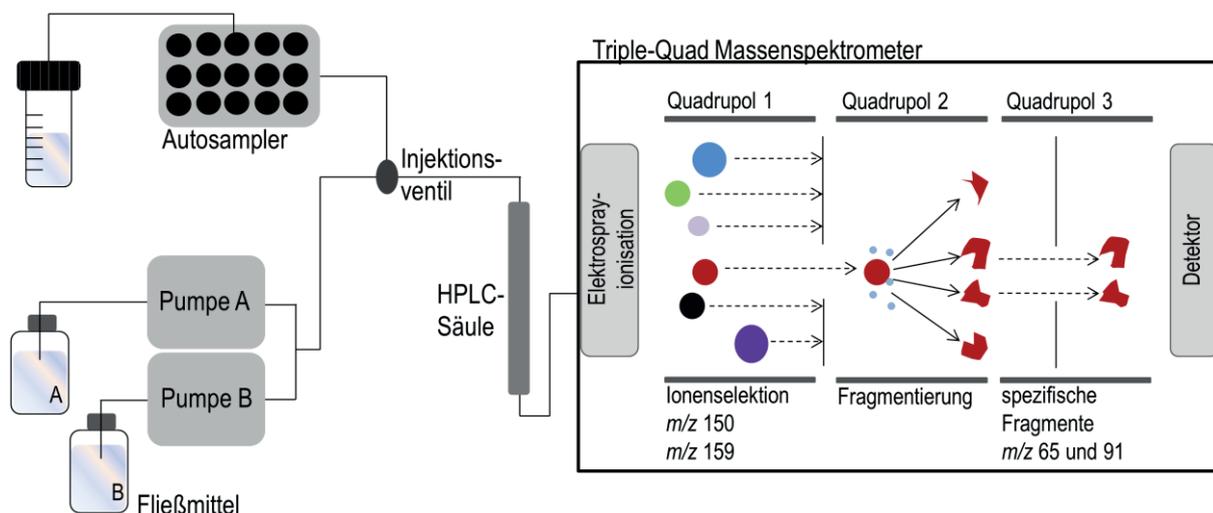


Abbildung 2.7: LC/MS/MS System

Die Darstellung zeigt den schematischen Aufbau der LC/MS/MS-Apparatur und den Ablauf einer Vermessung.

Für die Qualifizierung und Quantifizierung von BTMA und BTMA-d₉ ist folgende Methode erstellt worden:

Massenspektrometer	ABSciex QTrap 5500 Tripelquadrupol mit Elektrosprayionisation
HPLC	Shimadzu HPLC-System
Stationäre Phase	Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 50 mm, 2,7 µm Vorsäule: Phenomenex Security Guard C18-Vorsäule 3 × 4 mm
Mobile Phase	A: 0,2 % Essigsäure (v/v) Ba: 10 % Isopropanol (v/v), Bb: Acetonitril
Flussrate	0,5 ml/Min., Gradient
Injektionsvolumen	2 µl
Gradient	

Laufzeit in Min.	Fließmittelanteil in Prozent
0 – 2,0	A: 100
2,1 – 6,0	Ba: 100
6,1 – 9,0	Bb: 100
9,1 – 11,0	Ba: 100
11,0 – 11,1	A: 100
11,1 – 14,0	A: 100

Mit dieser Methode wurden beide Analyten BTMA (als kommerziell erworbener Standard, Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck) und BTMA-d₉ (als synthetisierte Substanz) vermessen. Es wurden jeweils zwei charakteristische Übergänge bei der Fragmentierung identifiziert: m/z 150 → 91 und m/z 150 → 65 für BTMA sowie m/z 159 → 91 und m/z 159 → 65 für BTMA-d₉ (Abbildung 2.8).

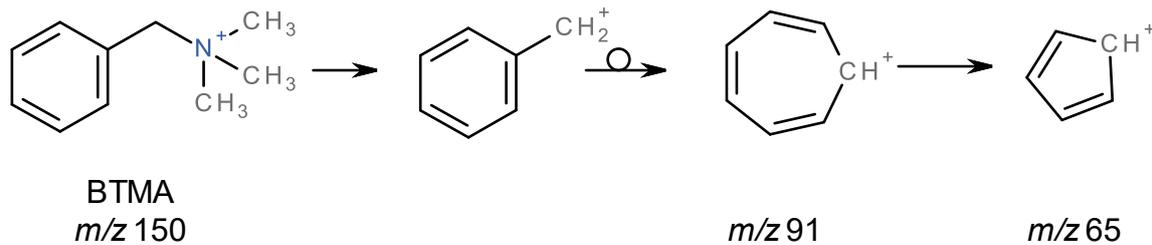


Abbildung 2.8: Fragmentierung des Benzyltrimethylammoniumkations

Das Benzyltrimethylammoniumkation (BTMA) bildet 2 charakteristische Fragmente: das Tropyliumkation mit einem Masse-Ladungsverhältnis von m/z 91 und das Cyclopentadienylkation mit einem Masse-Ladungsverhältnis von m/z 65. Letzteres entsteht aus dem Tropyliumkation durch Eliminierung von Ethen. Die Fragmentierung des aus dem internen Standard TMA- d_9 gebildeten BTMA- d_9 verläuft analog.

2.4.5 *In situ* Derivatisierung

Obwohl die beiden Standards BTMA (als kommerziell erworbener Standard, Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck) und BTMA- d_9 (als synthetisierte Substanz) die erwarteten Signale lieferten, konnte mit der in 2.4.3 beschriebenen Methode kein zufriedenstellendes Ergebnis erzeugt werden. Es wurde daher eine *in situ* Derivatisierung ohne Flüssig-Flüssig-Extraktion entwickelt, bei der die Benzilylierung von TMA und dem internen Standard TMA- d_9 in Gegenwart von TMAO ablaufen sollte. Dazu wurde zunächst, wie auch in 2.4.3, auf den Zusatz von NADH und Protein verzichtet. Allerdings wurde der gepufferten, wässrigen Lösung aus TMA und TMA- d_9 TMAO hinzugefügt. 300 μ l dieser Mischung wurden mit dem gleichen Volumen an Acetonitril ergänzt. Das Reagenz BnBr wurde als 10 %ige Lösung in Isopropanol im Überschuss zugesetzt und anschließend mit 60 μ l einer 1 M NaOH-Lösung alkalisiert, wobei die Reaktionsgefäße sofort nach Zusatz der Lauge verschlossen wurden. Nach einer Reaktionsdauer von 1 Std. bei RT wurden den Proben jeweils 300 μ l Aqua bidest. zugesetzt und jeweils 5 Min. geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und wie in 2.4.4 vermessen.

2.4.6 Testung verschiedener Trimethylamin-*N*-oxid-Chargen

TMAO ist in verschiedenen Qualitäten kommerziell erhältlich, von denen zwei Chargen erworben (Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck) und getestet wurden. Zum einen wurde TMAO in einer Reinheit von >98 % verwendet und zum anderen TMAO Dihydrat in einer Reinheit von >99,0 %. Letzteres wurde nach einer Vorschrift von Soderquist und Charles (1986) umkristallisiert. [140] Dazu wurde das TMAO Dihydrat in frisch getrocknetem Dimethylformamid unter Erwärmung gelöst und anschließend eingeeengt. Das umkristallisierte TMAO wurde noch für 2 Tage an der Vakuumpumpe getrocknet. Man erhält wasserfreies TMAO, das für synthetische Zwecke geeignet ist. In diesem Fall spielt allerdings nicht Wasser, sondern eine mögliche Verunreinigung mit TMA eine Rolle, die durch die Umkristallisation

entfernt werden sollte. Eine Verunreinigung mit TMA könnte zu einem falsch zu hohen Messergebnis führen. Daher wurden die drei verschiedenen TMAO-Chargen, TMAO > 98 %, TMAO Dihydrat > 99,0 % und TMAO umkristallisiert, nach der in 2.4.5 beschriebenen Methode derivatisiert und vermessen.

2.5 Vorsäulenderivatisierung mit Benzylchlorid

Gleichzeitig mit der Testung der verschiedenen TMAO-Chargen wurde Benzylchlorid (BnCl) als alternatives Reagenz zu BnBr überprüft. Chlorid ist im Vergleich zu Bromid eine schlechtere Abgangsgruppe, somit ist BnCl weniger reaktiv als BnBr. Da in verschiedenen Vortests der Verdacht entstand, BnBr könnte neben TMA auch eine Reaktion mit TMAO eingehen, sollte ein Vergleich beider Reagenzien Aufschluss über diesen Verdacht geben. Die Derivatisierung erfolgte analog der in 2.4.5 beschriebenen Methode, wobei das BnBr gegen BnCl ausgetauscht wurde. Außerdem wurde die Derivatisierungsreaktion durch die Zugabe von 500 µl Chloroform gestoppt. Die Chloroformzugabe beendet die Reaktion, indem es den im Überschuss vorliegenden Anteil des Benzylierungsreagenzes aus der wässrigen Phase abtrennt. Zusätzlich werden lipophile Nebenprodukte extrahiert.

2.5.1 Wiederfindung

Um die Wiederfindung zu überprüfen, wurde die Derivatisierung wie in 2.4.5 durchgeführt, wobei den Proben zusätzlich NADH und hitzedenaturiertes Protein beigefügt wurde. Die Konzentrationen entsprachen dabei der Zusammensetzung der Biotransformationsansätze (s. 3.2.3.3). Da in Abhängigkeit der verwendeten Proteinquelle und auch der jeweils verwendeten TMAO-Konzentration die Derivatisierung beeinflusst wird und zu falsch zu hohen Werten führen kann, wurde die Wiederfindung in die Kalibrierung (2.5.2) integriert.

Der logP Wert für BTMA liegt in einem Bereich von -2,2 bis -2,4. [141] Damit sollte der Großteil des BTMAs in der wässrigen Phase verbleiben und nur ein geringer Teil in die Chloroformphase übergehen. Dies wurde experimentell untersucht, indem BTMA-Lösungen entsprechend der Zusammensetzung für die Derivatisierung hergestellt wurden. Der Ansatz wurde jedoch verkleinert. Es wurden 75 µl 1 µM BTMA-Lösung mit 75 µl PBS 100 mM, pH 6,0 mit 50 µl Isopropanol, 30 µl 1 M NaOH, 150 µl Aqua bidest. und 500 µl Chloroform gemischt. Die wässrige Phase wurde direkt vermessen, die organische Phase wurde zunächst zum Verdampfen bei RT stehen gelassen und anschließend mit Aqua bidest. aufgenommen und vermessen. 58 % ± 4 % des eingesetzten BTMA wurden dabei in der wässrigen Phase wiedergefunden.

2.5.2 Kalibrierung

Um den internen Standard wie in 2.4.1 beschrieben zur Quantifizierung zu verwenden und gleichzeitig die Wiederfindung zu integrieren, wurde ein Kalibrierungsschema entwickelt, das bei jedem Versuch erneut mitgeführt wurde. Dazu wurden Proben hergestellt, die in der Zusammensetzung denen der Biotransformationsansätze entsprechen sollten (s. 3.2.3.3). Allerdings wurde die jeweils verwendete Proteinquelle durch zehnmütiges Abkochen hitzedenaturiert. Die Kalibrierungsproben werden gleichzeitig mit den Inkubationsproben derivatisiert. Das Derivatisierungsprotokoll wird dabei genau eingehalten.

TMA wurde in einer Konzentrationsreihe von 5 – 2000 nM zugesetzt. Des Weiteren wurden sowohl ein sogenannter TMAO-Blank und ein Protein-Blank erstellt. Für den TMAO-Blank wurde die Probe wie beschrieben zusammengesetzt, jedoch wurde kein Protein hinzugegeben und auch kein TMA. Dadurch konnte ermittelt werden, ob und in welchem Ausmaß TMAO selbst ein Signal für BTMA liefert. Bei dem Protein Blank verhält es sich ähnlich. Hier ist im Unterschied zum TMAO-Blank zusätzlich hitzedenaturiertes Protein enthalten, aber ebenso kein TMA. Nun kann in Abhängigkeit zu der jeweils verwendeten Proteinquelle überprüft werden, ob es zu einem Störsignal kommt. Der Messwert der Inkubationsproben kann entsprechend rechnerisch korrigiert werden. Durch den internen Standard können zudem alle äußeren Einflüsse, die sich auf die Derivatisierung auswirken können, kontrolliert werden.

2.6 Finale Methode

2.6.1 Auswahl Reagenz und Substrat-Charge

Durch die Testung der verschiedenen TMAO-Chargen mit beiden Reagenzien BnBr und BnCl wurde deutlich, dass nicht eine etwaige Verunreinigung des Substrats TMAO mit TMA zu Auffälligkeiten führte, sondern eine Nebenreaktion von TMAO mit BnBr ablief. Dadurch entstehen falsch zu hohe Werte, die eine genaue Quantifizierung des Analyten erschweren. BnCl reagiert durch die schlechtere Abgangsgruppe Chlorid in geringerem Ausmaß mit TMAO als BnBr, was in Abbildung 2.9 deutlich zu erkennen ist. BnCl eignet sich daher besser als Derivatisierungsreagenz. Da zwischen den verschiedenen TMAO-Chargen kein Unterschied bestand, wurde für die weiteren Versuche das TMAO Dihydrat mit einer Reinheit von > 99 % verwendet.

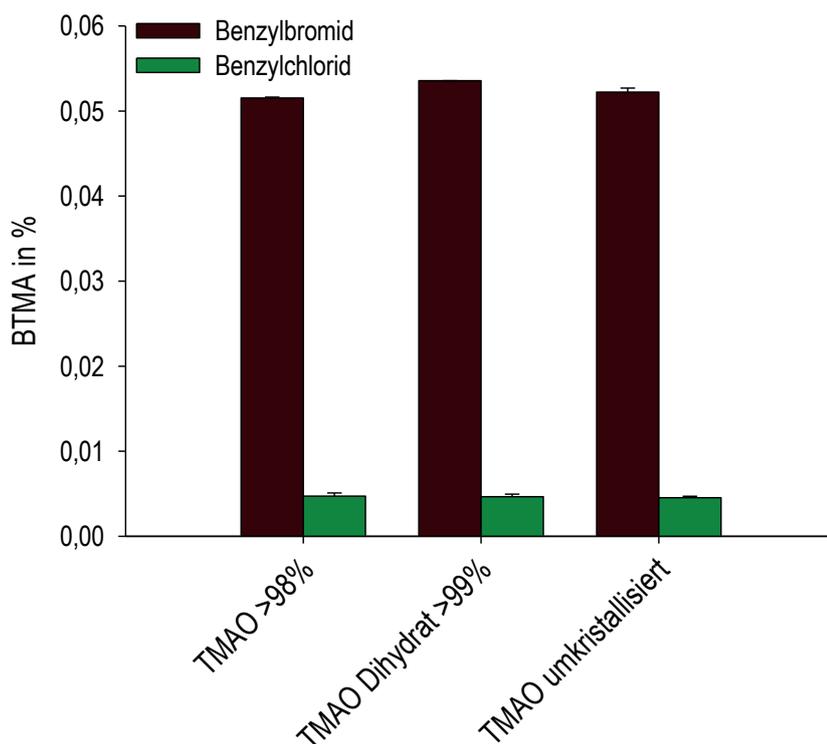


Abbildung 2.9: Testung verschiedener Trimethylamin-*N*-oxid-Chargen mit Benzylbromid und Benzylchlorid

Wie in 2.4.6 und 2.5 beschrieben, wurden verschiedene Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO)-Chargen getestet. Zum einen wurden die kommerziell erworbenen Chargen TMAO mit einer Reinheit von > 98 % und TMAO Dihydrat mit einer Reinheit von > 99,0 % getestet, zum anderen die aus dem Dihydrat umkristallisierte Variante. Die Derivatisierung verlief wie in 2.4.5 beschrieben mit Benzylbromid (BnBr), parallel wurde auch wie in 2.5 beschrieben mit Benzylchlorid (BnCl) derivatisiert. Angegeben ist die gemessene Benzyltrimethylammonium (BTMA)-Konzentration in Prozent bezogen auf die eingesetzte Menge TMAO.

2.6.2 Nebenreaktion mit Trimethylamin-*N*-oxid

Wie in 2.6.1 und Abbildung 2.9 gezeigt, kommt es zwischen TMAO und den verwendeten Benzylierungsreagenzien zu einer Nebenreaktion, wobei diese bei BnCl weniger stark ausgeprägt ist. Eine vergleichbare Reaktion ist bereits literaturbekannt. Godfrey und Ganem berichteten 1990 von der Herstellung von Aldehyden durch die Umsetzung von Halogeniden mit wasserfreiem TMAO in Dimethylsulfoxid (DMSO). [142] Bei dieser Reaktion wird TMA freigesetzt (s. Abbildung 2.10). Es ist anzunehmen, dass diese Reaktion auch in wässrigem Medium stattfinden kann. Das dabei entstehende TMA reagiert dann mit dem im Überschuss vorliegenden Halogenid zum entsprechenden Benzyltrimethylammoniumsalz und führt zu falsch zu hohen Werten.

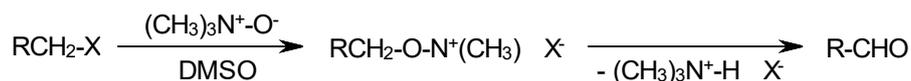


Abbildung 2.10: Reaktion von Halogeniden mit wasserfreiem Trimethylamin-*N*-oxid in Dimethylsulfoxid

Die Reaktionsgleichung nach Godfrey und Ganem, 1990, zeigt die Bildung von Aldehyden aus Halogeniden und wasserfreiem Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) in Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Nebenprodukt fallen dabei äquimolare Mengen Trimethylamin (TMA) an. In Gegenwart reaktiver Halogenide wie Benzylbromid (BnBr) oder Benzylchlorid (BnCl) kann daraus das entsprechende Benzyltrimethylammoniumsalz entstehen. [142]

Obwohl die Nebenreaktion mit BnCl deutlich geringer ausgeprägt ist, findet sie dennoch statt. Daher wurde die zeitabhängige Bildung von BTMA aus TMAO gesondert überprüft. Dazu wurden Proben hergestellt, die 0,1 μM TMA und 0,2 μM TMA- d_9 enthielten. Einigen Proben wurde TMAO (3 mM) zugefügt. Die Derivatisierung mit BnCl fand wie in 2.4.5 beschrieben statt, wobei die Reaktionsdauer von 15 Min. bis zu 8 Std. variiert wurde. Es zeigte sich, dass mit steigender Reaktionsdauer vermehrt BTMA entsteht, sofern TMAO anwesend ist. TMA reagiert nicht zu 100 % zu BTMA, jedoch findet eine nahezu vollständige Umsetzung statt, die nach 60 Min. annähernd ihr Maximum erreicht. Nach diesem Zeitraum ist auch die durch TMAO verursachte Nebenreaktion gering ausgeprägt und daher gut einkalkulierbar, wie in Abbildung 2.11 und Abbildung 2.12 zu erkennen. Die Reaktionsdauer wurde daher auf 60 Min. festgelegt.

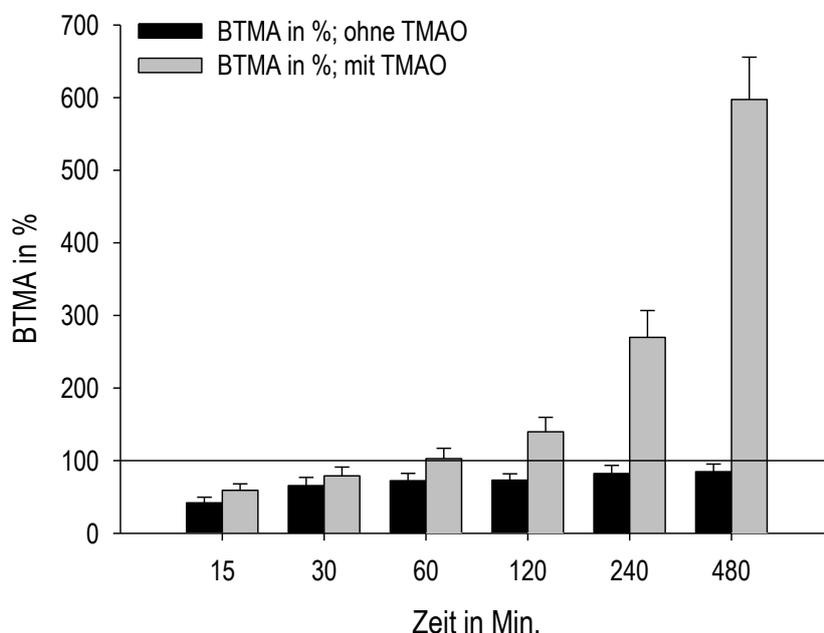


Abbildung 2.11: Zeitabhängige Bildung von Benzyltrimethylammoniumsalz – Vergleich der gebildeten Menge

Abhängig von der Reaktionsdauer wird Trimethylamin (TMA) nahezu vollständig zum Benzyltrimethylammoniumkation (BTMA) umgesetzt. In Gegenwart von Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) übersteigt der gefundene BTMA-Wert deutlich die 100%-Marke, die die eingesetzte Menge TMA und damit die theoretisch maximal nachweisbare Menge BTMA markiert. Dies ist auf die Nebenreaktion von TMAO mit dem Derivatisierungsreagenz zurückzuführen.

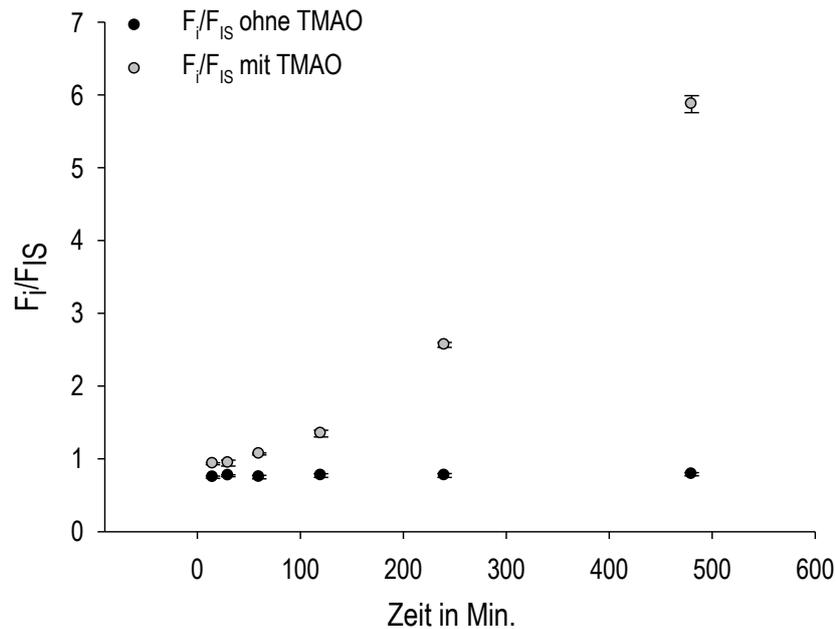


Abbildung 2.12: Zeitabhängige Bildung von Benzyltrimethylammoniumsalz – Vergleich der Peakflächenverhältnisse

Anders als in Abbildung 2.11 sind hier die Peakflächenverhältnisse des Analyten (F_i) zum internen Standard (F_{IS}) gegenüber der Reaktionsdauer dargestellt. Das Peakflächenverhältnis bleibt konstant, wenn in den Proben nur Trimethylamin (TMA) und der interne Standard vorliegen. Das steigende Peakflächenverhältnis in Gegenwart von Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) beruht auf der Nebenreaktion des Substrats mit dem Benzylierungsreagenz.

2.6.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Das Signal-Rauschverhältnis S/N wurde bestimmt und als Nachweisgrenze für TMA das dreifache Signal-Rauschverhältnis $3 S/N$ und als Bestimmungsgrenze das zehnfache Signal-Rauschverhältnis $10 S/N$ herangezogen. Die jeweils verwendete Proteinquelle hat einen entscheidenden Einfluss, diese wurde folglich mit einbezogen und die Werte als Umsetzungsraten bestimmt. Da bei Zellversuchen kein Zelllysat, sondern der zellfreie Überstand vermessen wird (s. 3.2.3.1), in dem sich keine Proteine befinden, wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze hier als absolute Konzentration angegeben (s. Tabelle 2.1).

Proteinquelle	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
ZR-75-1 Zellüberstand ^a	33	129
porcine Lebersubfraktionen (bestimmt am Homogenat) ^b	0,02	0,07
rekombinantes Enzymsystem mit hmARC1 ^b	0,04	0,12
murines Leberhomogenat ^b	0,01	0,06

Tabelle 2.1: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Angegeben sind Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der entwickelten LC/MS/MS-Methode in Abhängigkeit der getesteten Proteinquelle in ^a nM bzw. in ^b nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹

Die endgültige Methode zur Qualifizierung und Quantifizierung von TMA aus gepufferten, wässrigen Proben in Gegenwart hoher TMAO-Konzentrationen sowie Proteinen besteht aus einer Vorsäulenderivatisierung mit BnCl und einer anschließenden LC/MS/MS Analytik:

2.6.4 Probenvorbereitung

Die Proben werden nach erfolgter Inkubation und Abstoppen mit Acetonitril (ACN) (s. 3.2.3.3) derivatisiert. Zunächst werden jeder Probe 50 µl einer 10 % BnCl-Lösung in Isopropanol zugesetzt. Danach werden jeweils 30 µl einer 1 M NaOH hinzugefügt, wobei jedes Reaktionsgefäß nach Zugabe der Lauge sofort verschlossen werden muss. Das Reaktionsgemisch wird durch vortexen gründlich homogenisiert und für eine Std. bei RT stehen gelassen. Je nach zu erwartender Konzentration werden jeder Probe 150 µl Aqua bidest. und 500 µl Chloroform bzw. nur 500 µl Chloroform zugesetzt. Es folgt fünfminütiges Schütteln sowie abzentrifugieren. Ein Teil der oberen wässrigen Phase wird abgenommen und per LC/MS/MS vermessen.

Zu jeder Probencharge wird eine eigene Kalibrierung mitgeführt, die wie in 2.5.2 beschrieben durchgeführt wird. Die Kalibrierungsproben werden also entsprechend der jeweiligen Biotransformationsansätze aus dem Inkubationspuffer, TMAO, internem Standard, NADH, hitzedenaturiertem Protein und TMA zusammengesetzt. Auch ACN muss hinzugefügt werden, die Derivatisierung erfolgt dann zeitgleich mit den Proben aus der Inkubation wie oben beschrieben.

2.6.5 LC/MS/MS

Die in 2.4.4 beschriebene Methode wurde optimiert. Das Injektionsvolumen wurde der jeweils erwarteten Konzentration an Analyt angepasst. Als Software wurde Analyst 1.6.2 und für die Datenauswertung die Multiquant Software genutzt.

Massenspektrometer	ABSciex QTrap 5500 Tripelquadrupol mit Elektrosprayionisation	
Scan Modus	Multiple Reaction Mode (MRM)	
Elektrosprayionisation	4000 V, 550 °C	
Declustering- und Eintrittspotential	46 V und 10 V (für beide Ionen m/z 150 und 159)	
Kollisionsenergie	27 V (m/z 91) und 45 V (m/z 65)	
Gasdruck	Ionenquelle: Gas 1 40, Gas 2 60 Curtain Gas 25	
Messzeit	200 mSek. pro Übergang	
HPLC	Shimadzu HPLC-System	
Stationäre Phase	Poroshell 120 EC-C18 , 3,0 × 50 mm, 2,7 µm Vorsäule: Phenomenex Security Guard C18-Vorsäule 3 × 4 mm	
Mobile Phase	A: 0,2 % Essigsäure (v/v) Ba: 9% Acetonitril (v/v) Bb: Acetonitril	
Flussrate	0,5 – 1 ml/Min., Gradient	
Injektionsvolumen	0,5 – 3 µl	
Säulenofentemperatur	20 °C	
Autosamplertemperatur	4 °C	
Retentionszeiten	BTMA und BTMA-d ₉	4,4 Min.
Split	zum Abfall	0 – 3,1 Min. 6,0 – 12 Min.

Gradient

Laufzeit in Min.	Fließmittelanteil in Prozent	Flussrate
0 – 2,0	A: 100	0,5 ml/Min.
2,1 – 4,5	Ba: linear auf 100	0,5 ml/Min.
4,6 – 6,0	Bb: 100	0,5 ml/Min.
6,1 – 7,0	Bb: 100	linear auf 1 ml/Min.
7,1 – 7,4	Bb: 100	1 ml/Min.
7,5 – 8,5	Ba: 100	linear auf 0,5 ml/Min.
8,6 – 10,0	Ba: 100	0,5 ml/Min.
10,1 – 11,8	Ba: 100	linear auf 0,7 ml/Min.
11,9 – 12,0	Ba: 100	0,5 ml/Min.

Bei jeder Messung wurden Proben zur Qualitätskontrolle mitgeführt, die die Standardsubstanz BTMA Br in einer Konzentrationsreihe von 1 – 250 μM , gelöst im jeweils verwendeten Inkubationspuffer der Biotransformationsansätze, enthielten. Die Messung wurde akzeptiert, wenn ein Bestimmtheitsmaß von $> 0,9985$ erreicht wurde.

3 EXPERIMENTELLE METHODEN

3.1 Gewinnung und Charakterisierung verschiedener Proteinquellen

3.1.1 Kultivierung von ZR-75-1 Zellen

ZR-75-1 Zellen sind humane Brustkrebszellen, die mit einer Verdopplungszeit von 80 Std. wachsen. Die Zellen können als adhärenter Zellrasen in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert werden. Das Passagieren erfolgte alle sechs bis sieben Tage, wobei alle zwei bis drei Tage das Nährmedium gewechselt wurde. Zum Passagieren wurde zunächst das Nährmedium entfernt und der Zellrasen mit angewärmtem (37 °C) PBS gewaschen. Anschließend wurde auch der PBS entfernt und der Zellrasen mit Trypsin/EDTA (0,05 %) inkubiert, um die adhärenenten Zellen zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden in vorgewärmtem Nährmedium resuspendiert und gründlich vereinzelt, so dass die Zellsuspension in gewünschtem Splitverhältnis neu ausgesät werden konnte. Um eine bestimmte Zellzahl einzustellen, wurde die Zellzahl der Suspension mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und gleichzeitig ein Viabilitätstest mit Tryptanblau durchgeführt. Zur Kryokonservierung wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen in Einfriermedium gegeben und in einem Einfriercontainer mit 1 °C/Min. auf -80 °C gekühlt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Nährmedium: RPMI 1640 supplementiert mit

10 % FBS

2 mM L-Glutamin

0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren

1 mM Natriumpyruvat

1,5 g/l Natriumbicarbonat

Einfriermedium:

Nährmedium

10 % DMSO

3.1.2 Gewinnung der zellulären Proteine aus ZR-75-1 Zellen

Um die zellulären Proteine aus den ZR-75-1 Zellen zu erhalten, wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen anschließend mit eisgekühltem PBS versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgelöst und der Vorgang so lange wiederholt, bis alle Zellen quantitativ abgelöst und in ein

Falcontube überführt werden konnten. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1300 rpm wurde der Überstand vollständig abgesaugt und das verbleibende Pellet mit 100–200 µl eisgekühltem NP-40 Lysispuffer versetzt. Nach gründlicher Resuspendierung des Pellets wurde die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 1 Std. bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurden die zellulären Bestandteile für 10 Min. bei ca. 13000 rpm abzentrifugiert und das Zelllysate bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -20 °C gelagert.

3.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der verschiedenen Proben wurde nach der BCA-Methode von Smith *et al.* (1985) bestimmt. Zunächst wurden die Proben mit dem Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set (ThermoFisher Scientific) gefällt, sodass störende Puffer- und Begleitsubstanzen entfernt wurden. Anschließend wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Quantifizierung wurde mit einem Rinderserumalbuminstandard eine Kalibriergerade erstellt. Die photometrische Vermessung erfolgte bei 562 nm. [143]

3.1.4 SDS-PAGE und Westernblot

Die zellulären Proteine wurden mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli getrennt und per Westernblot-Analyse identifiziert [144]. Die Zelllysate wurden mit Ladepuffer (4x) 3:1 verdünnt, 5 Min. abgekocht und weitere 5 Min. bei ca. 13000 rpm abzentrifugiert. Die Taschen des Gels wurden mit jeweils gleichen Proteinmengen beladen. Die Proteine wurden für 20 Min. bei 80 V im Sammelgel fokussiert und anschließend bei 180 V für 1 Std. getrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Tank-Blotting, welches auch als Wet-Blotting bekannt ist, angewendet. Aus dem SDS-Gel, der Membran, Whatman-Papieren und Schwämmen wurde das sogenannte Sandwich zusammengebaut und in den Tank eingesetzt. Mit einer Spannung von 90 V sind über 2 Stunden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen worden. Die Membran wurde anschließend für eine Std. mit M-TBST geblockt, um unspezifische Bindestellen mit Milchpulver zu beladen. Dies erfolgte unter Schütteln und bei RT. Danach konnte die Membran mit dem Erstantikörper behandelt werden. Dafür wurde der Erstantikörper in M-TBST verdünnt und die Membran unter Schütteln entweder für 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem dieser Schritt abgeschlossen war, wurde die Membran 5 Mal für jeweils 10 Min. mit TBST gewaschen und anschließend für 1 Std. mit dem Zweitantikörper beladen. Auch dies erfolgte unter Schütteln und bei RT. Anschließend wurde erneut fünfmal für jeweils 10 Min. mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einem ECL-Substrat und die Chemielumineszenz wurde gemessen.

Ladepuffer (4x)

0,2 M Tris-Base pH 6,8

8% (m/v) SDS

40 % (v/v) Glycerol

20 % (m/v) β -Mercaptoethanol

0,02 % Bromphenolblau

Sammelgelpuffer (4x) pH 6,8

0,5 M Tris-Base

0,4 % (m/v) SDS

Trenngelpuffer (4x) pH 8,8

1,5 M Tris-Base

0,4 % (m/v) SDS

Kathodenpuffer (10x) pH 8,2-8,3

0,25 M Tris-Base

1,5 M Glycerin

1 % (m/v) SDS

Transferpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % (v/v) MeOH

TBST Puffer

20 mM Tris, pH 7,6

140 mM NaCl

0,1 % (v/v) Tween® 20

ECL-Reagenz

Lösung A: 0,25 g/l Luminol in 100 mM Tris, pH 8,6

Lösung B: 1,1 g/l *p*-Hydroxycoumarinsäure in DMSOvor Gebrauch pro Membran frisch herstellen: 2 ml Lösung A + 2 μ l H₂O₂ 30 % + 200 μ l Lösung B**3.1.5 Gewinnung der porcinen Lebersubfraktionen**

Ausgehend von einer frischen Schweineleber aus einer ortsnahen Schlachtereier sind neben dem Leberhomogenat selbst weitere subzelluläre Fraktionen durch die im Arbeitskreis etablierte Differential- und Dichtegradientenzentrifugation erhalten worden: der postnukleäre Überstand (PNS), Cytosol, Mikrosomen und Mitochondrien. [145, 68, 146] Ausgehend von den Mitochondrien konnte die äußere mitochondriale Fraktion angereichert werden. Dies erfolgte ebenso durch im Arbeitskreis etablierte Protokolle zur Dichtegradientenzentrifugation. [68, 146]

3.1.6 Expression und Reinigung der rekombinanten, humanen Proteine

Die Expression und Reinigung der humanen, rekombinanten Proteine erfolgte im Arbeitskreis Mendel an der Technischen Universität Braunschweig wie bei Wahl *et al.* (2010) beschrieben. Für beide mARC Proteine hmARC1 (NP_073583) und hmARC2 (NP_060368) ist der *E.-coli*-Stamm TP1000 verwendet worden, der in der Lage ist, eukaryotisches Moco zu exprimieren. Der hydrophobe Membrananker (N-terminal) ist dabei trunkiert. Nach dem gleichen Verfahren wurden Cysteinvarianten beider mARC-Proteine hergestellt, bei denen das hochkonservierte Cystein (C273 bei hmARC1 und C272 bei hmARC2) gegen die ähnliche Aminosäure Serin ausgetauscht worden ist. Bei hmARC1 entstand so die Variante C273S und bei hmARC2 C272S. Eine analoge Expression beider mARC-Proteine erfolgte im *E.-coli*-Stamm RK5206, der durch einen Defekt im *mogA*-Gen keinen Moco, sondern nur seinen Vorläufer MPT bilden kann. Es entstehen also jeweils die Apoproteine. Cyb5 (NP_085056) und Cyb5R (NP_000389) wurden im *E.-coli*-Stamm DL41 exprimiert. Auch hier war es notwendig, den hydrophoben Membrananker von Cyb5 C-terminal zu entfernen, damit eine zufriedenstellende Expression gewährleistet war. Bei Cyb5R hingegen konnte auf eine solche Verkürzung der entsprechenden cDNA verzichtet werden, da die Isoform 2, die natürlicherweise eine am N-Terminus verkürzte Variante der Isoform 1 darstellt, problemlos exprimiert werden konnte. Alle Proteine verfügen über einen N-terminalen His₆-tag und konnten so gereinigt werden. [69]

3.1.7 Häm-Saturierung von Cytochrom b₅

Um Cyb5 mit seinem Cofaktor Häm zu saturieren, wurde nach einer von Mulrooney und Waskell (2010) etablierten und von Plitzko (2013) modifizierten Methode verfahren. [147, 83] Zunächst wurde eine Häm-Lösung hergestellt, in der sich ein Tris-Häminkomplex bildet. Diese Lösung wurde dem Cyb5 zugesetzt und die Saturierung des Proteins mit Häm mittels Aufnahme von Absorptionsspektren kontrolliert. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 350 nm bis 500 nm. Der Prozess wurde als vollständig angesehen, wenn der Soret-Peak bei 413 nm in ein Plateau überging, was durch einen Überschuss an freiem, Tris-komplexierten Hämin verursacht wird.

3.1.8 Bestimmung des Cofaktorgehalts der rekombinanten Proteine

3.1.8.1 Bestimmung des Mo-Gehalts von mARC

Da der Moco oxidationsempfindlich und dadurch instabil ist, kann dessen Konzentration nicht direkt bestimmt werden. Stattdessen wurde der Molybdängehalt ermittelt. Pro Mol Cofaktor bindet der eukaryotische Moco ein Mol Molybdän (Mo), weshalb über die Mo-Konzentration auf den Moco-Gehalt geschlossen werden kann. Der Molybdän-Gehalt der rekombinanten mARC-Proteine wurde mittels

Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, 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. [148, 116] Die Probenvorbereitung erfolgte allerdings ohne vorheriges Umpuffern. [105] Hierfür wurden die Proteine zunächst mit Lagerpuffer pH 7,4 (25 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 % Glycerol (v/v)) 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.

3.1.8.2 Bestimmung des Häm-Gehalts in Cytochrom b_5

Der Häm-Gehalt von Cyb5 wurde nach einer Methode von Estabrook und Werringloer (1978) bestimmt. Sowohl von der NADH-reduzierten als auch von der oxidierten Form von Cyb5 wurden Absorptionsspektren aufgenommen und die Absorptionsdifferenz zwischen dem Maximum bei 426 nm und dem Minimum bei 409 nm ermittelt. An Hand des Absorptionskoeffizienten der reduzierten Form von Cyb5 ($\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) konnte der Häm-Gehalt der Probe berechnet werden. [149]

3.1.8.3 Bestimmung des FAD-Gehalts in Cytochrom b_5 Reduktase

Der FAD-Gehalt wurde nach einer Methode von Whitby (1953) ermittelt. Nachdem die gepufferten Proben abgekocht und bei ca. 13000 rpm abzentrifugiert worden sind, wurde der erkaltete Überstand bei 450 nm vermessen. Durch die zusätzliche Vermessung eines FAD-Standards konnte die Konzentration der Probe bestimmt werden. [150]

3.1.9 Gewinnung der murinen Leberhomogenate

Die murinen Lebern von Wildtyp- und mARC2-Knockoutmäusen wurden mit Hilfe eines Skalpell vorzerkleinert und anschließend in Standardpuffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4) homogenisiert und aliquotiert. Bis zur Proteinbestimmung und der weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80°C gelagert. [128] Die Züchtung, Kreuzung, Genotypisierung und die Organentnahme erfolgten im *Maria Sklodowska-Curie Memorial Cancer*

Center and Institute of Oncology, Department of Genetics, in Warschau, Polen durch unseren Kooperationspartner Dr. Michal Mikula und seine Arbeitsgruppe.

3.2 Biotransformationsstudien

3.2.1 Überprüfung der *N*-reduktiven Aktivität mit Benzamidoxim als Modellsubstrat

3.2.1.1 *In vitro* Biotransformationsstudien mit humanen ZR-75-1 Zellen

In ein 6-Wellplate wurden ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well ausgesät und sechs Tage, bis zu einer Konfluenz von 80–100 %, kultiviert. Der Zellrasen wurde mit 2 ml angewärmten (37 °C) HBSS Inkubationsmedium gewaschen und anschließend mit 2 ml angewärmten (37 °C) HBSS Inkubationsmedium für 10 Min. im Brutschrank vorinkubiert. Das substratfreie Medium wurde vollständig abgesaugt und durch substrathaltiges Medium ersetzt, wobei im HBSS Inkubationsmedium 5 mM BAO enthalten waren. Die Wellplate(s) wurde(n) für 180 Min. im Plattenschüttelinkubator bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und direkt wie in 3.2.1.5 beschrieben vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.2 *In vitro* Biotransformationsstudien mit porcinen Lebersubfraktionen

Es wurden einzeln verschiedene porcine Lebersubfraktionen getestet: postnukleärer Überstand (PNS), Cytosol, Mitochondrien, Mikrosomen und die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV). In einem Inkubationsansatz von 150 µl 100 mM PBS, pH 6,0 wurden je 0,005 mg Protein eingesetzt. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Neben dem jeweiligen Protein wurde BAO als Substrat in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Nach einer Vorinkubationszeit von 3 Min. im Schüttelwasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und nach 10 Min. mit 150 µl eisgekühltem ACN abgestoppt, gefolgt von fünfminütigem Schütteln und fünfminütiger Zentrifugation. Der Überstand wurde direkt wie in 3.2.1.5 beschrieben vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.3 *In vitro* Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen

Das *N*-reduktive Dreikomponentenenzymssystem, bestehend aus den rekombinanten Enzymen hmARC1 bzw. hmARC2, Cyb5 und Cyb5R, wurde in 20 mM MES-Puffer, pH 6,0 rekonstituiert. Dabei wurden die rekombinanten Enzyme bezogen auf ihren Cofaktorgehalt eingesetzt. Die Inkubationsansätze enthielten 75 pmol Mo (entspricht 75 pmol Moco) von hmARC1 bzw. hmARC2,

75 pmol Häm von Cyb5 und 7,5 pmol FAD von Cyb5R. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 150 µl 20 mM MES-Puffer, pH 6,0 wurde neben den Proteinen BAO als Substrat in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. Nach einer Vorinkubationszeit von 3 Min. im Schüttelwasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und nach 15 Min. mit 150 µl eisgekühltem ACN abgestoppt, gefolgt von fünfminütigem Schütteln und fünfminütiger Zentrifugation. Der Überstand wurde direkt wie in 3.2.1.5 beschrieben vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.4 *In vitro* Biotransformationsstudien mit murinen Leberhomogenaten

In einem Inkubationsansatz von 150 µl 100 mM PBS, pH 6,0 wurden je 0,075 mg Protein des murinen Leberhomogenats eingesetzt. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Neben dem Protein wurde 3 mM BAO als Substrat eingesetzt. Nach einer Vorinkubationszeit von 3 Min. im Schüttelwasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und nach 20 Min. mit 150 µl eisgekühltem ACN abgestoppt, gefolgt von fünfminütigem Schütteln und fünfminütiger Zentrifugation. Der Überstand wurde direkt wie in 3.2.1.5 beschrieben vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.5 HPLC-Analytik

Zur Quantifizierung von Benzamidin (BA), dem Metaboliten der mARC vermittelten BAO-Reduktion, aus den Biotransformationsansätzen mit rekombinanten, porcinen oder murinen Proteinquellen wurde eine nach Clement *et al.* (2005) modifizierte Methode verwendet. [145]

Stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B (5 µm, 250 · 4 mm)	
	Vorsäule SecurityGuard™ Cartridges C8 (4 · 3,0 mm)	
Mobile Phase	10 mM Octylsulfonat; 20 % (v/v) Acetonitril	
Flussrate	1,0 ml/Min.	
Injektionsvolumen	10 µl	
Laufzeit	20 Min.	
Detektion	229 nm	
Retentionszeiten	Benzamidoxim	6,9 Min. ± 0,2 Min.
	Benzamidin	16,2 Min. ± 0,2 Min.

Die Kalibrierung mit Benzamidin erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,5 – 250 μM und zeigte eine lineare Abhängigkeit ($R^2 = 0,9992$). Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,5 μM .

Um BA aus dem zellulären Überstand zu quantifizieren, wurde eine nach Schwering (2010) modifizierte Methode verwendet. [151]

Stationäre Phase	GEMINI® 5 μm NX-C18 110Å (150 · 4,6 mm)	
	Vorsäule SecurityGuard™ Cartridges C8 (4 · 3,0 mm)	
Mobile Phase	50 mM Ammoniumacetat, pH 7,0; 10 % (v/v) Methanol	
Flussrate	1,0 ml/Min.	
Injektionsvolumen	10 μl	
Laufzeit	15 Min.	
Detektion	229 nm	
Retentionszeiten	Benzamidin	4,6 Min. \pm 0,1 Min.
	Benzamidoxim	9,6 Min. \pm 0,1 Min.

Die Kalibrierung mit Benzamidin erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,5 – 500 μM und zeigte eine lineare Abhängigkeit ($R^2 = 0,9987$). Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,1 μM .

3.2.2 Überprüfung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung aus Nitrit bzw. Glyceroltrinitrat

3.2.2.1 Stickstoffmonoxid-Bestimmung im Stickstoffmonoxid-Analyzer

Die Vermessung erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Günter Schwarz an der Universität Köln am Sievers Nitric Oxide Analyzer (NO-Analyzer) 280i (NOA) (GE Analytical Instruments). Es war ein spezielles Reaktionsgefäß angeschlossen, mit dem die Vermessung flüssiger Proben durchgeführt werden konnte. Mit Hilfe eines Trägergases (Argon oder Stickstoff, hochrein) wird dieses Reaktionsgefäß durchspült. Die Zugabe der Probe ist über ein Septum möglich. Aus der Flüssigkeit entstehendes NO wird mittels des Trägergases in die Reaktionskammer des NOA überführt, in dem NO mit Ozon reagiert. Die entstehende Chemielumineszenz wird mit einem Detektor (Photomultiplier) erfasst und als NO-Signal in mV angezeigt. Das Reaktionsgefäß erlaubt die Kontrolle der Versuchstemperatur, da Wasser bzw. Öl einer bestimmten Temperatur mittels Pumpe durch die Ummantlung des Reaktionsgefäßes gespült werden kann. Für Versuche unter Sauerstoffeinfluss kann dem Trägergas Sauerstoff beigemischt werden. Die Detektionsgrenze liegt dabei bei 1,2 mV und die Bestimmungsgrenze bei 4,0 mV bezogen auf die Basislinie.

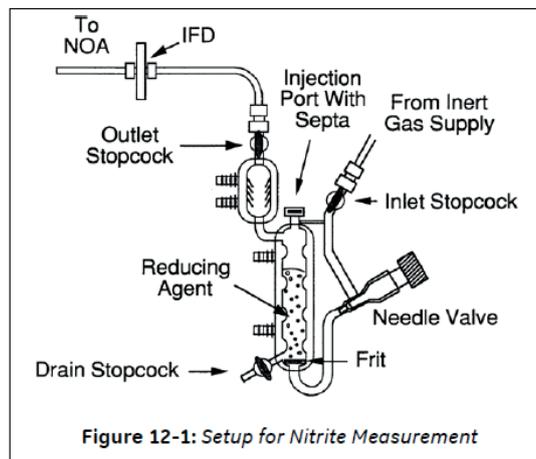


Abbildung 3.1 Reaktionsgefäß für die Vermessung flüssiger Proben

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Reaktionsgefäßes für die Vermessung flüssiger Proben am Sievers NO-Analyzer und ist dem Handbuch entnommen. [152]

3.2.2.2 Anaerobe *in vitro* Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen

Die rekombinanten Enzyme wurden bezogen auf ihren Cofaktorgehalt eingesetzt. Die Inkubationsansätze enthielten 400 pmol Mo (entspricht 400 pmol Moco) von hmARC1 bzw. hmARC2, 400 pmol Häm von Cyb5 und 40 pmol FAD von Cyb5R. Die Inkubationen wurden unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im NOA durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 6 ml Puffer, entweder

20 mM MES-Puffer, pH 6,0, 50 mM TRIS-Puffer pH 7,4, oder 50 mM BIS-TRIS-Puffer pH 7,0 oder pH 7,4, wurde neben den Proteinen 3 mM Substrat (Nitrit oder Glyceroltrinitrat (GTN)) und 167 μ M NADH eingesetzt. Zunächst wurde das Reaktionsgefäß mit Puffer und 100 μ l Antifoam A (zur Unterdrückung der Schaumbildung durch die Proteine) befüllt und der Druck des Trägergases angepasst. Alle weiteren Bestandteile des Inkubationsansatzes wurden nach und nach, oder aber auch in einer Vormischung, über das Septum injiziert. Das NO-Signal wurde zeitgleich vermessen.

3.2.2.3 Aerobe *in vitro* Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen

Die Versuche wurden wie in 3.2.2.2 beschrieben durchgeführt, jedoch wurde dem Trägergas Sauerstoff zugemischt.

3.2.3 Überprüfung der *N*-Reduktion von Trimethylamin-*N*-oxid

3.2.3.1 *In vitro* Biotransformationsstudien mit humanen ZR-75-1 Zellen

Die Inkubation fand wie in 3.2.1.1 beschrieben statt, wobei das substrathaltige Medium als Substrat 5 mM TMAO enthielt. Nach der Inkubation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und direkt vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt. Abweichend zu 3.2.3.5 wurden jeweils 120 µl der Proben mit 30 µl 1 µM TMA-d₉ Stammlösung (in HBSS) versetzt, bevor derivatisiert wurde. Zur Erstellung der Kalibrierungsproben wurde der Inkubationspuffer mit 5 mM TMAO, 30 µl 1 µM TMA-d₉ Stammlösung (in HBSS) und 5 - 2000 nM TMA gemischt, anschließend erfolgte die Derivatisierung und Vermessung (3.2.3.5).

3.2.3.2 *In vitro* Biotransformationsstudien mit porcinen Lebersubfraktionen

Es wurden wie in 3.2.1.2 beschrieben PNS, Cytosol, Mitochondrien, Mikrosomen und OMV getestet. Als Substrat wurde 3 mM TMAO und zusätzlich 0,2 µM TMA-d₉ als interner Standard eingesetzt. In einem Inkubationsansatz von 150 µl 100 mM PBS, pH 6,0 wurden je 0,005 mg Protein eingesetzt. Nach der Inkubation wurde der Überstand direkt wie in 3.2.3.5 beschrieben vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3.3 *In vitro* Biotransformationsstudien mit rekombinanten Enzymen

Es wurde wie in 3.2.1.3 beschrieben vorgegangen, wobei dem Inkubationsansatz als Substrat 3 mM TMAO und zusätzlich 0,2 µM TMA-d₉ als interner Standard zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde der Überstand direkt wie in 3.2.3.5 beschrieben vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3.4 *In vitro* Biotransformationsstudien mit murinen Leberhomogenaten

Es wurde wie in 3.2.1.4 beschrieben inkubiert, wobei dem Ansatz als Substrat 3 mM TMAO und zusätzlich 0,2 µM TMA-d₉ als interner Standard zugesetzt wurden. Nach der Inkubation wurde der Überstand direkt wie in 3.2.3.5 beschrieben vermessen oder bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3.5 LC/MS/MS-Analytik

Die Vermessung der Proben erfolgte mit der speziell entwickelten Methode wie in 2.6.4 und 2.6.5 beschrieben.

3.3 Knockout von mARC1 mittels CRISPR/Cas

3.3.1 Knockout-Methode

CRISPR steht für *clustered regularly interspaced palindromic repeat* und Cas für CRISPR-assoziierte Proteine. [153] Üblicherweise wird für Knockout (KO)-Projekte die Endonuklease Cas9 verwendet. Sie besitzt zwei katalytische Zentren, die jeweils einen DNA-Strang zerschneiden können. Es entsteht ein Doppelstrangbruch, der durch einen sogenannten Single-Cut hervorgerufen wird. Cas9 bildet dazu einen Komplex mit nichtkodierender RNA, und zwar mit der *CRISPR-RNA* (crRNA) und der *transactivating crRNA* (tracrRNA). [154] Für die Genom-Editierung können diese beiden RNAs in einem Molekül vereint werden, man nennt diese *single guide RNA* (sgRNA). Die sgRNA beinhaltet eine *Spacer*-Sequenz, die 20 Basenpaare (bp) lang ist und mit der komplementären DNA-Sequenz des Zielgens hybridisiert. Gefolgt wird diese Sequenz von der *protospacer-adjacent-motif* (PAM) Sequenz, diese haben meistens die Sequenz 5'-NGG-3'. [155] Sie wird direkt von der Cas9 gebunden, sodass die Zielsequenz drei bp „oberhalb“ der PAM geschnitten werden kann (s. Abbildung 3.2). [156] Dabei entsteht ein Doppelstrangbruch, der durch die Zelle entweder durch das Verbinden nicht-homologer DNA-Enden (*nonhomologous end-joining*, NHEJ) oder durch homologe Rekombination (*homology-directed repair*, HDR) repariert wird (s. Abbildung 3.3). Bei der NHEJ entstehen häufig Insertionen oder Deletionen in der DNA, man nennt diese auch Indels. Sind davon proteinkodierende Bereiche betroffen, so kann die DNA nicht mehr fehlerfrei abgelesen werden, die Translation ist gestört und das entsprechende Protein wird nicht mehr exprimiert. Es ist eine *Loss-of-function*-Mutation bzw. ein KO entstanden. Die NHEJ ist die dominierende Reparaturmethode, sie ist zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus aktiv. Die HDR läuft nur während der Zellteilung in der S- oder G2-Phase ab und führt normalerweise nicht zu Mutationen, sondern repariert die DNA sehr genau. Dazu wird ein während der Zellteilung vorliegender, identischer DNA-Strang als Template benutzt. [103]

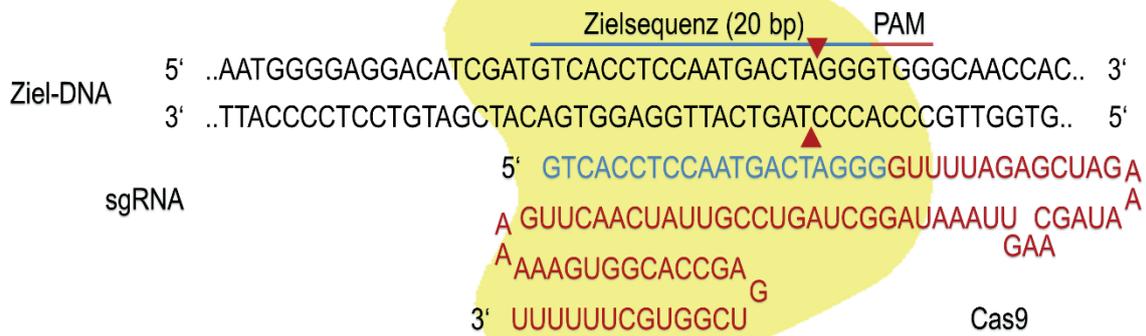


Abbildung 3.2: Bindung der sgRNA und Cas9 an die Zielsequenz (modifiziert nach Ran *et al.* [157])

Eine beliebige Zielsequenz von 20 Basenpaaren (bp) innerhalb der DNA, flankiert von einer *protospacer-adjacent-motif* (PAM) Sequenz, kann durch die passende *single guide* RNA (sgRNA) adressiert werden. Die sgRNA hybridisiert an die zur Zielsequenz komplementäre Sequenz. Nun bindet Cas9 und schneidet die DNA 3 bp von der PAM-Sequenz entfernt, sodass ein Doppelstrangbruch entsteht (Schnittstellen symbolisiert durch rote Pfeilspitzen).

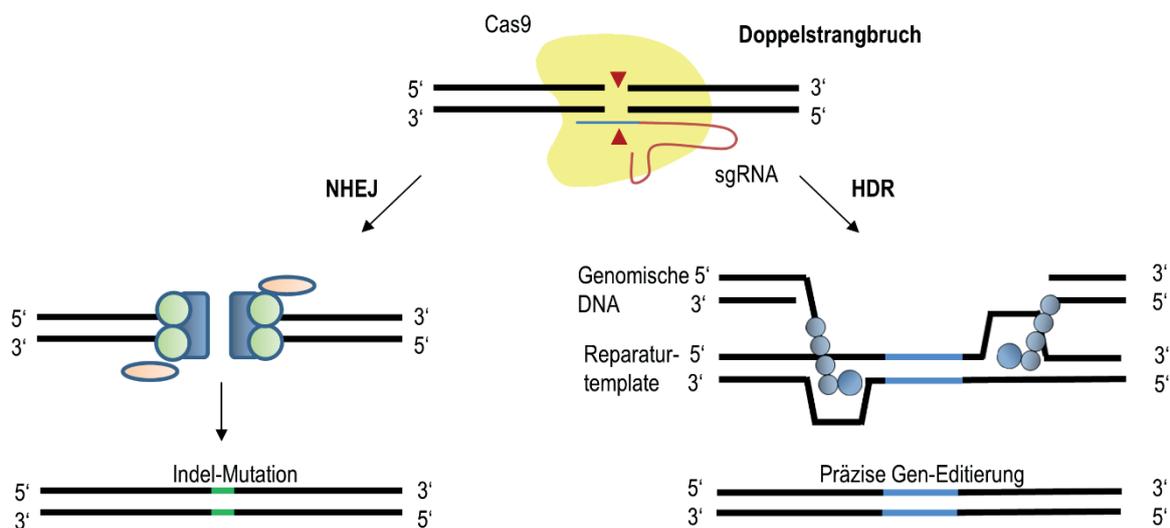


Abbildung 3.3: Reparaturmechanismen nach Doppelstrangbruch (modifiziert nach Ran *et al.* [157])

Nach einem Doppelstrangbruch innerhalb der DNA kann es zu zwei Reparaturmechanismen kommen. Am häufigsten läuft die nichthomologe Rekombination (*nonhomologous end-joining*, NHEJ) ab, bei der es zur Entstehung von Insertionen oder Deletionen (Indels) und damit zu *Loss-of-function*-Mutationen kommen kann. Die homologe Rekombination (*homology-directed repair*, HDR) benötigt ein Reparaturtemplate und findet daher nur in Phasen der Zellteilung statt, in denen ein solches vorliegt. Hier wird die DNA i. d. R. fehlerfrei repariert.

Für die gezielte Editierung eines bestimmten Gens muss also eine geeignete sgRNA designt werden, deren *Spacer*-Sequenz das gewünschte Gen selektiv erkennt. Bindet die sgRNA an einer oder mehreren anderen Stellen innerhalb der DNA, kann es zu ungewollten und teils unerkannten Mutationen, zu sogenannten Off-Target-Effekten, kommen. Inzwischen gibt es Online-Tools, die mit Hilfe spezieller Algorithmen die Wahrscheinlichkeit von Off-Target-Effekten abschätzen. [158] Neben der sgRNA braucht man noch die Cas9, beides muss dann in die Zielzellen eingeschleust werden. Die beiden katalytischen Zentren der Cas9 lassen sich unabhängig voneinander inaktivieren. Verbleibt nur ein katalytisches Zentrum, so entsteht kein Doppelstrang- sondern ein Einzelstrangbruch. [156] Man nennt diese Enzymvarianten Cas9n oder Nickasen. Wenn man eine Nickase zur Genom-Editierung verwendet und zwei unterschiedliche sgRNAs anbietet, die jeweils an unterschiedlichen Stellen an jeweils einem der beiden DNA-Stränge binden, so resultieren zwei gleichzeitige Einzelstrangbrüche an verschiedenen Stellen des Zielgens, die dann durch die NHEJ repariert werden und zum KO führen (s. Abbildung 3.4). Sollte eine der beiden sgRNAs an einer falschen Stelle in der DNA binden, kommt es lediglich zum Einzelstrangbruch. Off-Target-Effekte treten damit kaum auf, die Spezifität ist um etwa 1500 Mal höher als bei Verwendung der Cas9. [159]

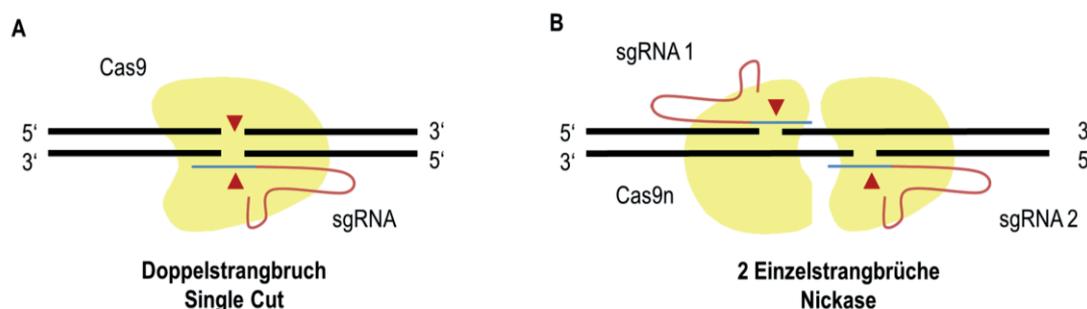


Abbildung 3.4: Single-Cut-Mechanismus und Nickase-Mechanismus (modifiziert nach Ran *et al.* [159])

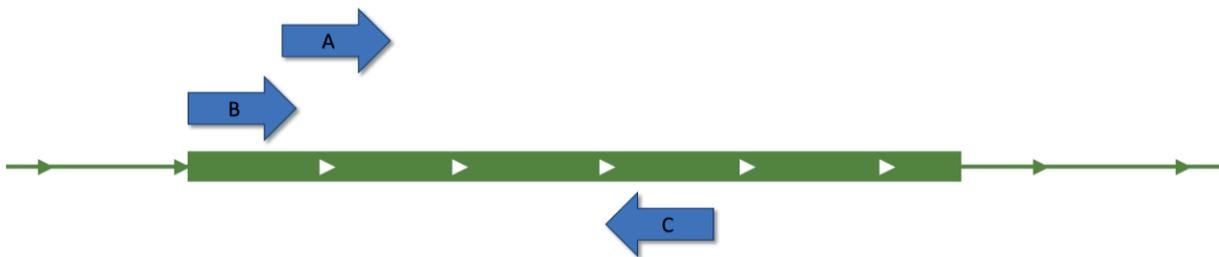
A: Cas9 erkennt die an der Zielsequenz gebundene *single guide* RNA (sgRNA) und schneidet mit ihren beiden katalytischen Zentren beide DNA-Stränge gleichzeitig, es entsteht ein Doppelstrangbruch. **B:** Die modifizierte Cas9n, bei der eines der beiden katalytischen Zentren inaktiviert ist, schneidet nur einen DNA-Strang. Wird für jeden DNA-Strang eine sgRNA eingesetzt, können beide DNA-Stränge an unterschiedlichen Stellen geschnitten werden, also auch ein Doppelstrangbruch erfolgen. Dafür müssen beide sgRNAs an der Zielsequenz binden. Off-Target-Effekte, also das Falschbinden einer sgRNA mit anschließendem Strangbruch der DNA, ist im Falle der Nickase nicht mutagen, da lediglich ein Einzelstrangbruch resultiert.

3.3.2 Design der sgRNAs

Für den gezielten KO von *mARC1* in ZR-75-1 Zellen wurden verschiedene sgRNAs designt, die alle im Exon 2 von *MARC1* und somit im kodierenden Bereich des Gens liegen. Mit Hilfe eines Online Tools (Zhang Lab CRISPR Design Tool) kann auf Off-Target-Effekte geprüft werden. [158] Es wurden drei sgRNAs für einen Single-Cut und zwei sgRNA-Paare für einen Nickase Knockout ausgewählt, für die jeweils die geringsten Off-Target-Effekte vorausgesagt wurden. Die entsprechenden Oligonukleotide wurden kommerziell erworben (Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck). Damit sie in das verdaute Plasmid eingefügt werden können, müssen die Schnittstellen des verwendeten Enzyms berücksichtigt und ergänzt werden. Alle Zielsequenzen (schwarz) und die für die Insertion ergänzten Sequenzen (rot) sind in den folgenden Tabellen dargestellt (s. Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2). Die Position der jeweiligen Zielsequenz im Exon 2 ist in Abbildung 3.5 bzw. Abbildung 3.6 dargestellt.

A (Single-Cut)	
Genomische Zielsequenz	AAACATGGTTACTGCTCGCC
Designte Zielsequenz 5'-3'	CACCGAAACATGGTTACTGCTCGCC
Designte Zielsequenz 3'-5'	CTTTGTACCAATGACGAGCGGCAAA
B (Single-Cut)	
Genomische Zielsequenz	GTTTTGGCTTGTGATCAACC
Designte Zielsequenz 5'-3'	CACCGTTTTGGCTTGTGATCAACC
Designte Zielsequenz 3'-5'	CCAAAACCGAACACTAGTTGGCAAA
C (Single-Cut)	
Genomische Zielsequenz	AGTCAGGGTGTCACCATCGC
Designte Zielsequenz 5'-3'	CACCGAGTCAGGGTGTCACCATCGC
Designte Zielsequenz 3'-5'	CTCAGTCCCACAGTGGTAGCGCAAA

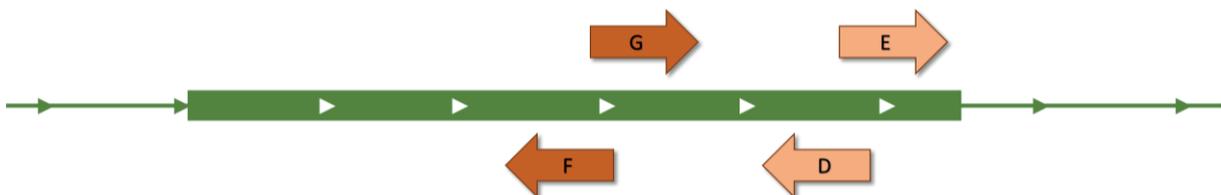
Tabelle 3.1: Sequenzen der sgRNAs für den Single-Cut

Abbildung 3.5: sgRNAs vom Single-Cut-Typ mit Zielsequenz in Exon 2 von *MARC1*

Dargestellt ist Exon 2 vom Gen *MARC1*. Drei *single guide* RNAs (sgRNA) A, B und C vom Single-Cut-Typ sind designiert worden, die an verschiedenen Stellen in Exon 2 binden. Die Pfeile symbolisieren die jeweilige Bindestelle, an der auch Cas9 bindet und zu einem Doppelstrangbruch der DNA führt.

D (Nickase, sgRNA1 von Paar 1)	
Genomische Zielsequenz	GCGTTTTGATAGGCAGTAGT
Designte Zielsequenz 5'-3'	CACCGGCGTTTTGATAGGCAGTAGT
Designte Zielsequenz 3'-5'	CCGCAAACTATCCGTCATCACAAA
E (Nickase, sgRNA2 von Paar 1)	
Genomische Zielsequenz	CAAATGCAGTGCACAAGTGC
Designte Zielsequenz 5'-3'	CACCGCAAATGCAGTGCACAAGTGC
Designte Zielsequenz 3'-5'	CGTTTACGTCACGTGTTACGCAA
F (Nickase, sgRNA1 von Paar 2)	
Genomische Zielsequenz	GGGTGTCACCATCGCAGGTC
Designte Zielsequenz 5'-3'	CACCGGGGTGTCACCATCGCAGGTC
Designte Zielsequenz 3'-5'	CCCCACAGTGGTAGCGTCCAGCAA
G (Nickase, sgRNA2 von Paar 2)	
Genomische Zielsequenz	TCTCAGTGCAGCCTACACAA
Designte Zielsequenz 5'-3'	CACCGTCTCAGTGCAGCCTACACAA
Designte Zielsequenz 3'-5'	CAGAGTCACGTCGGATGTGTTCAA

Tabelle 3.2: Sequenzen der sgRNAs für den Nickase

Abbildung 3.6: sgRNA-Paare vom Nickase-Typ mit Zielsequenzen in Exon 2 von *MARC1*

Dargestellt ist Exon 2 vom Gen *MARC1*. Zwei *single guide RNA* (sgRNA)-Paare, D und E sowie F und G, sind designt worden, die an verschiedenen Stellen in Exon 2 binden. Die Pfeile symbolisieren die jeweiligen Bindestellen, an denen jeweils Cas9n bindet und zu einem Einzelstrangbruch führt. Binden beide sgRNAs eines Paares an den richtigen Stellen, kommt es zum Doppelstrangbruch.

3.3.3 Klonierung

Es wurden verschiedene Klonierungsprotokolle verwendet. Für den Single-Cut wurde pLentiCRISPRv2 als Plasmid verwendet, für den Nickase Cas9n (jeweils 1 mg/ml). Es wurden willkürlich zwei sgRNAs (A und B) für den Single-Cut und ein sgRNA-Paar (D+E) für den Nickase ausgewählt.

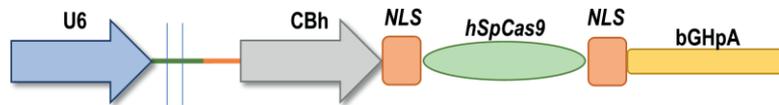


Abbildung 3.7: Plasmid für die Insertion einer beliebigen sgRNA (modifiziert nach Ran *et al.* [157])

Die senkrechten Striche zeigen an, an welcher Stelle des Plasmids der Verdau und die anschließende Insertion der gewünschten sgRNA erfolgt. (U6: Promoter für RNA-Polymerase 3; CBh: Hybrid des Hühner- β -Actin-Promoters (*chicken beta-actin promoter hybrid*); NLS: Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*); hSpCas9: Hitzeschock-Protein-Caspase 9 (*heat shock protein caspase 9*); bGHpA: Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungssignal(*bovine growth hormone polyadenylation signal*))

- 1) Es wurde nach einem modifizierten Protokoll des ZhangLab gearbeitet. [157] Zunächst wurde das Plasmid verdaut und dephosphoryliert. Dafür wurde nach folgendem Schema pipettiert und anschließend für 60 Min. bei 37 °C inkubiert:

5 μ l	Plasmid
3 μ l	Enzym: Esp3I für Single-Cut; BbsI für Nickase
2 μ l	Fast AP
3 μ l	10x Fast Digest Puffer
17 μ l	Aqua bidest.
30 μ l	Gesamtvolumen

Anschließend wurde ein Gel Extraktions Kit (GeneJET Gel Extraction Kit, ThermoFisher Scientific) zur Reinigung des Plasmids verwendet, wobei der Gesamtansatz gereinigt wurde. Auf eine vorherige Trennung der verdauten Plasmide mittels Agarosegel und anschließendem Ausschneiden der gewünschten Banden wurde verzichtet. Nun wurden die Oligonukleotide phosphoryliert und annealt. Dazu wurde wie folgt pipettiert:

1 μ l	Oligonukleotid 1
1 μ l	Oligonukleotid 2
1 μ l	10x T4 Ligation Puffer
6,5 μ l	Aqua bidest.
0,5 μ l	T4 PNK
10 μ l	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde im Thermocycler für 30 Min. bei 37 °C inkubiert, danach für zehn Min. bei 95 °C und schließlich mit 0,1 °C pro Sek. auf 25 °C gekühlt. Für die Ligation wurden die Oligonukleotide 1:50 verdünnt. Als Kontrolle wurde die Oligonukleotidverdünnung mit Aqua bidest. ausgetauscht. Es wurde wie folgt pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert:

1 μ l	Oligonukleotidverdünnung bzw. Aqua bidest.
1 μ l	Plasmid
1 μ l	10x Ligase Puffer
6 μ l	Aqua bidest.
1 μ l	Ligase
10 μ l	Gesamtvolumen

2) Zunächst wurde das Plasmid verdaut. Dafür wurde nach folgendem Schema pipettiert und anschließend für 60 Min. bei 37 °C inkubiert:

2 μ l	Fast Digest Puffer
1 μ l	Plasmid (verdünnt auf 100 ng/ml)
1 μ l	Enzym: Esp3I für Single-Cut; BbsI für Nickase
16 μ l	Aqua bidest.
20 μ l	Gesamtvolumen

Nun wurden die Oligonukleotide phosphoryliert und annealt. Dazu wurde wie folgt pipettiert:

1 μ l	Oligonukleotid 1
1 μ l	Oligonukleotid 2
1 μ l	10x T4 Ligation Puffer
6,5 μ l	Aqua bidest.
0,5 μ l	T4 PNK
10 μ l	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde im Thermocycler für 30 Min. bei 37 °C inkubiert, danach für zehn Min. bei 95 °C und schließlich mit 0,1 °C pro Sek. auf 25 °C gekühlt. Anschließend erfolgte sogleich die Ligation. Dafür wurde der gesamte Ansatz aus dem Verdau eingesetzt:

20 μ l	verdautes Plasmid (Gesamtansatz des Verdaus)
1 μ l	annealte Oligonukleotide
2,5 μ l	T4 Ligase Puffer
1,5 μ l	T4 Ligase
25 μ l	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.4 Transformation

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli* DH5 alpha verwendet. Es wurde wie folgt pipettiert:

10 μ l	Ligationsansatz
50 μ l	<i>E. coli</i> Suspension
6 μ l	5x KCM Puffer

(Der 5x KCM Puffer setzt sich aus 500 mM KCl, 150 mM CaCl₂ und 250 mM MgCl₂ zusammen.) Der Ansatz wurde für 30 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 90 Sek. auf 42 °C erwärmt. Danach erfolgte wieder eine Inkubation auf Eis für zwei bis drei Min. Es wurden jeweils 1 ml LB-Medium zugegeben und eine Std. bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 3000 rpm für fünf Min. abzentrifugiert, das Pellet resuspendiert und ausplattiert. Das Medium enthielt Ampicillin

(100 µg/ml) zur Selektion. Nach 24 Stunden bei 37 °C konnte auf Kolonien geprüft werden und einzelne Klone isoliert werden. Diese wurden für weitere 24 Std. in LB-Flüssigmedium bei 37 °C kultiviert.

3.3.5 Sequenzierung

Die Bakterien der ausgewählten, isolierten Klone werden mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (ThermoFisher Scientific) bearbeitet. Zur Sequenzierung der so isolierten DNA wurde der U6-Fwd Primer verwendet. Die Sequenzierung wurde als Dienstleistung in Anspruch genommen (GATC Biotech AG).

Sequenz U6-Primer 5'-3'

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC

3.3.6 Transfektion humaner ZR-75-1 Zellen

Die Transfektion wurde mit GeneJuice® (Merck KgaA) durchgeführt und dabei die modifizierte Herstelleranweisung angewendet. Dazu wurden je zwei Plasmide für den Single-Cut (A und B) und zwei Plasmide für den Nickase (D und E) ausgewählt. Zunächst wurde eine 6-Well-Platte vorbereitet, indem ca. $4 \cdot 10^5$ Zellen pro Well ausgesät wurden. Gleichzeitig wurden separat Wildtypzellen ausgesät, um diese über den gesamten Prozess der Transfektion und Selektion in Kultur zu halten. Nach 24 Std. war eine Konfluenz von ~30 % erreicht, nun erfolgte die Transfektion. Für jedes Knockout-Konstrukt, also beide Single-Cut Plasmide A und B sowie für den Nickase, für den das Plasmidpaar D und E verwendet wurde, standen jeweils zwei Wells zur Verfügung. Es wurde serumfreies Nährmedium RPMI 1640 mit GeneJuice® gemischt und für fünf Min. bei RT inkubiert. Danach wurde die DNA hinzugefügt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Es wurde für weitere fünf bis 15 Min. bei RT inkubiert. Die GeneJuice®/DNA-Mischung wurde tropfenweise in die Wells gegeben. Dabei war darauf zu achten, die Tropfen möglichst über die gesamte Oberfläche zu verteilen und die Platte weder zu schütteln noch zu kreisen, damit sich die Mischung nicht in der Mitte der Platte anreichert. Es wurde vorsichtig umgeschwenkt. Abbildung 3.8 zeigt den schematischen Ablauf der Transfektion.

	Single-Cut A	Single-Cut B	Nickase D+E
serumfreies Medium	200 µl	200 µl	200 µl
DNA	3,9 µg	5,3 µg	je 2,1 µg D bzw. E
GeneJuice®	9 µl	9 µl	9 µl
gesamt	212 µl	212 µl	212 µl

An Tag vier nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel, die Transfektion wurde wiederholt. Es wurden die gleichen DNA-Mengen eingesetzt. An Tag sechs wurde abermals das Medium gewechselt und die Transfektion wiederholt. Die DNA-Mengen wurden variiert:

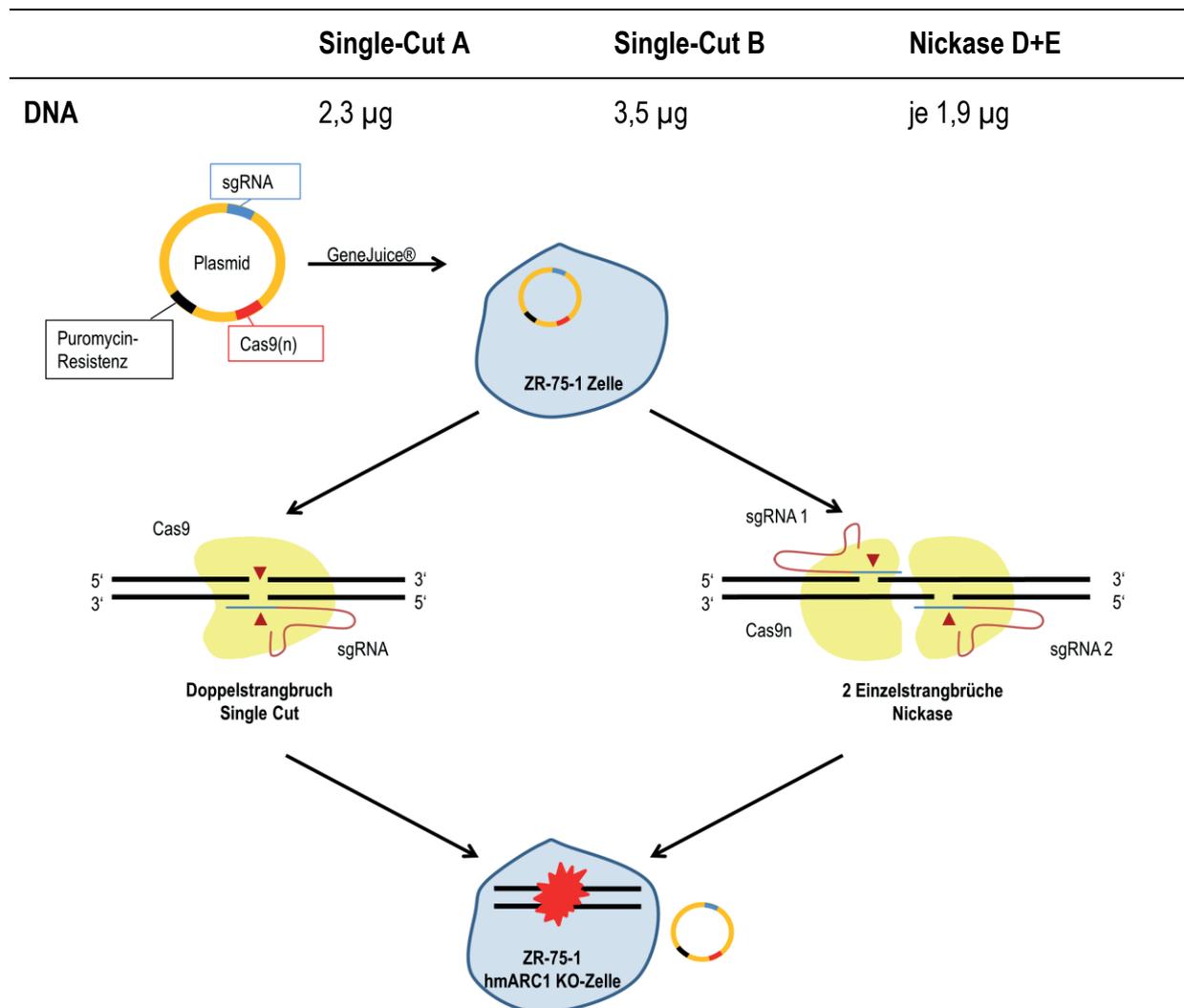


Abbildung 3.8: Transfektion und Genom-Editierung durch Single-Cut und Nickase-Knockout

Das Plasmid mit der entsprechenden *single guide* RNA (sgRNA), Cas9 bzw. Cas9n und der Puromycinresistenz wird mittels GeneJuice® in die Zellen eingeschleust. Nun läuft entweder der Single-Cut oder die Nickase ab, sodass es zum Bruch der DNA-Stränge kommt. Durch nichthomologe Rekombination (NHEJ) soll der hmARC1-Knockout entstehen. Das Plasmid wird von der Zelle wieder entfernt.

3.3.7 Selektion transfizierter Zellen

An Tag sieben nach der Aussaat wurden die Zellen trypsinisiert und vereinzelt. Anschließend wurden zwei verschiedene Selektionsansätze verfolgt, die in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt sind.

1) Selektion über Resistenz: Es wurde die in den Plasmiden enthaltene Puromycin-Resistenz-Kassette genutzt. Die Zellen eines Wells für Konstrukt A, Konstrukt B und Konstrukt D+E wurden jeweils in eine 25 cm² Zellflasche ausgesät. Das Nährmedium enthielt 2,5 µg/ml Puromycin zur Selektion. An Tag drei nach Aussaat wurde das Medium gewechselt und Puromycin-freies Nährmedium verwendet. Im Folgenden wurde alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt und das Zellwachstum beobachtet. Nur Zellen mit dem Plasmid besitzen eine Puromycin-Resistenz und überleben.

2) Selektion durch Vereinzeln: Die Zellen eines Wells für Konstrukt A, Konstrukt B und Konstrukt D+E wurden jeweils auf fünf Zellen/ml verdünnt. Pro Konstrukt wurden zwei 96-Well-Platten vorbereitet und je 100 µl der Zellsuspension ausgesät, so dass rechnerisch 0,5 Zellen pro Well ausgebracht wurden. Nach drei Tagen wurden je 100 µl frisches Nährmedium ergänzt. Es wurde mind. alle zwei Tage mikroskopiert und auf Zellwachstum geprüft, Mediumwechsel erfolgte nach Bedarf. Es sollten so aus einzelnen Zellen reine Zellkolonien entstehen, die auf einen KO überprüft werden können.

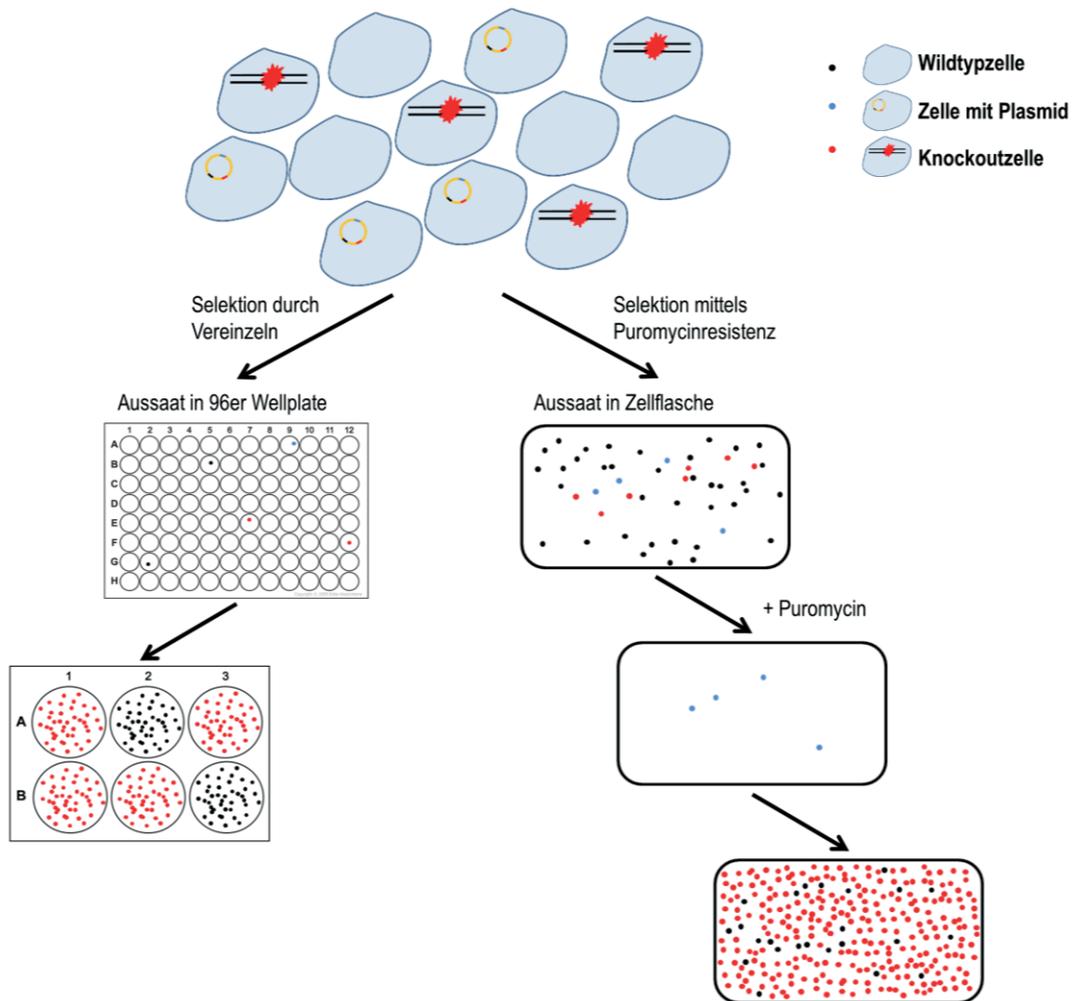


Abbildung 3.9: Selektion der transfizierten Zelle

Nach der Transfektion liegt ein Gemisch aus Wildtypzellen, Knockoutzellen und Zellen, die das Plasmid tragen, vor. Um die Zellen zu selektieren, werden sie zum einen vereinzelt und einzelne Zellen ausgesät. Aus diesen sollten Kolonien wachsen, die separat voneinander in größeren Wells kultiviert werden können, bis ausreichend Zellen zur weiteren Charakterisierung vorliegen. Zum anderen werden die Zellen in Zellflaschen ausgebracht und mit Puromycin behandelt. Nur Zellen, die zu diesem Zeitpunkt das Plasmid tragen, überleben und können anschließend weiter kultiviert werden. Diese Zellen können Wildtypzellen bleiben oder sich zu Knockoutzellen entwickeln.

4 ERGEBNISSE

4.1 mARC-abhängige Stickstoffmonoxid-Freisetzung

Die Freisetzung von NO wurde wie in 3.2.2.2 und 3.2.2.1 beschrieben zunächst mit Nitrit als Substrat untersucht. Das Messgerät wurde bereits im Vorfeld überprüft und kalibriert (s. Anhang Abbildung I). Durch das hochreine Trägergas (Argon 4.6) waren anaerobe Bedingungen gegeben.

Es wurden verschiedene Puffersysteme bei unterschiedlichen pH-Werten getestet. Der jeweilige Puffer wurde gemeinsam mit 3 mM Nitrit als Substrat vorgelegt und eine stabile Basislinie erhalten. Im Abstand von jeweils etwa 3 Min. wurden die weiteren Reagenzien NADH, die Proteine Cyb5 und Cyb5R und schließlich hmARC1 bzw. hmARC2 sukzessive zugesetzt. Letzteres sollte die Reaktion starten. Die gestaffelte Zugabe der einzelnen Komponenten diene dabei der Kontrolle, denn bei einer mARC-abhängigen Reaktion kann nur das vollständig rekonstituierte Enzymsystem die Bildung des Metaboliten katalysieren. Bei Verwendung von 20 mM MES-Puffer pH 6,0 konnte eine NO-Freisetzung aus Nitrit durch Injektion des Cosubstrats NADH gemessen werden, die in ihrem Ausmaß etwa der durch Sparacino-Watkins *et al.* (2014) publizierten, mARC1-vermittelten NO-Freisetzung entspricht (s. Abbildung 4.1 **A**). [52] Bei allen anderen getesteten Puffern war das nicht der Fall. Dazu gehörten 50 mM BIS-TRIS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 bzw. 7,0 sowie 50 mM TRIS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4. Mit diesen Puffern wurde daher untersucht, ob das rekombinante Enzymsystem mit hmARC1 bzw. hmARC2 Nitrit zu NO reduzieren kann. Es konnte jedoch unter keinen Bedingungen eine mARC-abhängige NO-Freisetzung detektiert werden. Durch die Injektionen wurden lediglich leichte Schwankungen der Basislinie hervorgerufen, die unterhalb des Quantifizierungslimits von 4,0 mV in Relation zur Basislinie liegen (s. Abbildung 4.1 **B-E**, für BIS-TRIS-Puffer exemplarisch gezeigt an hmARC1). Des Weiteren ist zu vermerken, dass die Basislinie in Abhängigkeit des verwendeten Puffersystems bei unterschiedlichen mV-Leveln liegt. Der MES-Puffer weist den niedrigsten pH-Wert und gleichzeitig das höchste Basislinienniveau auf.

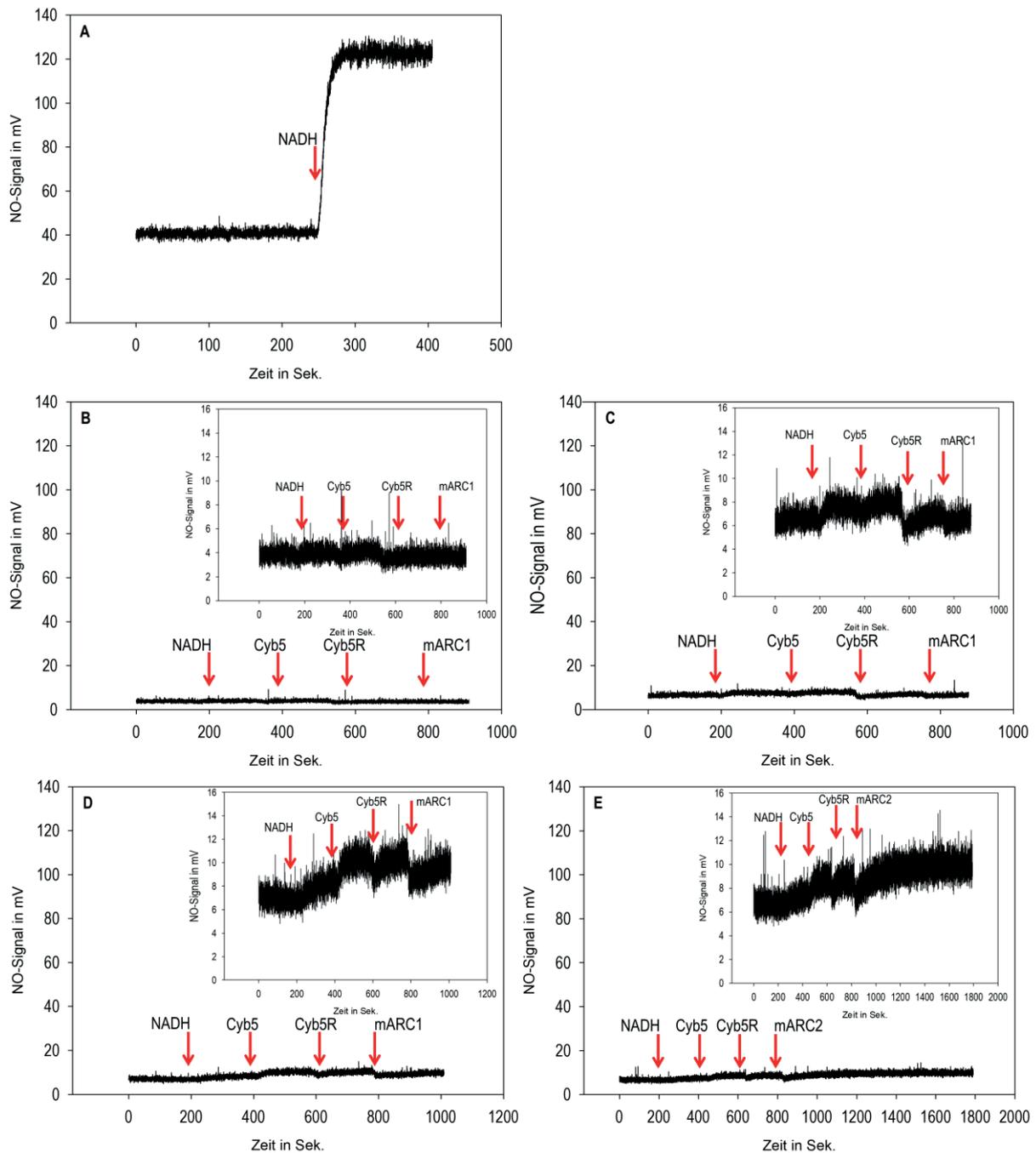


Abbildung 4.1: Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Nitrit unter anaeroben Bedingungen

Der jeweilige Puffer (A: 20 mM MES-Puffer pH 6,0; B: 50 mM BIS-TRIS-Puffer pH 7,4; C: 50 mM BIS-TRIS-Puffer pH 7,0; D und E: 50 mM TRIS-Puffer pH 7,4) und Nitrit wurden vorgelegt und die weiteren Komponenten etwa alle drei Minuten sukzessive injiziert (dargestellt durch die roten Pfeile). (Bestimmungsgrenze: 4,0 mV)

Als weiteres Substrat wurde GTN getestet. Es wurde beobachtet, dass durch die Injektionen der verschiedenen Komponenten ein Anstieg des NO-Signals vermessen werden konnte (s. Abbildung 4.2 **A**). Diese fielen rasch wieder ab und erschwerten die Beurteilung, ob eine mARC-abhängige Nitrit-Reduktion vorliegt. Daher wurden abweichend zu 3.2.2.2 und der Nitrit-Untersuchung alle Komponenten bis auf das jeweilige mARC-Protein als Vormischung vorgelegt. So konnte eine stabile, jedoch bei einem höheren mV-Level liegende Basislinie erhalten und ausschließlich der Einfluss von hmARC1 bzw. hmARC2 beobachtet werden. Unter allen getesteten Bedingungen wurden durch Injektion der mARC-Proteine kurzfristige Schwankungen der Basislinie verursacht, die jedoch nicht als mARC-vermittelte NO-Freisetzung zu interpretieren sind (s. Abbildung 4.2)

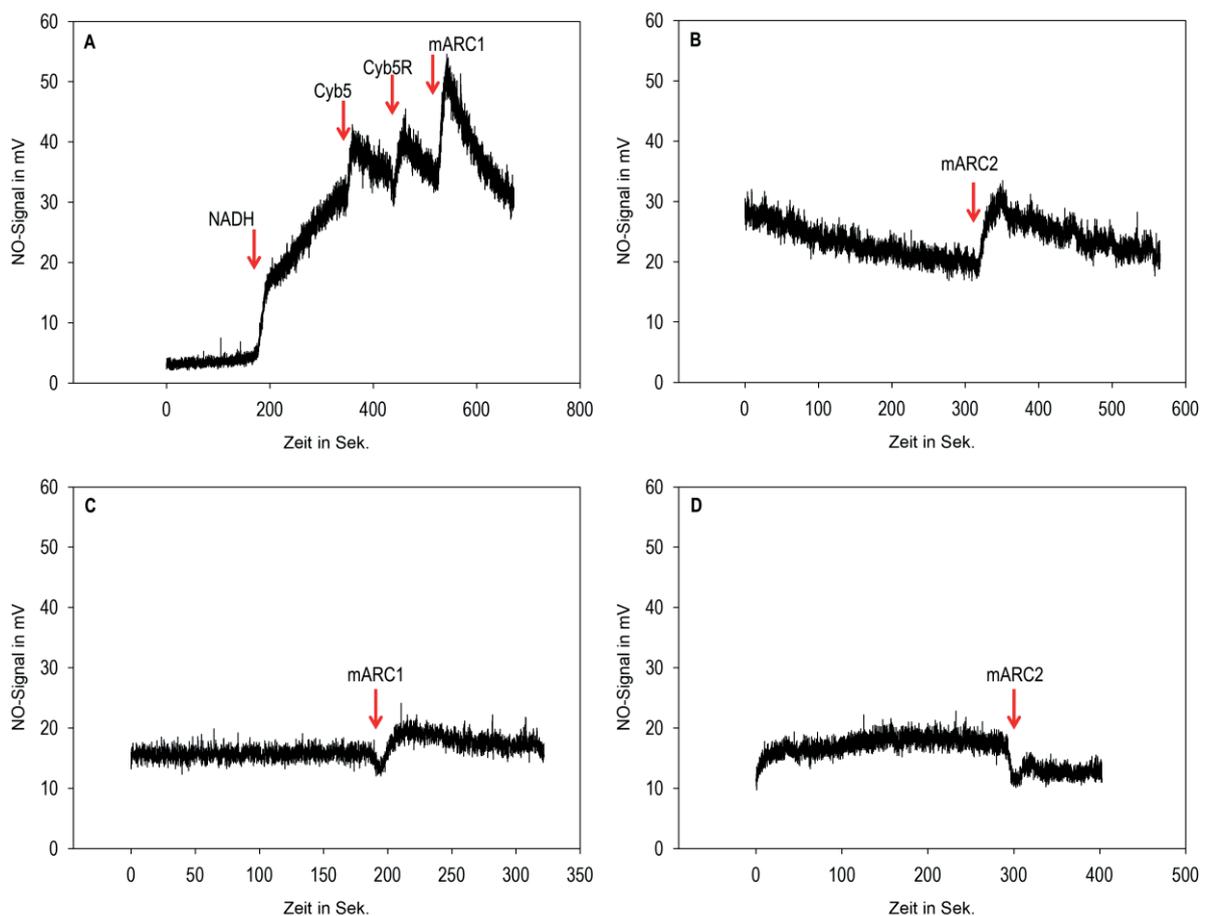


Abbildung 4.2: Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Glyceroltrinitrat unter anaeroben Bedingungen

A: Zunächst wurden wie in 3.2.2.2 beschrieben Puffer (hier: 50 mM TRIS-Puffer pH 7,4) und Nitrit vorgelegt und anschließend die weiteren Komponenten sukzessive injiziert (dargestellt durch die roten Pfeile). Um eine stabile Basislinie zu erzeugen und ausschließlich den Einfluss von hmARC1 bzw. hmARC2 zu beobachten, wurden anschließend alle Komponenten bis auf mARC vorgelegt und nur letzteres injiziert (dargestellt durch die roten Pfeile; **B:** 50 mM TRIS-Puffer pH 7,4; **C und D:** 20 mM MES-Puffer pH 6,0). (Bestimmungsgrenze: 4,0 mV)

Ergänzend wurde überprüft, ob die mARC-vermittelte Reduktion von GTN zu NO unter Beteiligung von Sauerstoff abläuft. Dazu wurde wie in 3.2.2.3 beschrieben vorgegangen und dem Trägergas reiner Sauerstoff beigemischt. Ansonsten wurden die Verwendung der Vormischung und die exklusive Injektion von hmARC1 bzw. hmARC2 beibehalten. Die Basislinie war den anaeroben Versuchsbedingungen gegenüber deutlich geringer. Durch die Injektionen der mARC-Proteine wurden keinerlei Schwankung der Basislinie hervorgerufen (s. Abbildung 4.3). Unter Anwesenheit von Sauerstoff kann also durch keine der verwendeten Komponenten NO aus Nitrit freigesetzt werden.

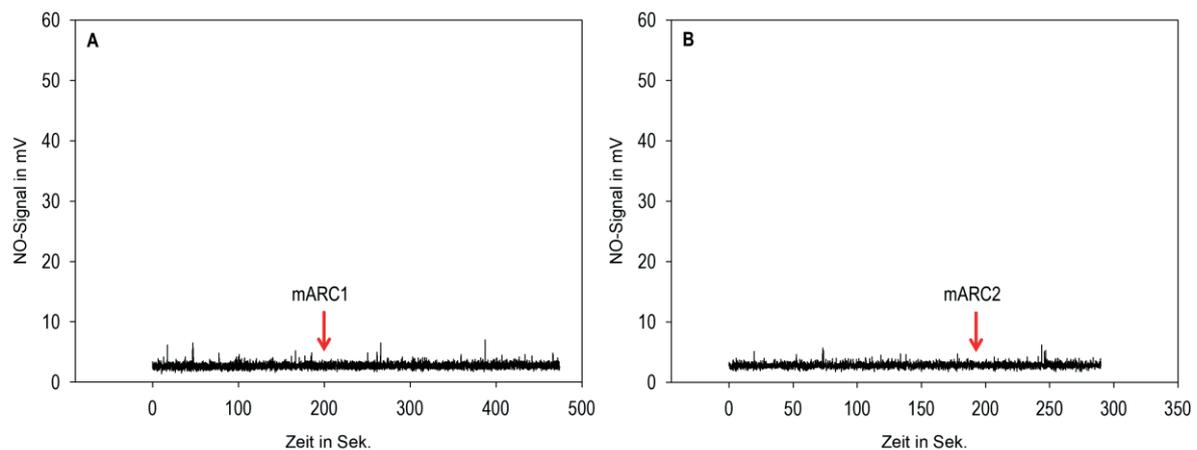


Abbildung 4.3: Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Glyceroltrinitrat unter aeroben Bedingungen

A und B: 50 mM TRIS-Puffer pH 7,4. (Bestimmungsgrenze: 4,0 mV)

4.2 Entgiftung von Trimethylamin-*N*-oxid

4.2.1 Untersuchung enzymatischer *in vitro* Testsysteme

Die enzymatische Reduktion des CVD-Risikofaktors TMAO wurde unter Verwendung verschiedener *in vitro* Testsysteme untersucht und konnte sowohl für zelluläre wie auch subzelluläre Fraktionen und für das rekombinante Molybdoenzym gezeigt werden. Zur Überprüfung des jeweiligen Systems wurden Kontrollversuche mit dem Modellsubstrat BAO mitgeführt. Somit wurde zum einen die Aktivität der verwendeten Proteinquellen sichergestellt und zum anderen ein Vergleich der *N*-Reduktion zu einem bekannten mARC-Substrat gewährleistet.

Als zelluläres Testsystem wurden humane ZR-75-1 Zellen gewählt. Diese Mammakarzinomzellen exprimieren beide mARC-Proteine in etwa gleichem Ausmaß und gleicher Aktivität, weshalb sie sich sehr gut zur Untersuchung potentieller mARC-Substrate eignen. Die Inkubationsversuche wurden wie in 3.2.3.1 beschrieben durchgeführt und zeigten eine TMAO-Reduktion. Diese ist im Vergleich zum Modellsubstrat BAO geringer ausgeprägt (s. Tabelle 4.2). Zur näheren Betrachtung der Kinetik erfolgte abweichend zu 3.2.1.1 bzw. 3.2.3.1 die Inkubation eines Konzentrationsbereichs von 0,5 – 10 mM für BAO und 0,5 – 100 mM für TMAO. Während für BAO eine Michaelis-Menten-Kinetik erhalten wurde, gehorcht die TMAO-Reduktion im komplexen, zellulären System nicht dieser Kinetik (s. Abbildung 4.4).

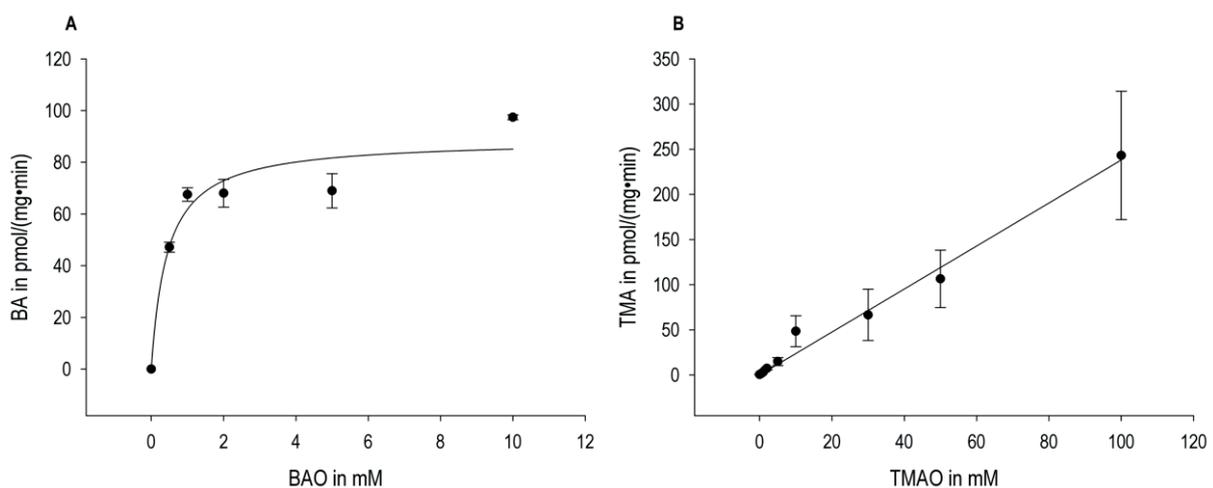


Abbildung 4.4: Substratabhängigkeit von ZR-75-1 Zellen

Gezeigt ist **A** die Substratabhängigkeit des Modellsubstrats Benzamidoxim (BAO), dass zu Benzamidin (BA) reduziert wird. Das System ist ab ca. 2 mM BAO gesättigt und zeigt eine Michaelis-Menten-Kinetik. **B** zeigt die Substratabhängigkeit von Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), dass zu Trimethylamin (TMA) reduziert wird. Es liegt keine Michaelis-Menten-Kinetik vor. (Bestimmungsgrenze TMAO: 0,1 pmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹; Bestimmungsgrenze BAO: 0,1 pmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹)

Als weiteres Testsystem wurden verschiedene Subfraktionen porciner Lebergewebe untersucht. Dazu gehörten der postnukleäre Überstand (PNS), das Cytosol, die mitochondriale sowie mikrosomale Fraktion und die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV). Auf Grund seiner Lokalisation in der äußeren mitochondrialen Membran ist hier eine Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität zu erwarten, wenn das mARC-haltige Enzymsystem die beobachtete *N*-Reduktion katalysiert. Dies konnte für beide Substrate, BAO und TMAO, gezeigt werden. Wie bereits im zellulären Testsystem beobachtet, ist auch hier die TMAO-Reduktion im Vergleich zum Modellsubstrat weniger stark ausgeprägt (s. Tabelle 4.2). Während für BAO keine bzw. eine vernachlässigbar geringe Restaktivität im Cytosol bzw. in der mikrosomalen Fraktion detektiert wurde, ist für TMAO in beiden Fraktionen keine *N*-reduktive Restaktivität vorhanden. Es konnten zwar Werte ermittelt werden, diese liegen jedoch knapp unterhalb der Bestimmungsgrenze.

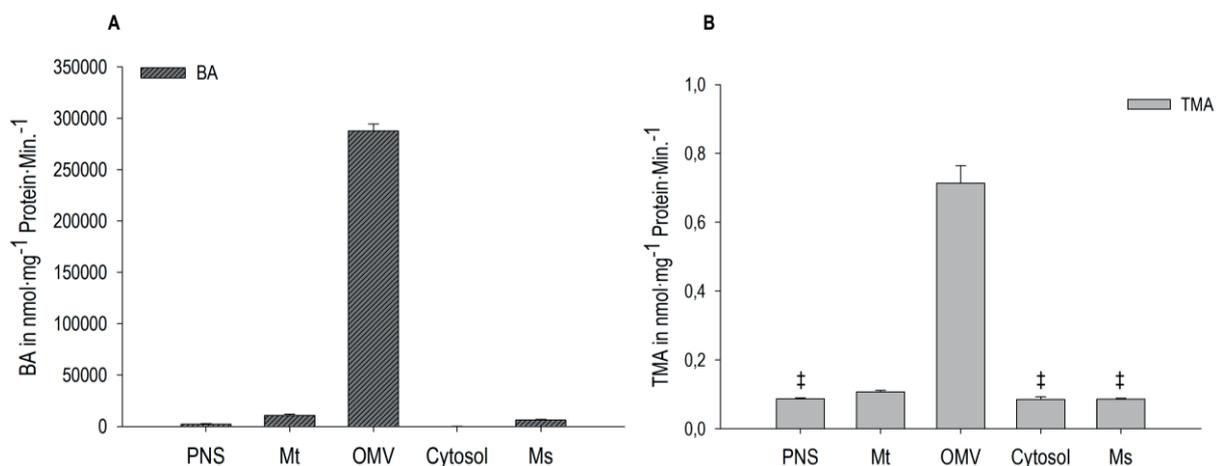


Abbildung 4.5: *N*-Reduktion der Substrate Benzamidoxim und Trimethylamin-*N*-oxid durch porcine Lebersubfraktionen

Die Substrate Benzamidoxim (BAO) und Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) werden durch alle getesteten porcinen Lebersubfraktionen zu den jeweiligen Metaboliten Benzamidin (BA, gezeigt in **A**) und Trimethylamin (TMA, gezeigt in **B**) reduziert, wobei die BAO-Reduktion in deutlich höherem Ausmaß als die TMAO-Reduktion abläuft. Getestet wurden postnukleärer Überstand (PNS), Cytosol, Mitochondrien (Mt), Mikrosomen (Ms) und die äußere mitochondriale Membranfraktion (OMV). Alle Subfraktionen bis auf die OMV entstammen derselben Schweineleber. Eine typische Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in den OMV-Chargen ist nachweisbar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung eines Versuchs im Doppelansatz, jeweils doppelt vermessen. (Bestimmungsgrenze TMAO: 0,1 nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹; Bestimmungsgrenze BAO: 3 nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹; ‡: unterhalb der Bestimmungsgrenze für TMAO)

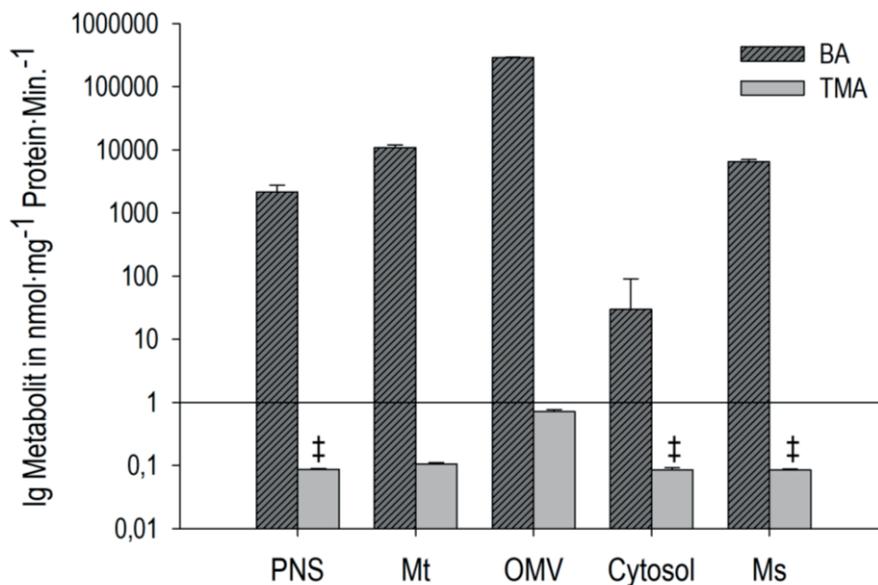


Abbildung 4.6: N-Reduktion der Substrate Benzamidoxim und Trimethylamin-N-oxid durch porcine Lebersubfraktionen

Die logarithmische Darstellung vergleicht die Reduktion der Substrate Benzamidoxim (BAO) und Trimethylamin-N-oxid (TMAO) zu deren jeweiligen Metaboliten Benzamidin (BA) und Trimethylamin (TMA). (‡: unterhalb der Bestimmungsgrenze für TMAO)

Um die Beteiligung des mARC-haltigen, N-reduktiven Enzymsystems an der TMAO-Reduktion eindeutig zu bestätigen, wurde das rekombinante, humane Enzymsystem getestet. Dafür wurden die Inkubationsstudien wie in 3.2.3.3 bzw. 3.2.1.3 beschrieben durchgeführt. Für das hmARC1-haltige Enzymsystem konnte die TMAO-Reduktion nachgewiesen werden. Interessanterweise erfolgte keine TMAO-Reduktion mit dem hmARC2-haltigen Enzymsystem. Es wurden mehrere Kontrollen mitgeführt. Zum einen wurde das unvollständige Enzymsystem eingesetzt, dass durch Fehlen einer oder mehrerer Komponenten die N-reduktive Aktivität nahezu vollständig verliert. Zum anderen wurden die in 3.1.5 beschriebenen Cysteinvarianten und Apoproteine von mARC eingesetzt, die ebenfalls kaum Restaktivität zeigen. Die hmARC1-abhängige TMAO-Reduktion konnte somit bestätigt werden (s. Abbildung 4.7). Im Vergleich zur Reduktion des Modellsubstrats ist die TMAO-Reduktion etwa um den Faktor 40 geringer ausgeprägt (s. Tabelle 4.2).

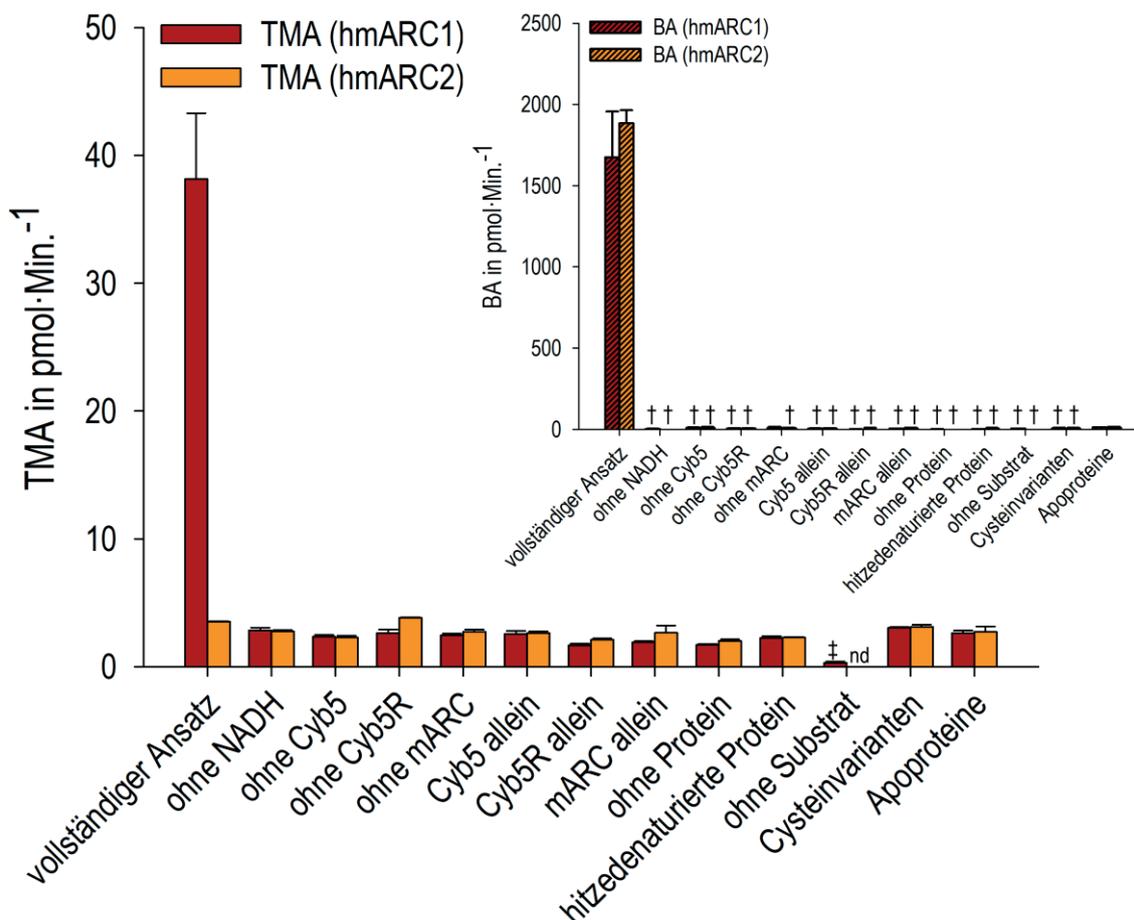


Abbildung 4.7: N-Reduktion von Trimethylamin-N-oxid und Benzamidoxim durch das rekombinante Enzymsystem

Trimethylamin-N-oxid (TMAO) wird ausschließlich vom vollständig rekonstituierten, hmARC1-haltigen Enzymsystem zu seinem Metaboliten Trimethylamin (TMA) reduziert. Das hmARC2-haltige Enzymsystem vermag dies nicht. Das Modellsubstrat Benzamidoxim (BAO) wird durch beide mARC-Proteine zu Benzamidin (BA) reduziert. Alle Negativkontrollen untermauern die mARC-Abhängigkeit der jeweiligen Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier unabhängiger Versuche im Doppelansatz, jeweils doppelt vermessen. (Bestimmungsgrenze TMAO: 1 pmol·Min.⁻¹; ‡: unterhalb der Bestimmungsgrenze für TMAO; Bestimmungsgrenze BAO: 10 pmol·Min.⁻¹; †: unterhalb der Bestimmungsgrenze für BAO; nd: nicht detektierbar (unterhalb der Nachweisgrenze für TMAO von 0,1 pmol·Min.⁻¹)

Die physiologischen TMAO-Konzentrationen im Plasma liegen in einem Bereich von etwa 400 nM bis 700 μM . [160] Daher wurden Substratkonzentrationen, die diesen Bereich in etwa widerspiegeln, untersucht. Es wurden 50 μM , 250 μM und 500 μM TMAO für die Inkubationsstudien eingesetzt. Bei allen Konzentrationen konnte TMAO hmARC1-abhängig zu TMA reduziert werden (Abbildung 4.8).

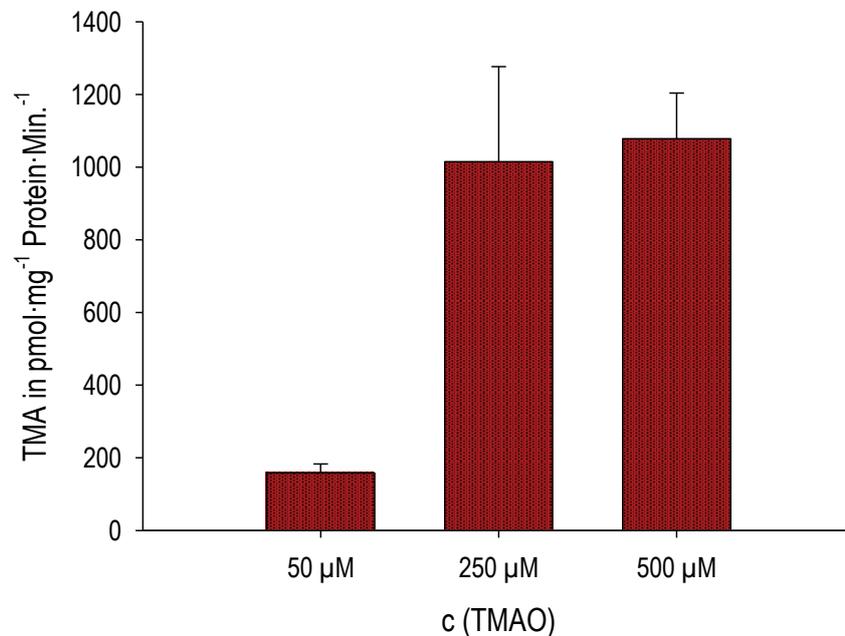


Abbildung 4.8: Reduktion von Trimethylamin-*N*-oxid in physiologisch relevanten Konzentrationen

Die hmARC1-vermittelte Reduktion von Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) zu Trimethylamin (TMA) findet auch bei geringen TMAO-Konzentrationen statt, wie sie in zahlreichen Kohorten nachgewiesen worden ist. [160] (Bestimmungsgrenze TMAO: 0,12 nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹)

Es wurde geprüft, ob die TMAO-Reduktion durch hmARC1 der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Dazu wurde die Substratabhängigkeit in weiteren Inkubationsversuchen untersucht, bei der abweichend zu 3.2.3.3 verschiedene Konzentrationen des Substrats TMAO eingesetzt wurden. Der getestete Konzentrationsbereich erstreckte sich von 0,5 – 100 mM TMAO. Die kinetischen Parameter konnten mittels Sigma Plot 11.0 ermittelt werden.

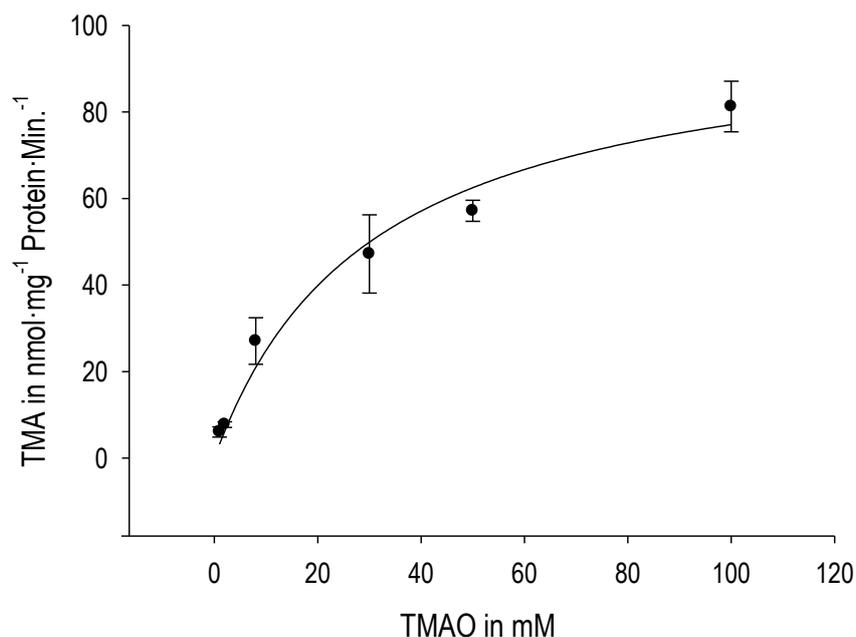


Abbildung 4.9: Substratabhängigkeit zur Überprüfung der Kinetik

Die hmARC1-abhängige Reduktion von Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) zu Trimethylamin (TMA) gehorcht der Michaelis-Menten-Kinetik. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurde ein Konzentrationsbereich von 0,5 – 100 mM TMAO überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier unabhängiger Versuche im Doppelansatz, jeweils doppelt vermessen. (Bestimmungsgrenze TMAO: 0,12 nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹)

kinetische Parameter	K_m in mM	V_{max} in nmol·mg ⁻¹ Protein·Min. ⁻¹
	30,4 \pm 9,8	100,5 \pm 12,2

Tabelle 4.1: kinetische Parameter der hmARC1-abhängigen Trimethylamin-*N*-oxid-Reduktion

Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe von Sigma Plot 11.0 aus den Daten der Substratabhängigkeit ermittelt.

Die spezifischen Aktivitäten der untersuchten Testsysteme sind für das Modellsubstrat BAO sowie für den endogenen CVD-Risikofaktor TMAO in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Testsystem	spezifische Aktivität	
	BAO	TMAO
zelluläres System (ZR-75-1 Zellen)^a	69 ± 7	4,5 ± 0,2
porcine Lebersubfraktionen^b		
OMV	281.625 ± 6.948	0,7 ± 0,1
Cytosol	30 ± 60	nq
Mikrosomen	6510 ± 484	nq
rekombinantes Enzymsystem^b		
hmARC1	174 ± 28	4,4 ± 0,6
hmARC2	346 ± 10	0,4 ± 0,1

Tabelle 4.2: spezifische Aktivitäten der verschiedenen Testsysteme für das Modellsubstrat Benzamidoxim und Trimethylamin-N-oxid

^a: Angaben in pmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹; ^b: Angaben in nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung zweier unabhängiger Versuche im Doppelansatz, jeweils doppelt vermessen. (nq: nicht quantifizierbar)

4.2.2 Untersuchung der Trimethylamin-*N*-oxid-Reduktion mittels Knockoutmausmodell

Nachdem die enzymatische TMAO-Reduktion in verschiedenen Testsystemen nachgewiesen werden konnte, sollte die beobachtete Substratspezifität für mARC1 näher charakterisiert werden. Dazu wurden murine Leberhomogenate von Wildtyp (WT)- sowie von homozygoten mARC2-Knockout (KO)-Mäusen untersucht und wie in 3.2.3.1 beschrieben getestet. Die Vergleichsinkubationen mit dem Modellsubstrat BAO wurden von Anna Meier und Sophia Rixen wie in 3.2.1.3 beschrieben durchgeführt. [128, 129] Alle getesteten Mäuseleberhomogenate reduzierten TMAO zu TMA, jedoch nur in geringem Ausmaß. Während durch den mARC2-Knockout eine deutliche Verminderung der BAO-Reduktion messbar ist, konnte für die TMAO-Reduktion kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Tabelle 4.3). [128, 129]

	spezifische Aktivität in nmol·mg ⁻¹ Protein·Min. ⁻¹	
	BAO ^a	TMAO
Wildtypmäuse	7,2 ± 2,5	0,08 ± 0,02
mARC2-KO-Mäuse	1,5 ± 0,8	0,08 ± 0,02

Tabelle 4.3: Spezifische Aktivitäten der *N*-Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim sowie von Trimethylamin-*N*-oxid durch Wildtyp- und mARC2-Knockoutmäuse

Während die *N*-Reduktion des Modellsubstrats Benzamidoxim (BAO) durch den Knockout (KO) von mARC2 deutlich vermindert ist (^a: Daten aus [129]), bleibt die Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO)-Reduktion unbeeinflusst. Dabei ist die TMAO-Reduktion im Vergleich zur BAO-Reduktion etwa um den Faktor 100 geringer ausgeprägt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen im Dreifachansatz, jeweils doppelt vermessen, von sechs Wildtyp- und sechs mARC2-Knockoutmäuselebern. Mittels Sigma Plot 11.0 wurde mit einem zweiseitigen t-Test ($p = 0,050$) auf Signifikanz getestet. (Bestimmungsgrenze TMAO: 0,06 nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹; Bestimmungsgrenze BAO: 0,1 nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹)

4.3 Knockout von hmARC1 in ZR-75-1 Zellen

Der selektive Knockout von hmARC1 im zellulären Testsystem der ZR-75-1 Zellen umfasste mehrere Schritte, wie in 3.3 beschrieben. Im Folgenden sind die Ergebnisse entsprechend der Arbeitsschritte zusammengefasst.

Die sgRNAs wurden mit Hilfe des Zhang Lab CRISPR Design Tools erstellt und auf Off-Target-Effekte überprüft. [158] Die Oligonukleotide wurden kommerziell erworben (Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck, Darmstadt) und ihre Identität durch Sequenzanalysen überprüft und bestätigt.

Es wurden willkürlich zwei sgRNAs (A und B) für den Single-Cut und ein sgRNA-Paar (D+E) für den Nickase ausgewählt und wie in 3.3.3 beschrieben in die jeweiligen Vektoren kloniert. Es wurden verschiedene Verfahren angewendet und zusätzlich Negativkontrollen mitgeführt, in denen das Oligonukleotid gegen Wasser ausgetauscht wurde, so dass insgesamt 12 Plasmide resultierten. Diese wurden für die Transformation kompetenter *E. coli*s verwendet (s. 3.3.4). Die Wasserkontrollen zeigten wie erwartet kein Bakterienwachstum, während bei den anderen Plasmiden Bakterienkolonien gewachsen waren. Es wurden insgesamt 14 Klone unterschiedlicher Plasmide ausgewählt und vermehrt. Anschließend konnte die jeweilige DNA extrahiert und sequenziert werden (s. 3.3.4 und 3.3.5). Dadurch konnte der korrekte Einbau der sgRNAs in die Vektoren bestätigt werden.

Für die Transfektion der humanen Zellen wurden vier Plasmide ausgewählt, und zwar eines für die sgRNA A (als Konstrukt A bezeichnet) bzw. B (als Konstrukt B bezeichnet), sowie eines für die sgRNA D bzw. E. Für den Single-Cut wurden die Zellen entweder mit Konstrukt A oder mit Konstrukt B transfiziert. Für den Nickase mussten beide Plasmide mit den sgRNAs D und E transfiziert werden, daher werden diese beiden Plasmide gemeinsam als Konstrukt D+E bezeichnet. Die Transfektion erfolgte wie in 3.3.6 beschrieben über mehrere Tage, dabei entstanden drei Zellchargen (A, B, D+E). Anschließend wurden die Zellen selektiert. Die Selektion über Vereinzelung der Zellen war dabei nicht erfolgreich. Nach mehrtägiger Kultur waren alle vereinzelt Zellen abgestorben. Die Zellen wurden zusätzlich durch eine Puromycin-Behandlung selektiert. Da die transfizierten Plasmide eine Puromycin-Resistenzkassette enthielten, konnten nur diejenigen Zellen überleben, die zum Zeitpunkt der Selektion das Plasmid aufgenommen hatten. Dadurch wurde die erfolgreiche Transfektion bestätigt. Nach der Puromycin-Behandlung verblieben nur sehr wenige Zellen. Die Zellen, die mit dem Konstrukt D+E behandelt worden sind, starben nach mehrwöchiger Kultur ab. Die anderen beiden Zellchargen A und B konnten erfolgreich kultiviert werden. Auf Grund der sehr geringen Zellzahl war die Kultivierung langwierig. Zusätzlich konnte bei der Zellcharge B ein verändertes Wachstum sowie eine veränderte Zellmorphologie beobachtet werden. Zum Vergleich wurden vom Zeitpunkt der Transfektion an Wildtypzellen (WT-Zellen) mit kultiviert. Eine mikroskopische Betrachtung der WT-Zellen im Vergleich

zur Zellcharge A und B zeigte, dass die Zellcharge B größere, amorphe Zellen aufweist, deren Zellkern und –membran kaum zu erkennen sind. Die Zellcharge A hingegen gleicht den WT-Zellen, die eine eher kleine, runde Zellform mit gut erkennbarer Zellmembran und –kern besitzen (s. Abbildung 4.10). Das Wachstum der Zellcharge B war gegenüber der Zellcharge A und den WT-Zellen deutlich verlangsamt. Durch Bestimmung der Zellzahl vor und nach dem Splitten konnte geschätzt werden, dass sich die Verdopplungszeit von 80 Std. auf etwa 150-200 Std. erhöht hatte. Auf Grund der äußerst geringen Zellanzahl und des sehr langsamen Wachstums konnte die Wachstumsrate jedoch nicht exakt ermittelt werden. Die geringe Zellanzahl und das verlangsamte Wachstum erschwerten sowohl die weitere Kultivierung wie auch die weitere Charakterisierung der Zellen.

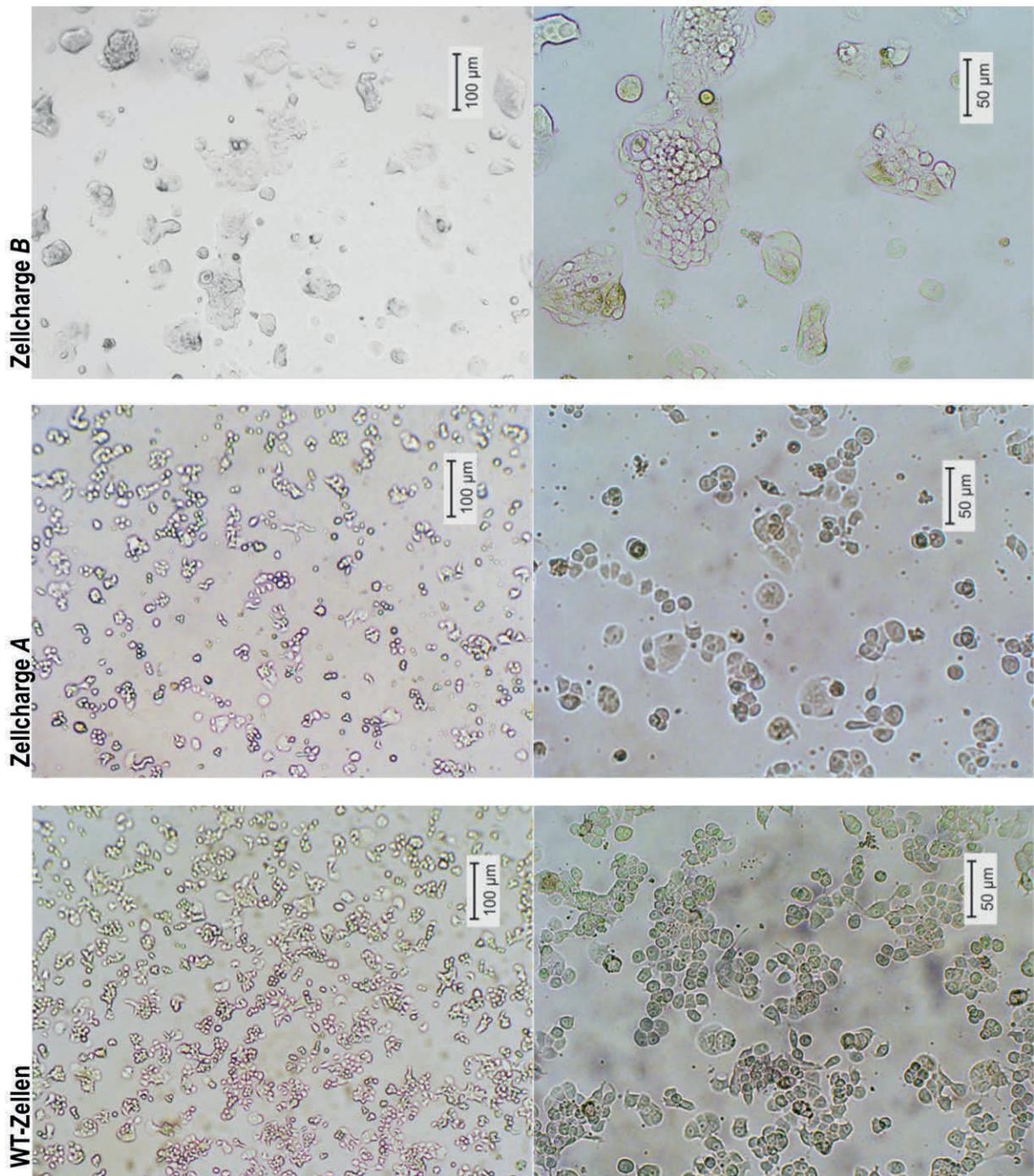


Abbildung 4.10: Mikroskopische Aufnahme der Zellen

Sowohl die Wildtypzellen (WT-Zellen), als auch die Zellcharge A und die Zellcharge B wurden zeitgleich mikroskopiert. Die Abbildung zeigt zwei verschiedene Vergrößerungen (erkennbar am Maßstabsbalken jeweils unten rechts im Bild). Die WT-Zellen (links) zeigen das typische Aussehen von ZR-75-1 Zellen. Zellen der Charge A (Mitte) entsprechen diesem Bild, es ist kein Unterschied zu den Wildtypzellen erkennbar. Zellen der Charge B (rechts) hingegen weisen eine veränderte Morphologie auf. Die Zellen sind größer und heller, weder Zellmembran noch Zellkern sind gut erkennbar. Aufgenommen mit einer Nikon D80, Tubus Okular 10, Ojektive 10 (Fluotar 10) bzw. Objektiv 25 (Fluotar 25) am Umkehrmikroskop.

Um die Zellen auf Proteinebene auf den hmARC1-KO zu untersuchen, wurden Zelllysate der drei Zelltypen WT-Zellen, Zellcharge A und B hergestellt und mittels SDS-PAGE und Westernblot untersucht. Dabei wurde wie in 3.1.2 und 3.1.4 beschrieben vorgegangen und jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Da eine ausreichende Zellmasse zur Erstellung der Lysate und gleichzeitig zur weiteren Kultivierung der Zellen vorhanden sein musste, konnte die erste Westernblot-Analyse erst in Woche 13 nach Transfektion erfolgen. Für hmARC2 war in allen Zellchargen die charakteristische Doppelbande zu erkennen. Der hmARC1-Antikörper führte zur Anfärbung mehrerer Banden, die teilweise unspezifisch sind. Die eigentliche hmARC1-Bande liegt bei einem etwas höheren Molekulargewicht als die Kontrollbande des rekombinanten hmARC1, da letzteres trunkiert und damit leichter ist. Es fällt auf, dass genau an dieser Stelle eine Bande bei dem Lysat der Zellcharge B fehlt. Dieser Befund deutet auf einen erfolgreichen KO hin (s. Abbildung 4.11). Eine Genotypisierung der Zellen durch Extraktion der genomischen DNA und anschließende Sequenzierung konnte zu diesem Zeitpunkt auf Grund der niedrigen Zellzahl nicht durchgeführt werden. Für eine weitere Westernblot-Analyse musste ebenfalls mehr Zellmasse erhalten werden. Somit konnte die Westernblot-Analyse erst in Woche 17 nach Transfektion wiederholt werden. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Zellpopulation der Zellcharge B verändert. Das Zellwachstum hat sich nahezu normalisiert. Die Zellmorphologie näherte sich stark dem der WT-Zellen an. Im Westernblot spiegelte sich diese Beobachtung wieder, nun konnte kein Unterschied zwischen den hmARC1-Banden der drei Zellchargen gefunden werden (s. Abbildung 4.12). Obwohl nun eine ausreichende Zellmasse vorlag, wurde auf Grund dieses Befunds auf eine Sequenzierung verzichtet. Stattdessen wurden die verbleibenden Zellen wie in 3.1.1 beschrieben kryokonserviert.

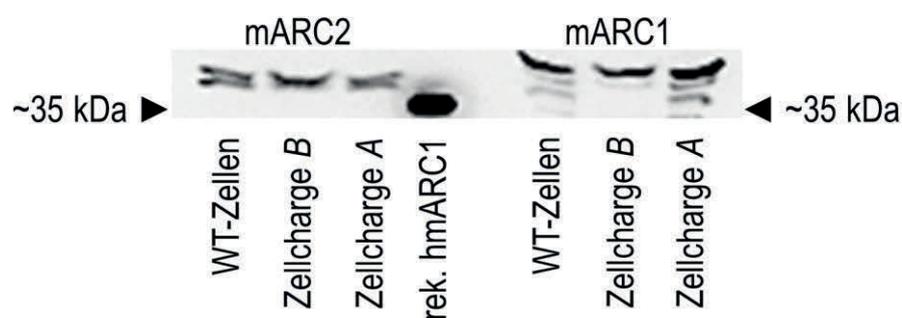


Abbildung 4.11: Westernblot der Zellchargen Wildtypzellen, Zellcharge A und B in Woche 13 nach Transfektion

Aufgetragen wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein der Lysate der Chargen Wildtypzellen (WT-Zellen), Zellcharge A sowie B und 0,005 µg rekombinantes (rek.) hmARC1. Die Pfeilspitzen zeigen das Molekulargewicht des Markers ist in kDa und die jeweilige Position der Bande. Antikörperverdünnungen: Anti-mARC1 = 1:500; Anti-mARC2 = 1:1000.

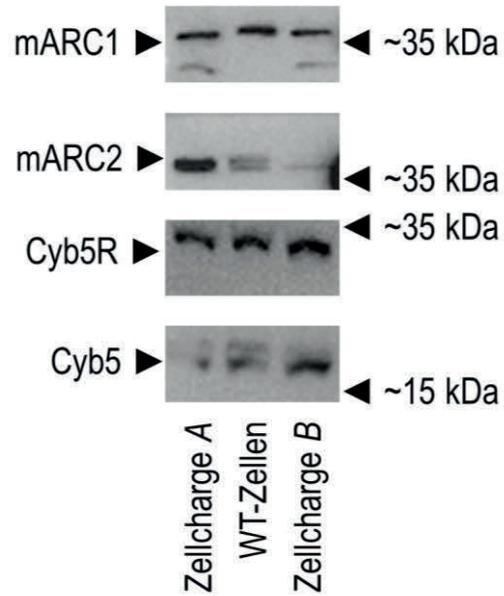


Abbildung 4.12: Westernblot der Zellchargen Wildtypzellen, Zellcharge A und B in Woche 17 nach Transfektion

Aufgetragen wurden jeweils 50 μg Gesamtprotein der Lysate der Chargen Wildtypzellen (WT-Zellen), Zellcharge A sowie B. Die Pfeilspitzen zeigen das Molekulargewicht des Markers ist in kDa und die jeweilige Position der Bande. Antikörperverdünnungen: Anti-mARC1 = 1:500; Anti-mARC2 = 1:1000; Anti-CYB5R = 1:2500; Anti-Cyb5 = 1:5000.

5 DISKUSSION

5.1 mARC-abhängige Stickstoffmonoxid-Freisetzung

5.1.1 Untersuchung von Nitrit und Glyceroltrinitrat als potentielle mARC-Substrate

2014 veröffentlichten Sparacino-Watkins *et al.*, dass Nitrit unter anaeroben Bedingungen von mARC und seinem *N*-reduktiven Enzymsystem reduziert werden kann. Dabei entsteht NO als Metabolit. Die Vermessungen erfolgten dabei alle am NOA. Als Reaktionsgefäß wurden speziell angefertigte Glasgefäße verwendet. [52]

Auf Grundlage dieser Daten wurde die Nitrit-Reduktion mit dem rekombinanten mARC-Enzymsystem und damit dessen Beteiligung am NO-Stoffwechsel untersucht. Die Vermessung erfolgte am gleichen Messgerät, dem NOA. Mittels Chemielumineszenz vermag der NOA selbst geringste NO-Konzentrationen (Detektions- und Bestimmungsgrenze s. 3.2.2.1) zuverlässig zu messen. Das System wurde vorab überprüft und kalibriert (s. Anhang Abbildung I). Die Vermessung von Nitrit in MES-Puffer, pH 6,0, zeigte durch Zusatz von NADH eine deutliche NO-Freisetzung, die in etwa dem Signal entsprach, dass Sparacino-Watkins *et al.* (2014) bei der hmARC1-vermittelten Nitrit-Reduktion erhielten. Die enzymatische Nitrit-Reduktion sollte folglich mit dem NOA erfasst werden können. Dennoch wurde keine mARC-abhängige NO-Freisetzung aus Nitrit registriert. Da der von Sparacino-Watkins und Kollegen (2014) verwendete Puffer, ein 50 mM BIS-TRIS Puffer, bei dem angegebenen pH-Wert von 7,4 keine geeignete Pufferfunktion mehr aufweist, sondern in einem pH-Bereich von 5,8 - 7,2 angewendet werden sollte, wurden weitere Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten getestet. Unter keiner der angewendeten Bedingungen konnte mARC-vermittelt NO aus Nitrit freigesetzt werden. Die verwendeten Proteine wurden vorab alle auf ihre Aktivität hin untersucht, diese konnte sowohl mit dem Modellsubstrat BAO als auch mit TMAO bestätigt werden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass eine verminderte bzw. fehlende Enzymaktivität für diese Beobachtungen verantwortlich ist.

Das beschriebene NO-Signal, das durch die Zugabe von NADH zu MES-gepuffertem Nitrit hervorgerufen wurde, ist auf eine chemische Reduktion zurückzuführen. Mit einem pH-Wert von 6,0 weist der MES-Puffer den geringsten pH-Wert unter den untersuchten Puffern auf, was zu einer erhöhten Basislinie führt. Nitrit ist säurelabil, denn durch Zusatz einer Säure bildet sich aus Nitrit zunächst Salpetrige Säure, die durch weitere Protonierung zu Wasser und einem Nitrosylkation zerfällt. NADH kann nun als Reduktionsmittel fungieren und das Nitrosylkation zu NO reduzieren.

Als weiteres Substrat wurde der NO-Donator GTN untersucht. Da durch die ALDH2 lediglich etwa 5 - 10 % des GTNs reduziert werden, ist die Beteiligung weiterer Enzyme bzw. Enzymsysteme ein interessanter Faktor der NO-Freisetzung aus GTN. [58] Bei den Biotransformationsstudien konnte allein durch NADH bzw. NADH und Cyb5 ein geringes NO-Signal erzeugt werden, was für eine chemische Reduktion von GTN zu NO durch NADH spricht. Um beurteilen zu können, ob eine mARC-abhängige Umsetzung vorliegt, wurde daher der Versuchsaufbau angepasst. Es wurde eine Vormischung aller Reaktionskomponenten bis auf hmARC1 bzw. hmARC2 eingesetzt und eine stabile Basislinie erzeugt. Durch Zusatz von mARC sollte die Reaktion gestartet und im Falle einer mARC-vermittelten NO-Freisetzung ein entsprechend steigendes NO-Signal vermessen werden. Dies blieb jedoch aus, was bedeutet, dass mARC und sein *N*-reduktives Enzymsystem GTN nicht zu NO reduzieren können. Interessanterweise bleibt auch die nachgewiesene Reduktion durch NADH aus, wenn dem Reaktionsansatz Sauerstoff zugeführt wird. Übertragen auf den Organismus scheint dieser Prozess daher nur in hypoxischen Geweben relevant zu sein, wobei selbst hier nur eine sehr geringe NO-Freisetzung messbar war. Die klinische Relevanz ist daher in Frage zu stellen.

5.1.2 Ausblick

Abschließend ist festzuhalten, dass die mARC-abhängige Reduktion von Nitrit zu NO nicht bestätigt werden konnte. Damit ist auch die mARC-abhängige NO-Freisetzung aus dem NO-Donator GTN über Nitrit fraglich. Die direkte Reduktion von GTN zu NO durch mARC konnte unter den getesteten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zielten auf die selektive Bestimmung des potentiellen Metaboliten NO ab. Es ist jedoch zu beachten, dass die Gasanalytik von NO ein wenig robustes Verfahren ist. Der Druck, mit dem das Trägergas durch die Probe und in den NOA fließt, hat beispielsweise einen großen Einfluss auf die Messung und auf die Reproduzierbarkeit. Auch die Zugabe von Reaktionsbestandteilen über das Septum des Reaktionsgefäßes kann zu Druckschwankungen oder sogar zur Injektion von Luft führen, was den Messwert verfälscht. Die Reinigung der Glasfritte innerhalb des Reaktionsgefäßes ist aufwändig, kann bei mangelhaftem Erfolg zu Verunreinigungen der Proben und zur Änderung der Porosität der Fritte und damit zu Druckschwankungen führen. Neuere Untersuchungsmethoden, die sich nicht auf die Analytik von NO fokussieren, könnten die Datenlage erweitern und zur Aufklärung dienen. Aktuell wird im Arbeitskreis unter Betreuung durch Prof. Kunze und Prof. Clement an einem NADH-basierten Enzymassay gearbeitet, der eine schnelle Untersuchung potentieller mARC-Substrate in einem Screening-Ansatz ermöglichen soll. Hier wird nicht die Produktion eines bestimmten Metaboliten, sondern lediglich die Oxidation von NADH verfolgt. Bisher ist es jedoch nicht möglich, anaerobe Bedingungen zu schaffen. Tests mit Nitrit unter aeroben Bedingungen deuten allerdings auf eine Nitrit-Reduktion durch hmARC1 hin, wobei die Reaktionskinetik von dem jeweils

verwendeten Puffer abzuhängen scheint. [161] Als weitere Methode eignet sich die elektrochemische Untersuchung von mARC und Cyb5 mittels modifizierter Goldelektrode. Diese neu entwickelte Analytik ermöglicht die Identifizierung von Substraten und auch von Inhibitoren von mARC verbunden mit einem geringen Zeit- und Materialaufwand bei gleichzeitig hoher Empfindlichkeit. [162]

5.2 Entgiftung von Trimethylamin-*N*-oxid

5.2.1 Trimethylamin-Analytik

Obwohl es bereits publizierte Methoden zur Analytik von TMA gibt, war es notwendig, für die in dieser Arbeit zu untersuchende Fragestellung eine geeignete Methode zu entwickeln. Alle massenspektrometrischen Methoden zur TMA-Analytik haben die Derivatisierung des Analyten gemein. Näheres wurde bereits in 2.1.6 beschrieben. Die weit verbreitete Methylierung von TMA war für die zu untersuchenden Proben ungeeignet, da ein Störsignal die Quantifizierung des Analyten behinderte. Zusätzlich ist die Empfindlichkeit gering. Oftmals wird vor der Derivatisierung noch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt, um in der Probe enthaltenes TMAO zunächst abzutrennen. Für größere Probenvolumina, wie sie bei der Untersuchung von Urinproben gegeben ist, erscheint dies praktikabel, ist jedoch bei sehr kleinen Probenvolumina auf Grund der schlechten Wiederfindung ungeeignet. Daher wurde eine *in situ* Derivatisierung entwickelt. Auch hier gibt es publizierte Methoden, wie beispielsweise die von Lee *et al.* (2010) entwickelte Umsetzung mit dem reaktiven Reagenz Bromessigsäureethylester. [39] Die Untersuchungen von Godfrey und Ganem (1990), dass TMAO mit Halogeniden in DMSO zu Aldehyden reagiert, sowie die eigenen Untersuchungen, die zeigen, dass diese Reaktion auch ohne DMSO im Wässrigen stattfindet (s. 2.4 bis 2.6), deuten darauf hin, dass auch Bromessigsäureethylester mit TMAO reagieren könnte. [142] Es ist nicht bekannt, ob eine mögliche Nebenreaktion von Lee *et al.* (2010) untersucht worden ist. Möglicherweise spielt diese bei den vorherrschenden Konzentrationsverhältnissen für die Urinuntersuchung aber auch keine Rolle. In den Inkubationsstudien dieser Arbeit wurde TMAO als Substrat im Überschuss eingesetzt, die TMAO-Konzentration war dadurch etwa um den Faktor 5000 höher als die resultierende TMA-Konzentration. Selbst eine Nebenreaktion, die nur etwa 0,5 ‰ des vorhandenen TMAOs umsetzt, so wie es bei der Reaktion mit Benzylchlorid der Fall war (s. 2.6), fällt somit ins Gewicht und muss berücksichtigt werden. Reaktive Sulfonylchloride reagieren ebenfalls mit TMAO, das schließt das häufig verwendete Dansylchlorid ein. Hier kommt es bei einer Reaktion mit einem tertiären Amin zur Dealkylierung. Das Derivat entspricht dem, das durch die Reaktion mit dem entsprechenden *N*-Oxid des tertiärenamins entstehen würde. [163] Die Reaktionsprodukte ließen sich also nicht voneinander unterscheiden (s. Abbildung 5.1). Die

Reaktion mit dem *N*-Oxid läuft dabei analog der Polonovski-Reaktion ab, die für die Reaktion von Acylchloriden mit Aminoxiden beschrieben wurde (s. Abbildung 5.2). [164]

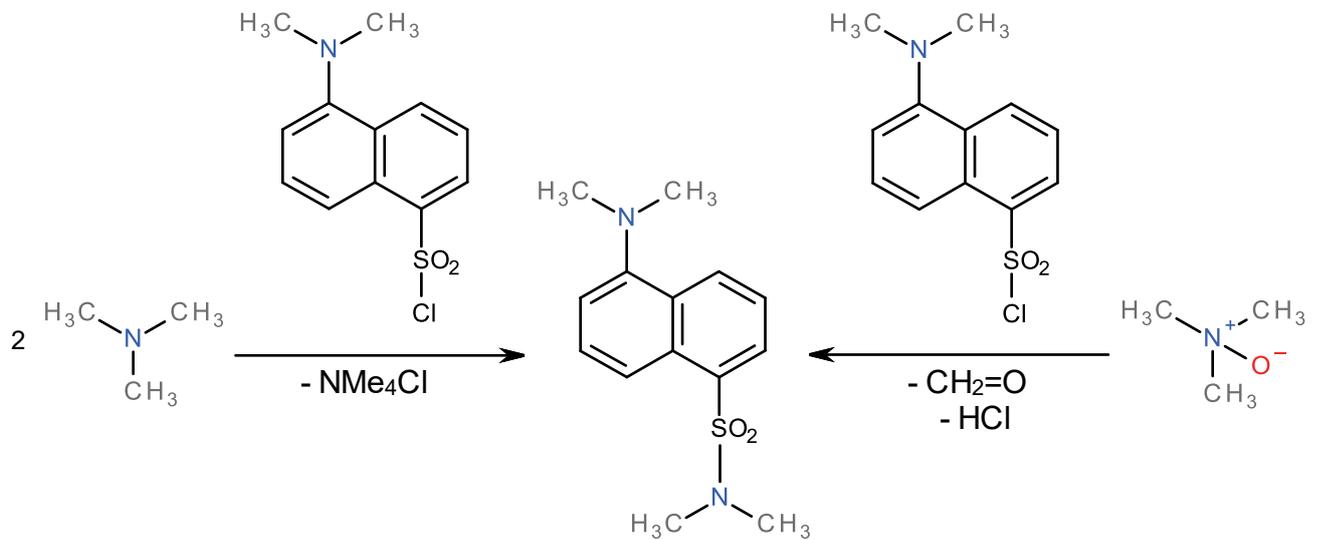


Abbildung 5.1: Reaktionsgleichung von Dansylchlorid mit Trimethylamin und seinem *N*-Oxid

Die Reaktion von Dansylchlorid mit Trimethylamin (TMA) bzw. mit seinem *N*-Oxid (TMAO) führt zum identischen Reaktionsprodukt, weswegen Dansylchlorid kein geeignetes Reagenz für die spezifische TMA-Analytik in Gegenwart von TMAO darstellt.

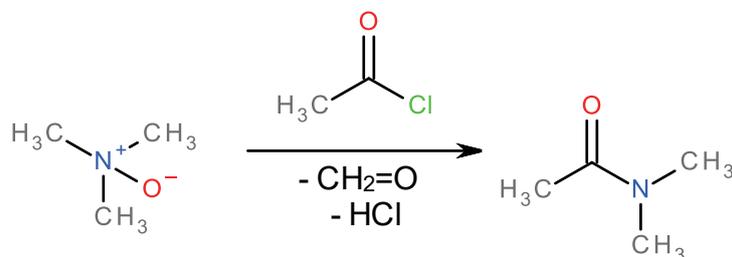


Abbildung 5.2: Polonovski-Reaktion von Acetylchlorid mit Trimethylamin-*N*-oxid

Die Polonovski-Reaktion beschreibt die Reaktion von Acylchloriden mit Aminoxiden. [164] Demnach kann auch Trimethylamin-*N*-oxid mit beispielsweise Acetylchlorid, wie hier dargestellt, reagieren.

Insgesamt ist mit der vorliegenden Analytik und der dazugehörigen Probenvorbereitung ein Tool geschaffen worden, dass die genaue Quantifizierung kleiner TMA-Konzentrationen in Gegenwart hoher TMAO-Konzentrationen sowie verschiedener Puffer und Proteinquellen erlaubt. Der mitgeführte interne Standard dient dabei der genauen Kalibrierung, bei der die Wiederfindung bereits integriert ist. Um die Methode noch weiter zu verbessern, könnte anstelle von Benzylchlorid *p*-Nitrobenzylchlorid oder ähnliche Verbindungen verwendet werden. Durch die zusätzliche Nitrogruppe sollte ein UV-aktives Derivat entstehen, dass nach der flüssigchromatografischen Auftrennung ein charakteristisches UV-

Signal liefert. Dadurch wäre ein zusätzliches Merkmal zur Identifikation gegeben. Es wäre auch denkbar, dass die Fragmentierung andere charakteristische Fragmente liefern würde. Die in der aktuellen Methode vermessenen Fragmente können nicht nur für den gesuchten Metaboliten, sondern für alle Benzylhaltigen Verbindungen auftreten. Durch die vorherige Selektion der gewünschten Ionen bei den Masse-Ladungs-Verhältnissen m/z 150 und 159 ist die Gefahr einer falschen Zuordnung der Fragmente annähernd ausgeschlossen, kann jedoch durch die Vermessung anderer Fragmente noch verbessert werden.

5.2.2 Enzymatische Trimethylamin-*N*-oxid-Reduktion

Die enzymatische Reduktion des CVD-Risikofaktors TMAO konnte durch die Untersuchung verschiedener Testsysteme bestätigt werden.

Als zelluläres System wurden ZR-75-1 Zellen gewählt. Bei diesen Zellen handelt es sich um humane Mammakarzinomzellen, die einer 63-jährigen Patientin entnommen wurden. Sie wurden 1978 durch Engel *et al.* etabliert. [165] Sie sind in der Lage, sowohl das Modellsubstrat BAO als auch TMAO zu reduzieren. Dabei ist die spezifische Aktivität von TMAO im Vergleich zu BAO etwa um den Faktor 14 geringer. Während für BAO eine Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt werden konnte, war dies für TMAO nicht der Fall. Im komplexen Zellsystem spielen neben der Reduktionsreaktion beispielsweise auch Transportmechanismen sowie mögliche Oxidationsreaktionen eine Rolle, die die Kinetikmessung beeinflussen.

Bei der Untersuchung der TMAO-Reduktion durch verschiedene Subfraktionen porciner Leber konnte eine starke Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in der Fraktion der äußeren mitochondrialen Membran (OMV) gezeigt werden. Dieser Befund belegt, dass die für die Reduktion sowohl des Modellsubstrats BAO als auch TMAO verantwortlichen Enzyme in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert sind. Die ermittelten Werte für PNS, Cytosol und die Mikrosomen konnten nicht quantifiziert werden, da sie unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Um vollständig auszuschließen, dass cytosolische oder mikrosomale Enzyme an der TMAO-Reduktion beteiligt sind, sollten die Inkubationsbedingungen für die porcinen Subfraktionen nochmals optimiert und die Untersuchung mit frischen Subfraktionen wiederholt werden.

Die Beteiligung des mARC-Enzymsystems an der TMAO-Reduktion konnte durch die Untersuchung rekombinanter, humaner Enzyme bewiesen werden. Dadurch wurde erstmals ein humanes Enzym identifiziert, das TMAO reduzieren kann. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass das mARC-Enzymsystem in der Lage ist, einen durch FMOs entstandenen Metaboliten zu entgiften. Während das hmARC1-haltige *N*-reduktive Enzymsystem TMAO zu TMA reduziert, zeigt das hmARC2-haltige

Enzymsystem keine nennenswerte Umsetzung an. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen exogener *N*-Oxide überein. Sowohl Amitriptylin-*N*-oxid als auch Nicotinamid-*N*-oxid werden exklusiv durch hmARC1 reduziert. [98] Die Umsetzungsraten sind bei allen untersuchten *N*-Oxiden geringer als beim Modellsubstrat BAO und auch die kinetischen Parameter deuten auf eine schnellere und umfassendere Umsetzung des Modellsubstrats hin. Letztere sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Substrat	K_m -Wert in mM	V_{max} -Wert in nmol Metabolit·mg ⁻¹ Protein·Min. ⁻¹
Amitriptylin- <i>N</i> -oxid ^a	1,4 ± 0,2	19 ± 1
Nicotinamid- <i>N</i> -oxid ^a	7,1 ± 2,1	204 ± 38
TMAO	30,4 ± 9,8	101 ± 12
BAO ^b	0,2 ± 0,1	34 ± 2

Tabelle 5.1: Kinetische Parameter verschiedener Substrate, reduziert durch das hmARC1-haltige Enzymsystem

^a: [98]; ^b: [116].

Der K_m -Wert für TMAO von etwa 30 mM zeigt an, dass die Affinität zwischen dem Substrat TMAO und dem Enzym hmARC1 relativ gering ausgeprägt ist. Je kleiner der K_m -Wert, desto größer ist die Affinität. Es stellt sich daher die Frage, ob sich aus diesem Wert eine Relevanz für den Organismus ableiten lässt. Generell sollte dabei beachtet werden, dass *in vitro* Daten nicht *in vivo* Szenarien abbilden können, sie bieten lediglich die Grundlage für eine gute Einschätzung. Betrachtet man beispielsweise die Aromatase, das entscheidende Enzym bei der Biosynthese der weiblichen Geschlechtshormone, so findet man in der Literatur einen K_m -Wert für das Substrat Androstendion von 0,46 μ M. [166]. Die Aromatase nimmt eine wichtige physiologische Funktion ein, die durch den kleinen K_m -Wert untermauert wird. [167] Für die Carboanhydrase 2 hingegen konnten experimentell relativ hohe K_m -Werte bestimmt werden: für Kohlenstoffdioxid (CO₂) als Substrat liegt der Wert bei 10 mM und für Dihydrogencarbonat (H₂CO₃) bei 82 mM. [168, 169] Das Enzym kann entweder CO₂ und Wasser in H₂CO₃ umwandeln oder die umgekehrte Reaktion katalysieren. Beide Reaktionen sind in vielen verschiedenen Prozessen von Bedeutung, beispielsweise auch bei der Regulation der Flüssigkeitssekretion in die Vorderkammer des Auges. Die physiologische Relevanz ist trotz der hohen K_m -Werte unumstritten. Carboanhydrasehemmer sind wichtige Therapeutika in der Behandlung des Glaukoms und sind fester Bestandteil der modernen Pharmakotherapie. [170] Ein Substrat mit einem K_m -Wert im zweistelligen millimolaren Bereich sollte daher keinesfalls als physiologisch irrelevantes Substrat abgetan werden. Die Reduktion von TMAO durch hmARC1 kann daher ein wichtiger Prozess im Körper sein.

TMAO wird durch die Oxidation von TMA in der Leber gebildet. Diese Reaktion wird durch FMOs katalysiert, wobei die FMO3 als hauptverantwortliche Isoform gilt. [37] Der K_m -Wert für diese Oxidationsreaktion wurde mit $31 \pm 3 \mu\text{M}$ bestimmt, damit ist die Substrataffinität um den Faktor 1000 höher als bei TMAO und hmARC1. [171] Die FMO3 ist im Gegensatz zu mARC jedoch nur in der Leber lokalisiert. mARC findet sich ubiquitär und kann daher in den verschiedensten Geweben mit TMAO in Kontakt kommen. [172, 173] Heianza *et al.* (2017) beschreiben in ihrem systematischen Review, dass die TMAO-Plasmakonzentration zwischen etwa 400 nM bis 700 μM variieren kann, wobei aktuell noch kein spezifischer Grenzwert festgelegt werden konnte, ab dem von einem erhöhten CVD-Risiko auszugehen ist. [160] Eine kontinuierliche Reduktion von TMAO durch hmARC könnte also bereits relevant für die Reduktion des CVD-Risikos sein. Die Fähigkeit von hmARC1, auch sehr geringe TMAO-Konzentrationen zu reduzieren, also auch in physiologisch relevanten Konzentrationsbereichen zu arbeiten, unterstützt diese Annahme.

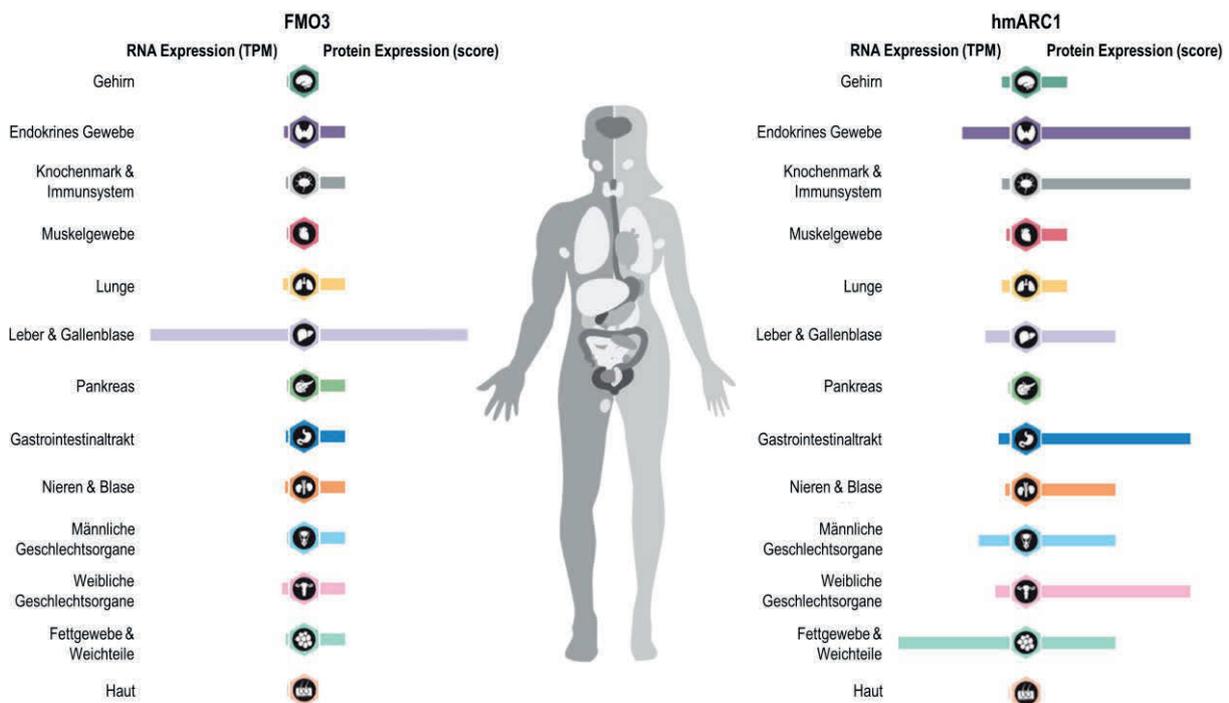


Abbildung 5.3: Expressionsmuster von FMO3 und hmARC1 (modifiziert nach dem Human Protein Atlas [172, 173])

Die untersuchten Gewebe wurden an Hand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt. Die Balken der RNA-Expression geben den jeweils höchsten gefundenen Wert für die RNA-Expression einer jeweiligen Gruppe in *transcripts per million* (TPM) an. Die Balken der Protein-Expression zeigen den jeweils höchsten gefundenen Wert für die Protein-Expression einer jeweiligen Gruppe als Punktzahl (*score*). Der *score* wird aus einer Evaluierung von immunohistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, RNA-Sequenzdaten und Protein-/Gencharakteristika erstellt. [174]

Der TMAO-Metabolismus ist ein komplexer Prozess. Um die Auswirkung einer mARC-bedingten Reduktion besser bewerten zu können, muss neben der Bildung von TMAO auch dessen Exkretion berücksichtigt werden. TMAO wird renal ausgeschieden, die Clearance beträgt $219 \pm 78 \text{ ml/Min}$. [34]

Dies kommt einer reinen Filtration gleich und bedeutet, dass TMAO sehr schnell aus dem Blut in den Primärharn abgegeben wird. Dass es dennoch zu erhöhten Plasmakonzentrationen kommen kann, die mit einem erhöhten CVD-Risiko einhergehen, erscheint ungewöhnlich und verdeutlicht, dass ein alternativer Prozess zur Reduktion erhöhter TMAO-Plasmaspiegel physiologisch relevant sein kann. Die Beteiligung von hmARC1 an genau diesem Prozess deutet auf eine physiologische Funktion des Enzyms als Schutzfaktor vor kardiovaskulären Risiken hin.

5.2.3 Trimethylamin-*N*-oxid-Reduktion durch mARC2-Knockoutmäuse

Die Tatsache, dass TMAO exklusiv durch hmARC1 reduziert wird, ist ein bemerkenswerter Befund. Um diese Substratspezifität näher zu untersuchen, wurden *in vitro* Biotransformationsstudien mit dem mARC2-KO-Mausmodell durchgeführt. Dazu wurden Proben muriner Leberhomogenate von homozygoten mARC2-KO-Mäusen sowie WT-Mäusen verwendet. Es sollte überprüft werden, ob zwischen den verschiedenen Proben ein Unterschied in der Umsetzungsrate von TMAO messbar ist. Dies wurde mit den gleichen Proben im Rahmen einer Masterarbeit auch für das Modellsubstrat BAO untersucht. [129] Für die BAO-Reduktion konnte dabei gefunden werden, dass die *N*-reduktive Aktivität durch den KO des in Mäusen dominant exprimierten mARC2 gegenüber dem WT signifikant reduziert ist. Die Restaktivität der KO-Proben ist auf das gering exprimierte mARC1 zurückzuführen. Für die TMAO-Reduktion konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zusätzlich ist die spezifische Aktivität der TMAO-Reduktion in den WT-Mäusen um den Faktor 100 geringer als die des Modellsubstrats. Vergleicht man jedoch die spezifische Aktivität der KO-Proben, so unterschieden sich die BAO- und TMAO-Reduktion lediglich um den Faktor zwei. Diese Daten bestätigen, dass TMAO exklusiv durch mARC1 reduziert wird. mARC2 ist nicht an der Reduktion des *N*-Oxids beteiligt. Durch die Expression und Testung muriner, rekombinanter Enzyme könnten diese Resultate ergänzt und bestätigt werden.

Alle zuvor untersuchten Substrate werden von beiden mARC-Enzymen reduziert, was die Substanzklasse der *N*-Oxide unter den Substraten hervorhebt. Das relativ breit gefächerte Substratspektrum deutet darauf hin, dass die katalytischen Zentren der beiden mARC-Proteine sich relativ ähnlich sein müssen. Man kann davon ausgehen, dass die Bindung am bzw. im aktiven Zentrum sich jedoch insoweit unterscheidet, als dass *N*-Oxide nicht durch mARC2 umgesetzt werden können. Um dies näher aufzuklären, wären Kristallstrukturen beider Proteine hilfreich, was Gegenstand fortlaufender Forschung ist. Auf Grund ihrer Substratspezifität eignen sich die *N*-Oxide als Markersubstrate für mARC1.

5.2.4 Ausblick

Für die *in vitro* Untersuchungen mit den verwendeten Testsystemen sollte bedacht werden, dass möglicherweise eine Gegenreaktion zur TMAO-Reduktion, und zwar die FMO3-vermittelte TMA-Oxidation, stattgefunden haben könnte. Diese würde die Leberhomogenate von Schwein und Maus und die Zellen betreffen. Die FMO3 ist in der Mikrosomenmembran und in der Membran des ER lokalisiert, weshalb sie in den Subfraktionen der Mitochondrien und OMV nicht vorhanden ist. [175] Insbesondere bei der Testung der murinen Leberhomogenate ist es von Interesse, ob eine Oxidation von TMA durch die FMO3 eine mARC-vermittelte TMAO-Reduktion kaschiert haben könnte. Dies hätte keinen Einfluss auf die Tatsache, dass TMAO nur durch mARC1 reduziert wird, könnte aber möglicherweise zu falsch zu niedrigen Umsetzungsraten führen. Um dies zu überprüfen, könnten die Versuche mit einem Inhibitor für FMO3 wiederholt werden. Dafür kann man beispielsweise ein (*N,N*-Dimethylamino-)Stilbencarboxylat verwenden, diese Verbindungen wurden jedoch nur für FMO1 getestet. [176] Methimazol (Thiamazol) ist ein Substrat der FMO3 und kann als kompetitiver Inhibitor eingesetzt werden. [177]

Ob die mARC1-vermittelte Reduktion von TMAO auch *in vivo* von Relevanz ist, kann durch Untersuchungen von KO-Organismen untersucht werden. Dazu bieten sich sowohl KO-Zellen (s. dazu 5.3) als auch KO-Mäuse an. Da bereits gezeigt wurde, dass es bei der *in vitro* TMAO-Metabolisierung durch die Leberhomogenate keinen signifikanten Unterschied zwischen der *N*-Reduktion von WT-Mäusen zu mARC2-KO-Mäusen gibt, eignet sich die mARC2-KO-Maus nicht als Versuchsmodell. Der Fokus sollte auf der Etablierung und Testung eines mARC1-KO-Mausmodells liegen. Mit diesem Modell könnten neben *in vitro* Metabolismusstudien mit Leberhomogenaten und/oder anderen Mäuseorganen auch *in vivo* Versuche durchgeführt werden. Zum einen könnte man das Mäuseplasma auf den TMAO-Gehalt untersuchen, um festzustellen, ob die KO-Mäuse bedingt durch das fehlende mARC1 eine höhere TMAO-Plasmakonzentration aufweisen. Diese Untersuchung könnte durch Futterstudien erweitert werden, in denen den Mäusen perdeuterierte TMAO-Vorläufer wie perdeuteriertes L-Carnithin oder direkt perdeuteriertes TMAO verabreicht werden. Daraus entstehendes, zirkulierendes TMAO wäre entsprechend markiert und ließe sich gut nachweisen. Und auch die TMA-Konzentrationen könnten bestimmt werden. Als Untersuchungsmaterial sollte dabei neben Plasma auch der Urin mitvermessen werden. Es ist zu beachten, dass für die TMA-Bestimmung dann nicht, wie in der in dieser Arbeit entwickelten Methode, TMA-d₉ als interner Standard verwendet werden könnte. Es müsste ein alternativer Standard, z.B. ¹⁴C-markiertes TMA, gewählt werden. Um TMAO zu bestimmen, eignet sich eine von Wang *et al.* (2014) publizierte, massenspektrometrische Methode. [178] Die Arbeitsgruppe um Mikula im *Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Department of*

Genetics, in Warschau, Polen arbeiten aktuell an einer mARC1-KO-Maus mittels CRISPR/Cas-Verfahren.

5.3 Knockout von hmARC1 in ZR-75-1 Zellen

5.3.1 Generierung eines Knockouts mittels CRISPR/Cas

Der selektive KO von mARC1 gestaltet sich auf Grund der Tandemorientierung beider mARC-Gene schwierig. Durch die neue CRISPR/Cas-Methode kann man jedoch mit wenigen bis keinen Off-Target-Effekten gezielt ein bestimmtes Gen adressieren. Wie bereits beschrieben, ist von beiden mARC-Proteinen üblicherweise eines dominant exprimiert, im Menschen ist dies hmARC1. ZR-75-1 Zellen bilden eine Ausnahme, denn hier sind beide mARC-Proteine auf mRNA Level und auch auf Proteinbasis etwa gleich stark exprimiert und zeigen beide *N*-reduktive Aktivität. [72] Obwohl die Umsetzungsraten selbst für das Modellsubstrat BAO niedrig sind, entsprechend für TMAO noch geringer, eignen sich diese Zellen durch die Besonderheit des Expressionsmusters von mARC besonders für die Untersuchung der Substratspezifität beider Proteine. Insbesondere für die Fragestellung, ob TMAO auch im intakten Zellsystem exklusiv durch mARC1 reduziert wird oder ob mARC2 diese Reaktion aufrechterhalten kann, könnte sich ein solches Knockoutzellsystem bewähren. Allgemein lässt sich durch gezielten Knockout eines mARC-Enzyms überprüfen, ob und in welchem Ausmaß das jeweils andere Protein an der Reduktion eines bestimmten Substrats beteiligt ist. Ein Doppelknockout kann aufzeigen, ob neben mARC möglicherweise auch andere Enzyme an einer Umsetzung beteiligt sind. Diese Untersuchungen könnten alle in ein und derselben Zelllinie durchgeführt werden, was den entscheidenden Vorteil mit sich bringt, dass nicht unterschiedliche Zelllinien miteinander verglichen werden müssen. Daher wurde diese Zelllinie für das KO-Experiment ausgewählt.

Alle molekularbiologischen Arbeitsschritte bis zur Transfektion der humanen ZR-75-1 Zellen waren erfolgreich. Für die Transfektion der Zellen wurde GeneJuice® verwendet. Neben der Konfluenz der Zellen ist vor allem das Verhältnis vom GeneJuice® Reagenz zur DNA entscheidend für den Erfolg der Transfektion. Dieses kann experimentell ermittelt werden. In Anbetracht der Dauer des Experiments wurde auf die Bestimmung des optimalen Reagenz/DNA-Verhältnisses verzichtet und nach Herstellerangaben verfahren. Dabei wurden lediglich leichte Modifikationen vorgenommen, um die Effektivität zu erhöhen. Es wurde insgesamt drei Mal transfiziert und das Reagenz/DNA-Verhältnis währenddessen leicht abgewandelt. Durch Selektion der Zellen über ihre Puromycin-Resistenz ist der Erfolg der Transfektion überprüft worden. Die transfizierten Plasmide enthielten alle eine Puromycin-Resistenz-Kassette. Diejenigen Zellen, die das Plasmid zum Zeitpunkt der Selektion getragen haben,

waren also gegen das Puromycin resistent und überlebten die Selektion. Alle anderen Zellen, also sowohl die Zellen, die das Plasmid gar nicht aufgenommen haben, als auch diejenigen, die es bereits wieder ausgeschleust hatten, gingen jedoch zu Grunde. Bei diesen Zellen kann es sich demzufolge sowohl um WT- als auch um KO-Zellen gehandelt haben. Die überlebenden Zellen, die das Plasmid aufgenommen und zum Zeitpunkt der Selektion getragen haben, blieben entweder WT-Zellen oder konnten sich anschließend zu KO-Zellen weiterentwickeln.

Als zweite Selektionsmethode wurden die Zellen vereinzelt und jeweils eine einzelne Zelle in ein Well ausgesät. Es sollten dadurch Zellkolonien entstehen, die sich aus einer einzelnen Zelle bilden. Bei einem erfolgreichen KO wären dadurch auch reine KO-Zellkolonien entstanden. Die Selektion durch Vereinzeln war jedoch nicht erfolgreich. Die Arbeitsgruppe um Engel, die die ZR-75-1 Zellen ursprünglich etablierten, zeigte bereits, dass das Zellwachstum von der Dichte des Zellrasens abhängt und aus einzelnen Zellen keine Kolonien kultiviert werden können. [165, 179] ZR-75-1 Zellen sind epitheliale Mammakarzinomzellen aus der Brustdrüse. Epithelzellen bilden eine Vielzahl von Zell-Zell-Kontakten aus, die molekulare Interaktionen vermitteln und Signale ins Zellinnere übertragen können. Die Zellteilung, der Zellstoffwechsel und auch die Zellregeneration können so gesteuert werden. [180] Bei Epithelzellen ist insbesondere das Adhäsionsmolekül E-Cadherin an Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Die Hauptfunktion von E-Cadherin ist die Bildung sogenannter *adherens junctions* (haftende Verbindungen). [180, 181] Einige Hinweise sprechen dafür, dass es zusätzlich Signale aussenden kann, die die Migration, Proliferation, Apoptose oder Zelldifferenzierung beeinflussen. [181] Es ist daher denkbar, dass eine Vereinzeln der Zellen auf Grund fehlender Interaktionen der E-Cadherine letal ist.

Die Selektion durch Ausnutzung der Puromycinresistenz war lediglich bei zwei Zellchargen erfolgreich. Da nun ausschließlich solche Zellen vorliegen, bei denen die Transfektion erfolgreich war, ist die Wahrscheinlichkeit eines KOs größer. Zellcharge A und B konnten nach der Puromycinbehandlung erfolgreich vermehrt werden. Die Zellcharge D+E überlebte in einer geringen Zellanzahl, ähnlich wie die beiden anderen Chargen. Jedoch starben diese Zellen nach einigen Wochen. (Zur Benennung der Chargen: s. 3.3.1 bzw. 4.3) Da bei dieser Selektionsmethode ein Gemisch aus WT- und KO-Zellen zu erwarten ist, wird üblicherweise eine weitere Selektion durch Vereinzeln angeschlossen. Für die ZR-75-1 Zellen ist dies nicht möglich, da, wie bereits beschrieben, eine Vereinzeln der Zellen zum Zelltod führt. Folglich wurde mit der Gesamtkultur der verbleibenden Zellen weitergearbeitet.

Die Zellcharge A regenerierte sich schnell von der Puromycinbehandlung und wuchs zu einer Zellkultur heran, die nicht von den Wildtypzellen zu unterscheiden war. Auch eine Westernblotuntersuchung zeigte keine Unterschiede, es konnte kein hmARC1-KO nachgewiesen werden. Bei der Zellcharge B verhielt sich dies jedoch anders. Nach der Selektion waren etwas weniger Zellen übrig als bei der

Zellcharge *A*, die deutlich langsamer wuchsen. Zusätzlich wiesen sie eine andere Morphologie auf. Das langsame Wachstum und die sehr geringe Zellzahl erschwerten die Kultivierung, sodass es mehrere Wochen dauerte, bis ausreichend Zellmaterial für eine Westernblotuntersuchung zur Verfügung stand. Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen und für hmARC1 ein spezifischer Antikörper in der Verdünnung 1:500 angewendet. Durch die geringe Verdünnung zusammen mit der relativ hohen Proteinkonzentration sind dabei unspezifische Banden entstanden, die eine eindeutige Beurteilung des Westernblots erschweren. Es fällt jedoch auf, dass bei der Zellcharge *B* eine Bande fehlt, die auf Grund ihrer Laufhöhe als mARC1-Bande zu deuten ist. Dies spricht für einen erfolgreichen KO. Ein eindeutiges Ergebnis sollte durch die Sequenzierung der DNA erfolgen. Auf Grund der geringen Zellzahl musste darauf allerdings zunächst verzichtet werden und die Zellen weiter vermehrt werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung normalisierte sich sowohl das Wachstumsverhalten als auch die Morphologie der Zellen, sie näherten sich dem WT an. Ein erneuter Westernblot bestätigte diese Beobachtung. Es konnte nun kein Unterschied zwischen den hmARC1-Banden der verschiedenen Zellchargen im Westernblot gesehen werden.

Es sind verschiedene Szenarien denkbar, die diese Entwicklung verursacht haben könnten. Die anfänglichen Beobachtungen zu den Zellveränderungen könnten auf dem fehlenden Zellkontakt beruhen. Wie bereits ausgeführt, wachsen ZR-75-1 Zellen nicht, wenn sie einzeln ausgesät wurden. Sie benötigen den Kontakt zu anderen Zellen. In Diskussionsforen für Forscher (researchgate.net) berichten zahlreiche Wissenschaftler von der Beobachtung, dass bereits ein zu hoch gewähltes Split-Verhältnis beim Passagieren der Zellen zum Zelltod führen kann und empfehlen ein Split-Verhältnis von max. 1:2. [182] Während der intensiven Arbeit mit ZR-75-1 Zellen wurden verschiedene Split-Verhältnisse erprobt, wobei ein Verhältnis von 1:4 bei einer Passage alle sieben Tage die am besten geeignete Variante war. Ein Split-Verhältnis von 1:10 war ebenso erfolgreich. Zwar dauerte es einige Tage länger, bis die gewünschte Konfluenz erreicht werden konnte, doch es wurde keine vermehrte Zellapoptose oder eine veränderte Morphologie beobachtet. Die Zellcharge *A* unterlag dem gleichen Stress wie die Zellcharge *B*, auch hier waren nach der Puromycinbehandlung nur sehr wenige Zellen übrig. Dennoch sind kein verändertes Wachstum und keine veränderte Morphologie aufgetreten. Es ist hervorzuheben, dass auch während der mehrwöchigen Kultur der Zellcharge *B* keine vermehrte Apoptose erkennbar war. Diese zeigt sich bei ZR-75-1 üblicherweise durch lose Zellen und Zelltrümmer. Insgesamt erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass sich die beobachtete Veränderung der Zellcharge *B* auf die zunächst geringe und durch andauernde Kultur schließlich höhere Zellzahl zurückführen lässt.

Ausgehend von der Annahme, dass sich nach der erfolgreichen Transfektion KO-Zellen entwickelt haben, handelt es sich bei den Zellchargen *A* und *B* um Gemische aus KO- und WT-Zellen. Da sich die

beiden Chargen deutlich voneinander unterschieden und die Zellcharge *A* dem WT gleich, liegt die Vermutung nahe, dass die Zellcharge *B* zu Beginn hauptsächlich aus KO-Zellen bestand und die Zellcharge *A* hauptsächlich aus WT-Zellen. Der erste Westernblot unterstützt diese Interpretation. Dennoch ist davon auszugehen, dass in Zellcharge *B* WT-Zellen vorhanden waren. Durch das verlangsamte Wachstum der KO-Zellen konnten diese sich nur langsam vermehren, während die WT-Zellen durch ihr schnelleres Wachstum ab einem bestimmten Zeitpunkt die Zellkultur dominierten. Dadurch überdeckten sie die veränderte Zellmorphologie und –wachstum und zeigten im zweiten Westernblot keine fehlende hmARC1-Bande mehr. Die Beobachtungen unterstützen diese Hypothese. Eine Sequenzanalyse zu einem frühen Zeitpunkt hätte eindeutigen Aufschluss geben können.

Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei der Zellcharge *B* um ein Gemisch aus KO- und WT-Zellen handelt, also der selektive KO von hmARC1 erfolgreich war, soll nun die beobachtete Veränderung des Zellwachstums und der –morphologie betrachtet werden. Möglicherweise sind diese durch eine ausbleibende NOHA-Reduktion begründet. Wie in 1.5.5.2 beschrieben, ist mARC in der Lage, NOHA zu L-Arginin zu reduzieren. Damit steht mehr Substrat für die NOS und für die Arginase zur Verfügung. Da NOHA jedoch die Arginase hemmt, wird die NOS vermehrt L-Arginin umsetzen und somit NO bilden. Die vermehrte Arginase-Inhibition hat einen Einfluss auf die Karzinogenese. Einige Mammakarzinomzellen weisen einen deutlich höheren Polyamingehalt auf als das umgebende, gesunde Gewebe, was zu einer gesteigerten Zellproliferation führt. [183] Die Arginase ist maßgeblich an der Synthese der Polyamine beteiligt. Sie metabolisiert Arginin zu Ornithin und stellt damit den Ausgangsstoff für die Polyamine zur Verfügung. Die Ornithindecaboxylase (OCD) katalysiert anschließend die Umsetzung von Ornithin zu den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin, die für die Zellproliferation essentiell sind. Insbesondere Krebszellen profitieren also von einem erhöhten Polyamin-Gehalt. Bei zellbasierten Versuchen konnte gezeigt werden, dass NOHA antiproliferativ und somit auch apoptotisch auf Brustkrebszellen wirkt. Dieser Effekt ist jedoch auf Zellen begrenzt, die Arginase exprimieren und gleichzeitig NO-unabhängig sind. Eine solche Zelllinie ist beispielsweise MDA-MB-468. Die in diesen Zellen durch NOHA-Gabe getriggerte Apoptose konnte durch Ornithin-Gabe aufgehoben werden, was für eine verminderte Polyaminsynthese durch NOHA spricht. Gleichzeitig hat NOHA jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation von ZR-75-30 Zellen, die im Vergleich zu MDA-MB-468 eine geringe Arginase- und eine relativ hohe eNOS-Aktivität aufweisen. ZR-75-30 scheinen Arginase-unabhängig zu sein und zeigen mit einer Verdopplungszeit von etwa 110 Std. keine hohe Proliferationsrate, was möglicherweise durch den geringen Polyamingehalt begründet ist. Die während der NO-Synthese gebildeten Mengen an endogenem NOHA könnten bereits ausreichen, um die Arginase zu inhibieren, sodass zusätzlich hinzugefügtes NOHA keinen Effekt mehr

ausübt. Des Weiteren ist anzumerken, dass NO in der Lage ist, die OCD zu hemmen und somit zu einer herabgesetzten Polyaminsynthese beiträgt. [184–188]

Neben den Polyaminen hat auch das gebildete NO einen Einfluss auf die Karzinogenese. Niedrige NO-Konzentrationen steigern sowohl Tumorwachstum als auch –zellproliferation und führen vermehrt zu Metastasen, wohingegen hohe NO-Konzentrationen das Tumorwachstum stoppen und Zellapoptose herbeiführen können (s. Abbildung 5.4). [55] In den oben beschriebenen Zellversuchen mit ZR-75-30 wurde nach NOHA-Zugabe keine antiproliferative Wirkung detektiert, obwohl NOHA die NO-Produktion steigern sollte. [188] Es wurde jedoch lediglich ein Zeitraum von sieben Tagen erfasst, obwohl sich die Zellen nur alle 110 Std. verdoppeln. Es ist denkbar, dass eine durch erhöhte NO-Produktion gesteigerte NO-Konzentration zu antiproliferativen und apoptotischen Effekten führt, die sich erst nach einer längeren Kultivierung, also etwa zwei bis drei Zellverdopplungen, zeigen.

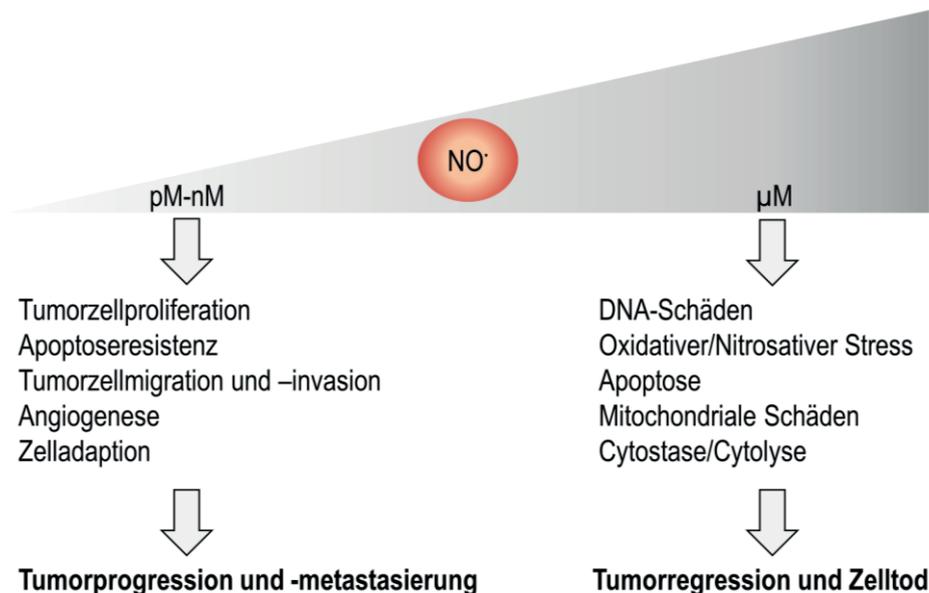


Abbildung 5.4: Konzentrationsabhängige Effekte von Stickstoffmonoxid (modifiziert nach Singh und Gupta [55])

Stickstoffmonoxid (NO) kann abhängig von seiner Konzentration verschiedene Effekte hervorrufen. Bei hohen Konzentrationen werden Prozesse begünstigt, die Tumorzellen in die Apoptose treiben. Bei niedrigen Konzentrationen hingegen werden Tumorwachstum und –metastasierung gefördert. Entscheidend ist hier nicht die Gesamtkonzentration im Körper, sondern die lokale Konzentration, die von der NO-Bildung, -Verteilung und -Lebensdauer, also von der Mikroumgebung, abhängt.

ZR-75-30 Zellen sind aus einem anderen Individuum entnommen worden wie ZR-75-1 Zellen, stellen jedoch Zellen des gleichen Typs dar. Daher sollte ein Vergleich dieser beiden Zellen möglich sein. Dennoch bliebe es zu prüfen, ob die Expression und Aktivität der Arginase und der NOS ebenso

ausgeprägt sind wie bei den ZR-75-30 Zellen. Die Hemmung der Arginase, die keinen Effekt auf die ZR-75-30 Zellen hat, wird vermutlich auch keinen Einfluss auf die ZR-75-1 Zellen haben und erklärt nicht das verlangsamte Wachstum der Zellcharge *B*. Eine vermehrte NO-Produktion durch die Hemmung der NOHA-Reduktion wäre eher denkbar. Eine Übersicht über die NOHA-vermittelten Effekte des hmARC1-KOs sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Es ist allerdings zu beachten, dass hmARC2 nach wie vor exprimiert wird und weiterhin NOHA reduzieren kann.

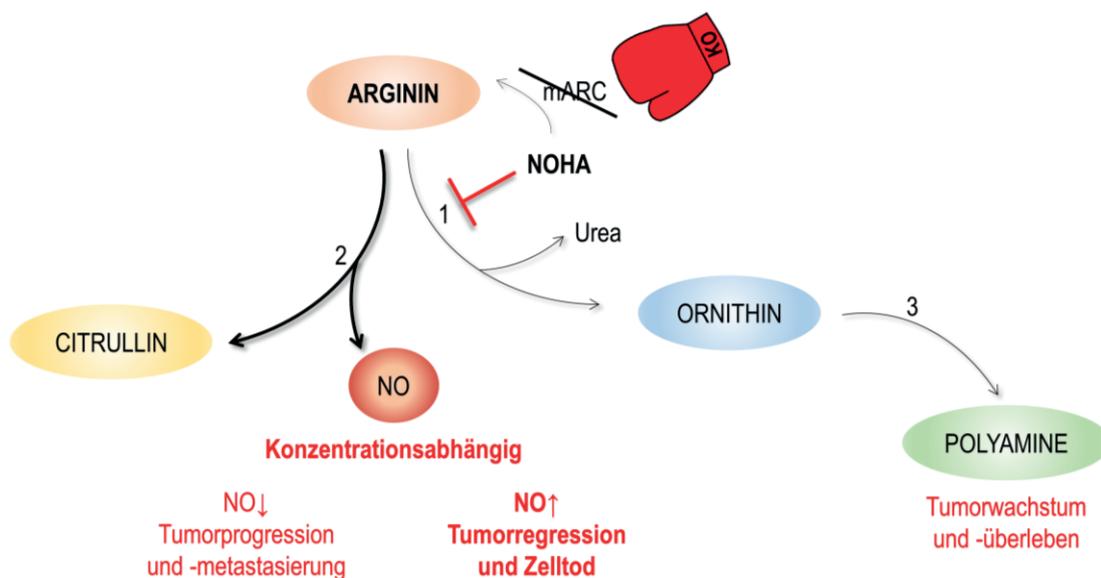


Abbildung 5.5: N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-vermittelte Effekte des hmARC1-Knockouts

N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) ist ein Intermediat der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese und kann die Arginase (1) hemmen. Diese setzt Arginin zu Ornithin um, welches anschließend durch die Ornithindecarboxylase (3) zu Polyaminen weiterreagiert, die für die Zellproliferation essentiell sind. Wird NOHA durch einen Knockout (KO) von hmARC1 nicht mehr zu Arginin reduziert, verstärkt sich die inhibitorische Wirkung von NOHA, die zu einer verminderten Zellproliferation führt. Zusätzlich steht mehr Arginin für die NO-Synthase (2) zur Verfügung, was in einer gesteigerten NO-Produktion resultiert. Da NO in hohen Konzentrationen zur Apoptose führen kann, ist insgesamt ein antiproliferativer und apoptotischer Effekt durch einen mARC-KO zu erwarten.

5.3.2 Ausblick

ZR-75-1 Zellen eignen sich besonders für die Untersuchung der Substratspezifität beider mARC-Proteine mARC1 und mARC2, da beide Proteine mit etwa gleicher Aktivität vorliegen. So kann in einer Zelllinie ein mARC1- und ein mARC2-KO etabliert werden, auch ein Doppel-KO ist vorstellbar. Diese Zellen bringen jedoch den Nachteil mit sich, dass sie mit einer Verdopplungszeit von 80 Std. nur langsam wachsen. Für KO-Studien, insbesondere mit dem CRISPR/Cas-System, sind schneller

proliferierende Zellen besser geeignet. Zusätzlich lassen sich ZR-75-1 Zellen nicht durch Vereinzelung selektieren. Alternativ könnte man Zellen eines anderen Zelltypus wählen. HEK-293 Zellen sind bereits oftmals mittels CRISPR/Cas behandelt worden und lassen sich gut durch Vereinzelung selektieren. [189] Sie besitzen jedoch kaum mARC2. [72] Dennoch könnte es von Interesse sein zu untersuchen, ob durch einen hmARC1-KO in HEK-293 Zellen eine Hochregulierung von hmARC2 zu beobachten ist und ob sich die Zellen ähnlich entwickeln wie die ZR-75-1 Zellen der Zellcharge B. Des Weiteren könnte man in den HEK-293 Zellen mARC2 überexprimieren, beispielsweise wie bei Sparacino-Watkins *et al.* (2014) beschrieben. [52] So könnte man eine Zelllinie erschaffen, die ein ähnliches Expressionsmuster wie die ZR-75-1 Zellen aufweist, aber gleichzeitig die Vorteile des schnelleren Wachstums und der besseren Selektion mit sich bringt. Es könnten zusätzlich weitere Zelllinien auf ihr mARC-Expressionsmuster überprüft werden. In früheren Untersuchungen zeigten beispielsweise humane Panc-89 und Colo-357 Zellen eine vergleichbare Expression von mARC1 und mARC2 auf Proteinebene, sie könnten sich möglicherweise auch für KO-Studien eignen. [146] Für Vortests könnte das von Plitzko (2014) bereits etablierte siRNA-Knockdown-Experiment durchgeführt werden. [72]

Für weitere KO-Studien kann eine alternative Selektionsmethode gewählt werden, bei der CRISPR/Cas-Knockout Plasmide mit einer Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) verwendet werden. Man kann dann mittels Durchflusszytometrie die transfizierten Zellen selektieren und direkt vereinzeln. Dieser Schritt kann bereits ca. 24 Std. nach der Transfektion erfolgen und verkürzt die Selektionsdauer. [157] Bei Verwendung von ZR-75-1 Zellen bleibt die Hürde, dass aus einer einzelnen Zelle eine Kolonie erwachsen müsste. Mittels CRISPR/Cas lassen sich nicht nur Gene ausknocken, es ist eine Vielzahl an Genom-Editierungen möglich. 2015 berichteten Lackner *et al.* von einer neuen Methode, fremde, nicht-genomische DNA in die DNA verschiedener Zellen einzubringen (Knockin). [190] Wählt man eine GFP-Sequenz, könnte man mittels Durchflusszytometrie nur diejenigen Zellen selektieren, bei denen der Einbau der GFP-Sequenz erfolgreich war. Wird sie im kodierenden Bereich des hmARC1-Gens eingesetzt, sollte hmARC1 nicht mehr exprimiert werden können. Anschließend könnten die Zellen als Kolonie kultiviert werden, eine Selektion über Vereinzelung oder Puromycin entfällt.

Um die Transfektion zu optimieren, sollte das ideale Verhältnis von GeneJuice® Reagenz und zu transfizierender DNA bestimmt werden. Insbesondere für die Nickase-Experimente ist dies von Interesse, da zeitgleich zwei Plasmide in die Zelle eingebracht werden müssen. Grundsätzlich sollte beachtet werden, dass eine ausreichend hohe Anzahl an Zellen transfiziert wird.

Neben der Westernblotuntersuchung bietet sich eine Gensequenzierung zur Verifizierung des KOs an. Dafür werden geeignete Primer designt, die die zur sgRNA komplementäre Zielsequenz in der genomischen DNA flankieren. Indels können so detektiert werden. Auch die kryokonservierte Zellcharge

B könnte somit noch untersucht werden. Es ist jedoch fraglich, ob aus der Mischpopulation aus WT- und KO-Zellen ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten ist. Es sollten in jedem Fall die ebenfalls kryokonservierte WT-Zellcharge und die Zellcharge *A* als Kontrolle mitgeführt werden.

Zur Charakterisierung von hmARC1-KO Zellen ist eine reine KO-Zellpopulation nötig. Damit könnten Metabolismusstudien mit den Substraten TMAO und BAO durchgeführt werden und aufzeigen, ob TMAO auch im intakten Zellsystem ausschließlich durch mARC1 reduziert wird. Aber auch die Untersuchung weiterer Substrate könnte so durchgeführt werden. Mit der Etablierung von KO-Zelllinien könnten weitere Testsysteme für potentielle mARC-Substrate erschaffen werden. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen wäre es zusätzlich interessant, die Hypothese einer durch den hmARC1-KO erhöhten und damit antiproliferativen, intrazellulären NO-Konzentration zu untersuchen. Die Detektion von NO stellt jedoch eine Herausforderung dar, insbesondere die intrazelluläre. Mit der Entwicklung sogenannter *genetic NO probes* (geNOps) ist dies allerdings inzwischen möglich. [191] geNOps bestehen aus einer NO-bindenden Domäne, die mit einem fluoreszierenden Protein gekoppelt ist. Sie sind nicht zytotoxisch und sind in der Lage, lokal und temporär aufgelöst NO-Signale in lebenden Zellen zu detektieren. Ergänzend könnte man die von Singh *et al.* (2000) durchgeführten und in 5.3.1 beschriebenen Zellversuche mit ZR-75-1 Zellen wiederholen. [188] WT-Zellen würden zunächst auf ihre NOS- und Arginase-Aktivität untersucht werden, um anschließend den Effekt von NOHA im Nährmedium zu beobachten. Der Zeitraum sollte dafür auf mindestens 3 Wochen ausgedehnt werden, sodass mehrere Zellverdopplungen und –passagen abgedeckt sind. Während dieser Zeit sollte das Zellwachstum genau dokumentiert werden. Sollte durch NOHA vermehrt NO entstehen, so wäre eine sinkende Wachstumsrate zu erwarten. Die Apoptoserate könnte zusätzlich mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass für die Proliferation von ZR-75-1 Zellen Zell-Zell-Kontakte über E-Cadherin entscheidend sind und die fehlende Interaktion dieser Adhäsionsmoleküle bei Vereinzelung zur Apoptose führen, könnte ein Fluoreszenz-gekoppelter E-Cadherin-Antikörper zur Visualisierung der E-Cadherine verwendet werden. Dafür werden die ZR-75-1 Zellen mit einer 4 %igen Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und mit dem Antikörper inkubiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wird anschließend die Bildanalyse durchgeführt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Seit seiner Identifizierung im Jahr 2006 werden mARC und sein *N*-reduktives Enzymsystem eingehend untersucht, um die physiologische Funktion des Molybdoenzyms aufzuklären. [68, 78] Dabei wurden bisher zahlreiche *N*-hydroxylierte und *N*-oxygenierte Verbindungen mittels *in vitro* Biotransformationsstudien als Substrate bestätigt. [78] Eine Beteiligung von mARC am NO-Stoffwechsel, einem kardiovaskulär relevanten Prozess, wurde bereits 2011 postuliert, als mit NOHA erstmals ein endogenes Substrat für mARC getestet wurde. [116] NOHA stellt ein Intermediat der NO-Synthese dar, das zum einen weiter zu NO reagieren kann, oder zum anderen die Arginase inhibieren kann. [106–108] Da die Arginase mit der NOS um das Substrat L-Arginin konkurriert, steht durch die NOHA-vermittelte Arginase-Hemmung mehr Substrat für die NOS zur Verfügung und es kann vermehrt NO entstehen. [116] Die durch mARC induzierte Reduktion von NOHA zu Arginin kann daher als regulativer Eingriff in den NO-Stoffwechsel verstanden werden. Zusätzlich wurde 2014 veröffentlicht, dass mARC auch über eine Nitrit-Reduktion NO freisetzen kann, dies jedoch im Gegensatz zu allen bis dato untersuchten Substraten ausschließlich anaerob. [52] Diese Reaktion konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine klinisch relevante Freisetzung von NO aus Nitrit ist daher in Frage zu stellen und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Das gilt auch für das zunächst aus GTN entstehende Nitrit, das zu NO reduziert werden kann und dadurch zur Wirkung des NO-Donators beiträgt. [58] Eine mARC-vermittelte, anaerobe, direkte GTN-Reduktion wurde ebenfalls untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion nicht stattfindet.

Als weiteres potentiell, endogenes Substrat wurde TMAO untersucht. Dieser physiologische Metabolit begünstigt in hohen Plasmakonzentrationen das individuelle CVD-Risiko, daher ist die Frage nach einem endogenen Entgiftungsmechanismus durch Reduktion von großem Interesse. Dafür wurde zunächst eine geeignete LC/MS/MS-Methode entwickelt, mit der das Reduktionsprodukt TMA auch in Gegenwart hoher TMAO-Konzentrationen bestimmt werden kann. Es ist gelungen, eine Vorsäulenderivatisierung mit Benzylbromid zu etablieren, die durch das Mitführen eines internen Standards eine empfindliche und robuste Analytik ermöglicht. Mit diesem neuen analytischen Tool kann TMA selbst in kleinen Konzentrationen und in Gegenwart von TMAO sowie verschiedenen Proteinquellen und Puffern genau bestimmt werden. Damit bietet diese Methode die Möglichkeit, Fragestellungen in Bezug auf den TMA-Gehalt verschiedener Proben unterschiedlicher Herkunft zu untersuchen, was durch bisher publizierte Methoden nur eingeschränkt möglich war. Somit konnte auch die mARC-vermittelte TMAO-Reduktion zu TMA in verschiedenen Testsystemen überprüft und bestätigt werden. TMAO wurde in humanen ZR-75-1 Zellen zu TMA reduziert. Die Untersuchung porciner Lebersubfraktionen zeigte ebenfalls eine enzymatische TMAO-Reduktion an. Dabei konnte die für das

mARC-Enzymsystem typische Anreicherung der *N*-reduktiven Aktivität in der äußeren mitochondrialen Membran detektiert werden. Um die Beteiligung des Molybdoenzyms eindeutig zu bestätigen, wurden weitere Untersuchungen mit dem rekombinanten, humanen Enzymsystem durchgeführt. Die Beteiligung von mARC konnte so eindeutig bewiesen werden, die TMAO-Reduktion wird jedoch ausschließlich durch das mARC1-haltige und nicht durch das mARC2-haltige Enzymsystem katalysiert. Damit ist, nach aktuellem Kenntnisstand, zum ersten Mal ein humanes Enzym identifiziert worden, das TMAO reduzieren kann. Außerdem ist nun erstmals bewiesen worden, dass das mARC-haltige, *N*-reduktive Enzymsystem einen durch FMO entstandenen, endogenen Metaboliten entgiften kann (s. Abbildung 6.1).

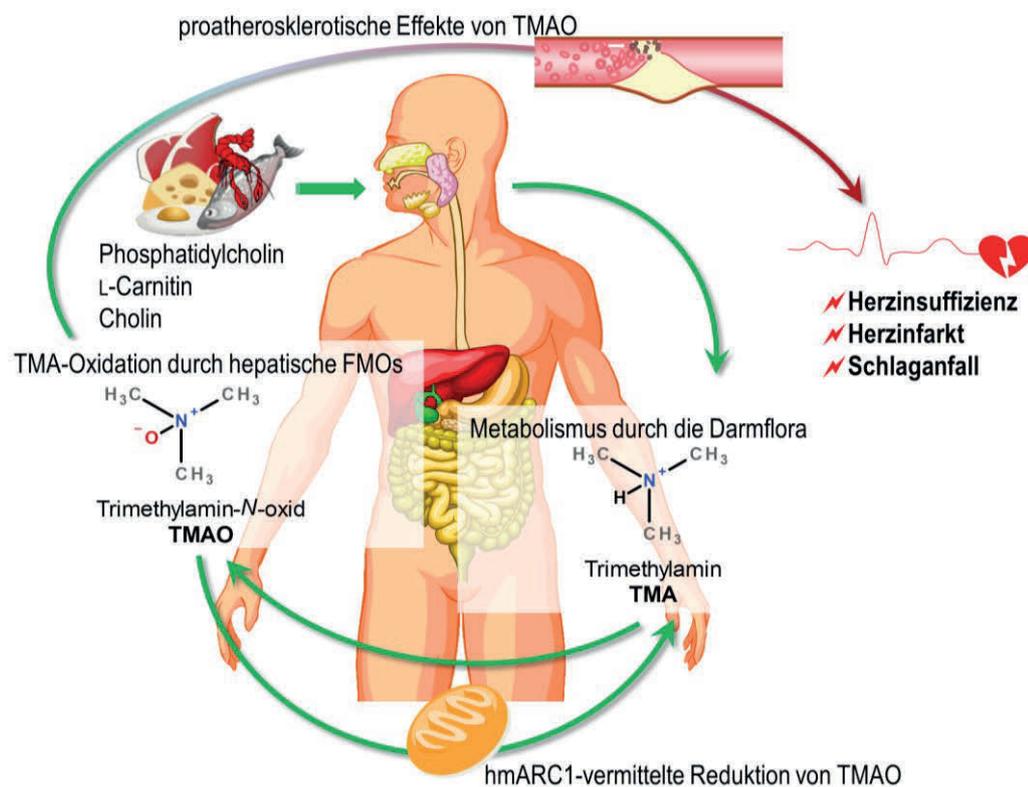


Abbildung 6.1: Trimethylamin-*N*-oxid-Metabolismus (modifiziert nach Zhu *et al.* [47])

Nachdem Nahrung mit Phosphatidylcholin, L-Carnithin oder Cholin aufgenommen wurde, werden diese Verbindungen im Darm durch die dort ansässige Bakterienflora zu Trimethylamin (TMA) verstoffwechselt. Dieses wird absorbiert und zur Leber transportiert, wo das TMA durch Flavinhaltige Monooxygenasen (FMOs; v. a. durch die FMO3) zu Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) oxidiert wird. Ein zu hoher TMAO-Spiegel wird auf Grund proatherosklerotischer Effekte mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen mit Folgen wie beispielsweise einem Herzinfarkt in Verbindung gebracht. [47] Die in dieser Arbeit durch hmARC1 gezeigte *in vitro*-Reduktion von TMAO zu seinem Vorläufer TMA spricht für eine Entgiftung von TMAO.

Bemerkenswert dabei ist, dass diese Reaktion ausschließlich durch hmARC1 katalysiert wird. Dies konnte durch die Untersuchung von homozygoten mARC2-KO-Mäusen bestätigt werden. Da auch die

beiden exogenen Verbindungen Amitriptylin-*N*-oxid und Nicotinamid-*N*-oxid exklusiv durch hmARC1 reduziert werden, stellt die Klasse der *N*-Oxide eine Besonderheit unter den bisher bekannten mARC-Substraten dar. [98] Ob diese Beobachtung möglicherweise auf einer unterschiedlichen Bindetasche im bzw. am aktiven Zentrum beruht, gilt es noch herauszufinden. *N*-Oxide könnten fortan als Markersubstrate eingesetzt werden, um beide mARC-Proteine voneinander zu unterscheiden.

Die kinetischen Parameter der hmARC1-vermittelten TMAO-Reduktion wurden mit $K_m = 30,4 \pm 9,8$ mM und $V_{max} = 101 \pm 12$ nmol·mg⁻¹ Protein·Min.⁻¹ ermittelt. Damit zeigt TMAO einen vergleichsweise hohen K_m -Wert. Das Modellsubstrat BAO weist beispielsweise einen K_m -Wert von $0,2 \pm 0,1$ mM auf. Der K_m -Wert der umgekehrten Reaktion, der TMA-Oxidation durch die FMO3, ist mit 31 ± 3 μM um den Faktor 1000 kleiner als der der Reduktion, folglich ist die Affinität sowie die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxidationsreaktion größer als bei der Reduktionsreaktion. [171] Die mARC-vermittelte TMAO-Reduktion kann *in vivo* dennoch von Bedeutung sein, da die mARC-Expression ubiquitär, diejenige der FMO3 jedoch auf die Leber beschränkt ist. [173, 172]

Ein mittels CRISPR/Cas durchgeführter KO von hmARC1 in ZR-75-1 Zellen sollte zur Aufklärung der Substratspezifität beider mARC-Proteine beitragen. Die Selektion der transfizierten Zellen gestaltete sich jedoch schwierig, auch die weitere Kultur der wenigen verbliebenen Zellen stellte eine große Herausforderung dar. Abschließend lässt sich daher nicht zweifelsfrei ermitteln, ob der selektive hmARC1-KO erfolgreich war, obwohl die Beobachtungen dafür sprechen. Es ist davon auszugehen, dass eine Mischkultur aus WT- und KO-Zellen vorlag, in denen die WT-Zellen dominierten, sodass keine weitergehende Nutzung des KO-Modells erfolgen konnte. Dennoch bietet das CRISPR/Cas-System eine gute Möglichkeit zur Genom-Editierung, mit der sowohl mARC1- als auch mARC2-KO-Modelle hergestellt werden können. Auch ein Doppel-KO ist denkbar, sofern dieser nicht letal ist. Diese Methode sollte weiter verfolgt werden, um ein Zell- oder auch Mausmodell zu erschaffen, in dem alle für das mARC-System relevanten Enzyme einzeln und in Kombination ausgeknockt werden können. Eine Untersuchung des so entstehenden Phänotyps ist ebenfalls von großer Bedeutung, da hier die physiologische(n) Funktion(en) von mARC näher ermittelt werden könnten. Beide mARC-Gene sind in Eukaryoten hochkonserviert, was für eine essentielle Funktion der Enzyme für eukaryotische Organismen spricht. Dennoch ist die physiologische Funktion von mARC bisher nicht gänzlich aufgeklärt. Die Etablierung einer mARC1-KO-Maus sollte daher forciert werden, ebenso wie die weiterführende Charakterisierung der mARC2-KO-Maus, denn hier liegt ein KO-Modell vor, in dem das jeweilige Protein vollständig, also in jedem Gewebe und in jeder zellulären Lokalisation, ausgeknockt ist. Alle Stoffwechselprozesse, an denen das jeweilige Protein beteiligt ist, sind daher von dem KO betroffen. Somit kann ein umfassendes Bild aller mARC-abhängigen Funktionen und

Stoffwechselprozesse erstellt werden. Das IMPC arbeitet fortlaufend an der Untersuchung des Phänotyps der mARC2-KO-Maus, außerdem sollte in den nächsten Jahren auch eine mARC1-KO-Maus etabliert werden. Gleichzeitig arbeiten Kollegen des Arbeitskreises gemeinsam mit unserem Kooperationspartner, Dr. Michal Mikula und seiner Arbeitsgruppe (*Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Department of Genetics*, in Warschau, Polen), sowohl an der weiteren Charakterisierung der mARC2-KO-Maus sowie an der Entwicklung eines mARC1-KO-Mausmodells mittels CRISPR/Cas.

7 MATERIALIEN UND GERÄTE

7.1 Materialien und Reagenzien

Materialien und Reagenzien, die nicht in dieser Tabelle aufgeführt sind, wurden von Sigma-Aldrich (gehörend zu Merck, Darmstadt) oder der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe bezogen.

Reagenz	Hersteller
10x Fast Digest Puffer	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
10x Ligase Puffer	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
10x Ligation Puffer	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
Acetonitril HPLC grade	Honeywell Building Solutions GmbH, Offenbach am Main
Bromphenolblau	Merck KgaA, Darmstadt
Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
FBS	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
GeneJET Gel Extraction Kit	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
GeneJuice®	Merck KgaA, Darmstadt
Methanol , J.T.Baker®	Avantor Performance Materials, bezogen über VWR International GmbH, Darmstadt
NADH	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Natriumbicarbonat	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Natriumpyruvat	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Pageruler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
PBS, Dulbeccos w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
perdeutertes Trimethylamin Hydrochlorid (D10)	Eurisotop GmbH, Saarbrücken

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
RPMI Medium 1640	Life Technologies GmbH, Carlsbad, CA, USA
Stripping Buffer	Candor Bioscience GmbH, Wangen
T4 PNK	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
Trypsin/EDTA (0,05 %)	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
Material	Hersteller
Cryovials CRYO.S.™	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Gewindeflaschen	1,5 ml ND8-Gewindeflaschen klarglas, VWR International GmbH (Hannover)
HPLC-Trennsäule	LiChrospher® 60 RP-select B (5 µm, 250 · 4 mm), Agilent Technologies Sale & Services GmbH & Co. KG (Waldbronn)
HPLC-Trennsäule	Poroshell 120, EC-C18, 3,0x50mm, 2,7µm, Agilent Technologies Sale & Services GmbH & Co. KG (Waldbronn)
HPLC-Trennsäule	Gemini® 5 µm NX-C18 110 (150 · 4,6 mm), Phenomenex Deutschland (Aschaffenburg)
HPLC-Vorsäulen	Phenomenex Security Guard Gemini-NX C18 4x3.0 mm, Phenomenex Deutschland (Aschaffenburg)
HPLC-Vorsäulen	SecurityGuard™ Cartridges C8 (4 · 3,0 mm), Phenomenex Deutschland (Aschaffenburg)
Mikroeingsätze	Mikroeingsätze ND8 klarglas konisch 15 mm Spitze, VWR International GmbH (Hannover)
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (diverse Größen), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
PVDF-Membran	Hybond-P, GE Healthcare Amersham, Chalfont St Giles, UK
Reaktionsgefäße	SafeSeal Reaktionsgefäße (diverse Größen), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Schraubdeckel	PP-Schraubkappe mit zentralem Loch, VWR International GmbH (Hannover)

Schraubröhren (Falcontubes)	(diverse Größen), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Septen	PTFE-Septum, VWR International GmbH (Hannover)
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Vorsäulenhalter	SecurityGuard ULTRA Vorsäulenhalter, für UHPLC Säulen 2.1 bis 4.6mm ID, Ea, Phenomenex Deutschland (Aschaffenburg)
Wellplates, steril	(diverse Größe), Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Whatman® Paper	GE Healthcare Amersham, Chalfont St Giles, UK
Zellkulturflaschen, steril	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

7.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
Autoklav	LTA32/25, Zirbus technology (Bad Grund)
Brutschrank	Heraeus GmbH (Hanau)
Einfriercontainer	Nalgene™ Cryo Freezing Container Mr. Frosty™ (ThermoFisher Scientific, Pinneberg)
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Feinwaage	Typ ABS 80-40, Kern Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Netzgerät	peqPOWER 300, Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved Bright Line, LO-Laboroptik Ltd (Lancing, UK)
Sievers Nitric Oxide Analyzer 280i (NOA)	GE Analytical Instruments (Boulder, CO, USA)
PCR Thermocycler	peqSTAR, Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
pH-Meter	inoLab, Wissenschaftlich Technische Werkstätten (Weilheim)
Pipetten	Eppendorf® Reference/Multipette M4, Eppendorf AG (Hamburg)
Plattenschüttelinkubator	Sky Line DTS-4, LTF Labortechnik (Wasserburg)

Schüttelwasserbad	Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH Co. (Burgwedel)
Schüttler	IKA-VIBRAX-VXR, Janke Kunkel GmbH Co. KG, IKA Labortechnik Staufen (Staufen)
Sterilwerkbank	Laminar Air® HB2448, Heraeus GmbH (Hanau)
Tischzentrifuge	Typ 2020, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 106, Bandelin electronic (Berlin)
Umkehrmikroskop	Olympus CK2, Olympus (Hamburg)
UV-Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Scan/50 MPR mit Cary Win UV-Software 2.0, Varian GmbH (Darmstadt)
Vortexer	VF2, Janke Kunkel GmbH Co. KG, IKA Labortechnik Staufen (Staufen)
Waage	Kern EW2200-2NM, Kern Sohn GmbH (Balingen-Frommern)

7.3 Antikörper, Enzyme und Plasmide

Antikörper	Spezies und Hersteller
anti-mARC1 (AP9754c)	Kaninchen, polyklonal; Abgent (San Diego, CA, USA)
anti-mARC2 (HPA015085)	Kaninchen, polyklonal (Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck, Darmstadt)
anti-Cyb5B (HPA007893)	Kaninchen, polyklonal (Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck, Darmstadt)
anti-Cyb5R3 (HPA001566)	Kaninchen, polyklonal (Sigma-Aldrich, gehörend zu Merck, Darmstadt)
Enzyme	Hersteller
Esp3I	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
BbsI	ThermoFisher Scientific, Pinneberg
Plasmide	Hersteller
pLentiCRISPRv2	Addgene, Cambridge, MA, USA
Cas9n	Addgene, Cambridge, MA, USA

8 LITERATUR

1. World Health Organization (2017) Cardiovascular diseases (CVDs); Fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
2. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2016) Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK - Langfassung. www.khk.versorgungsleitlinien.de
3. Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017) Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12 Reihe 4 - 2015
4. Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017) Gesundheit - Krankheitskosten 2002, 2004, 2006 und 2008. Fachserie 12 Reihe 7.2 - Ausgabe 2015
5. Kelm M, Strauer BE (1999) Endotheliale Dysfunktion. *Der Internist* 40 (12): 1300–1307
6. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D (1984) Endothelial Cells as Mediators of Vasodilation of Arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 6 (2): 336-343
7. Moncada S, Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1: 193-201
8. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J (2005) Endothelial Dysfunction. Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vascular Health and Risk Management* 1 (3): 183–198
9. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809
10. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989) Beyond Cholesterol. *New England Journal of Medicine* 320 (14): 915–924
11. Tang WW, Hazen SL (2017) Microbiome, trimethylamine *N*-oxide, and cardiometabolic disease. *Translational Research* 179 (Supplement C): 108–115; und darin enthaltene Literatur
12. Monteiro MS, Carvalho M, Bastos ML, Guedes de Pinho P (2013) Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery: Advances and Challenges. *Current Medicinal Chemistry* (20): 257–271
13. Johnson CH, Patterson AD, Idle JR, Gonzalez FJ (2012) Xenobiotic metabolomics: Major impact on the metabolome. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52: 37–56

14. Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A (2009) The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (10): 1303–1315
15. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WHW, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL (2011) Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472 (7341): 57–63
16. Suwa A (1909a) Untersuchungen über die Organextrakte der Selachier. I. Die Muskelextraktstoffe des Dornhais. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 128 (6-9): 421–426
17. Bocklisch O (1885) Über Fäulnisbasen (Ptomaine) aus Fischen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 18 (1): 86–89
18. Suwa A (1909b) Untersuchungen über die Organextrakte der Selachier. II. Über das aus den Muskelextraktstoffen gewonnene Trimethylaminoxid. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 129 (3-5): 231–239
19. Barrett E (1985) Bacterial Reduction of Trimethylamine Oxide. *Annual Review of Microbiology* 39 (1): 131–149
20. Dos Santos JP, Iobbi-Nivol C, Couillault C, Giordano G, Méjean V (1998) Molecular analysis of the trimethylamine *N*-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *Journal of molecular biology* 284 (2): 421–433
21. Takagi M, Tsuchiya T, Ishimoto M (1981) Proton Translocation Coupled to Trimethylamine *N*-Oxide Reduction in Anaerobically Grown *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 148 (3): 762–768
22. Giordano G, Violet M, Medani C, Pommier J (1984) A common pathway for the activation of several molybdoenzymes in *Escherichia coli* K12. *Biochimica et biophysica acta* 798 (2): 216–225
23. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science* 217: 1214–1222
24. Yancey PH und Somero GN (1979) Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochemical Journal* 183 (2): 317–323
25. Jaravine VA, Rathgeb-Szabo K, Alexandrescu AT (2000) Microscopic stability of cold shock protein A examined by NMR native state hydrogen exchange as a function of urea and trimethylamine *N*-oxide. *Protein Science* (9): 290–301

26. Lin TY und Timasheff SN (1994) Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine *N*-oxide interactions with protein. *Biochemistry* 33 (42): 12695–12701
27. Wang A und Bolen DW (1997) A naturally occurring protective system in urea-rich cells. Mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* 36 (30): 9101–9108
28. Murray CK und Gibson DM (1972a) An investigation of the method of determining trimethylamine in fish muscle extracts by the formation of its picrate salt—Part I. *International Journal of Food Science and Technology* (7): 35–46
29. Murray CK und Gibson DM (1972b) An investigation of the method of determining trimethylamine in fish muscle extracts by the formation of its picrate salt — Part II. *International Journal of Food Science and Technology* (7): 47–51
30. Armenta S, Coelho NMM, Roda R, Garrigues S, de La Guardia M (2006) Seafood freshness determination through vapour phase Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica chimica acta* 580 (2): 216–222
31. Humbert JR, Hammond KB, Hathaway WE, Marcoux JG, O'Brien D (1970) Trimethylaminuria: The Fish-Odour Syndrome. *The Lancet*: 770–771
32. Higgins T, Cgaykin S, Hammond KB, Humbert JR (1972) Trimethylamine *N*-Oxide Synthesis: A Human Variant. *Biochemical Medicine* 6 (4): 392–396
33. Mitchell SC und Smith RL (2001) Trimethylaminuria: The Fish Malodor Syndrome. *Drug metabolism and disposition* 29 (4, Teil 2): 517–521
34. Hai X, Landeras V, Dobre MA, DeOreo P, Meyer TW, Hostetter TH (2015) Mechanism of Prominent Trimethylamine Oxide (TMAO) Accumulation in Hemodialysis Patients. *PloS one* 10 (12): e0143731
35. Zeisel SH, Mar MH, Howe JC, Holden JM (2003) Concentrations of Choline-Containing Compounds and Betaine in Common Foods. *The American Society for Nutritional Sciences* 133 (5): 1302–1307
36. Al-Waiz M, Mikov M, Mitchell SC, Smith RL (1992) The exogenous origin of trimethylamine in the mouse. *Metabolism* 41 (2): 135–136

37. Lang DH, Yeung CK, Peter RM, Ibarra C, Gasser R, Itagaki K, Philpot RM, Rettie AE (1998) Isoform specificity of trimethylamine *N*-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology* 56 (8): 1005–1012
38. Podadera P, Sipahi AM, Arêas JAG, Lanfer-Marquez UM (2005) Diagnosis of suspected trimethylaminuria by NMR spectroscopy. *Clinica chimica acta* 351 (1-2): 149–154
39. Lee SK, Kim DH, Jin CB, Yoo HH (2010) Determination of Urinary Trimethylamine and Trimethylamine *N*-oxide by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Mixed-Mode Stationary Phases. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31 (2): 483–486
40. Nobelprize.org "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1958". https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1958/
41. Joshua Lederberg (2000) Microbiology's World Wide Web. <https://www.project-syndicate.org/commentary/microbiology-s-world-wide-web>
42. Brown JM und Hazen SL (2015) The gut microbial endocrine organ. Bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annual review of medicine* 66: 343–359
43. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S (2009) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Kapitel 5, 6. Aufl. Springer Medizin Verlag, Heidelberg
44. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang W, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine* 19 (5): 576–585
45. Fu Q, Zhao M, Wang D, Hu H, Guo C, Chen W, Li Q, Zheng L, Chen B (2016) Coronary Plaque Characterization Assessed by Optical Coherence Tomography and Plasma Trimethylamine-*N*-oxide Levels in Patients With Coronary Artery Disease. *The American journal of cardiology* 118 (9): 1311–1315
46. Li XS, Obeid S, Klingenberg R, Gencer B, Mach F, Räber L *et al.* (2017) Gut microbiota-dependent trimethylamine *N*-oxide in acute coronary syndromes. A prognostic marker for incident cardiovascular events beyond traditional risk factors. *European heart journal* 38 (11): 814–824
47. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z *et al.* (2016) Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell* 165 (1): 111–124

48. Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Darley-Usmar VM (2010) What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *Journal of Biological Chemistry* 285 (26): 19699–19704
49. Nobelprize.org "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998". http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/
50. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 277 (41): 38079–38086
51. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. (1991) *N*^ω-Hydroxy-L-arginine Is an Intermediate in the Biosynthesis of Nitric Oxide from L-Arginine. *Journal of Biological Chemistry* 266: 6259–6263
52. Sparacino-Watkins CE, Tejero J, Sun B, Gauthier MC, Thomas J, Ragireddy V *et al.* (2014) Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *The Journal of biological chemistry* 289 (15): 10345–10358
53. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F (1977) Stimulation of Guanylate Cyclase by Sodium Nitroprusside, Nitroglycerin and Nitric Oxide in Various Tissue Preparations and Comparison to the Effects of Sodium Azide and Hydroxylamine. *Journal of Cyclic Nucleotide Research* (3): 23–35
54. Bian K, Doursout MF, Murad F (2008) Vascular System: Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Diseases. *The Journal of Clinical Hypertension* 10 (4): 304–310
55. Singh S, Gupta AK (2011) Nitric oxide: Role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 67 (6): 1211–1224
56. Marsh N, Marsh A (2000) A Short History Of Nitroglycerine And Nitric Oxide In Pharmacology And Physiology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27 (4): 313–319; und darin enthaltene Literatur
57. G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG (2015) Fachinformation Nitrolingual akut® Spray
58. Lang BS, Gorren ACF, Oberdorfer G, Wenzl MV, Furdui CM, Poole LB, Mayer B, Gruber K (2012) Vascular bioactivation of nitroglycerin by aldehyde dehydrogenase-2. Reaction intermediates revealed by crystallography and mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 287 (45): 38124–38134
59. Hu Y, Ribbe MW (2011) Biosynthesis of Nitrogenase FeMoco. *Coordination chemistry reviews* 255 (9-10): 1218–1224

60. Mendel RR, Kruse T (2012) Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochimica et biophysica acta* 1823 (9): 1568–1579
61. Hille R, Nishino T, Bittner F (2011) Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination chemistry reviews* 255 (9-10): 1179–1205
62. Teschner J, Lachmann N, Schulze J, Geisler M, Selbach K, Santamaria-Araujo J, Balk J, Mendel RR, Bittner F (2010) A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *The Plant cell* 22 (2): 468–480
63. Reiss J, Cohen N, Dorche C, Mandel H, Mendel RR, Stallmeyer B, Zobot MT, Dierks T (1998) Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nature genetics* 20 (1): 51–53
64. Nowak K, Luniak N, Witt C, Wüstefeld Y, Wachter A, Mendel RR, Hänsch R (2004) Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant & cell physiology* 45 (12): 1889–1894
65. Klein JM, Busch JD, Potting C, Baker MJ, Langer T, Schwarz G (2012) The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* 287 (51): 42795–42803
66. Romão MJ, Coelho C, Santos-Silva T, Foti A, Terao M, Garattini E, Leimkühler S (2017) Structural basis for the role of mammalian aldehyde oxidases in the metabolism of drugs and xenobiotics. *Current opinion in chemical biology* 37: 39–47
67. Sanoh S, Tayama Y, Sugihara K, Kitamura S, Ohta S (2015) Significance of aldehyde oxidase during drug development. Effects on drug metabolism, pharmacokinetics, toxicity, and efficacy. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 30 (1): 52–63
68. Havemeyer A, Bittner B, Wollers S, Mendel RR, Kunze T, Clement B (2006) Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *The Journal of biological chemistry* 281 (46): 34796–34802
69. Wahl B, Reichmann D, Niks D, Krompholz N, Havemeyer A, Clement B, Messerschmidt T, Rothkegel M, Biester H, Hille R, Mendel RR, 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 (48): 37847–37859
70. Wahl RC und Rajagopalan KV (1982) Evidence for the Inorganic Nature of the Cyanolyzable Sulfur of Molybdenum Hydroxylases. *The Journal of biological chemistry* 257 (3): 1354–1359

71. Massey V und Edmondson D (1970) On the Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by Cyanide. *The Journal of biological chemistry* 245 (24): 6595–6598
72. Plitzko B (2014) Die Komponenten des mARC-Enzymsystems im *N*-reduktiven Metabolismus humaner Zellen. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
73. Ott G, Reichmann D, Boerger C, Cascorbi I, Bittner F, Mendel RR, Kunze T, Clement B, Havemeyer A (2014) Functional characterization of protein variants encoded by nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in MARC1 and MARC2 in healthy Caucasians. *Drug metabolism and disposition* 42 (4): 718–725
74. Anantharaman V und 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
75. Islinger M, Lüers GH, Li KW, Loos M, Völkl A (2007) Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 282 (32): 23055–23069
76. Wiese S, Gronemeyer T, Ofman R, Kunze M, Grou CP, Almeida JA *et al.* (2007) Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & cellular proteomics* 6 (12): 2045–2057
77. Krompholz N, Krischkowski C, Reichmann D, Garbe-Schönberg D, Mendel RR, Bittner F, Clement B, Havemeyer A (2012) The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is involved in detoxification of *N*-hydroxylated base analogues. *Chemical research in toxicology* 25 (11): 2443–2450
78. Ott G, Havemeyer A, Clement B (2015) The mammalian molybdenum enzymes of mARC. *Journal of biological inorganic chemistry* 20 (2): 265–275
79. Andersson S, Hofmann Y, Nordling A, Li X, Nivelius S, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M, Johansson I (2005) Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of *N*-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug metabolism and disposition* 33 (4): 570–578
80. Havemeyer A, Lang J, Clement B (2011) The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC. Current state of research. *Drug metabolism reviews* 43 (4): 524–539
81. Yang J, Giles LJ, Ruppelt C, Mendel RR, Bittner F, Kirk ML (2015) Oxyl and hydroxyl radical transfer in mitochondrial amidoxime reducing component-catalyzed nitrite reduction. *Journal of the American Chemical Society* 137 (16): 5276–5279

82. Neve EPA, Nordling A, Andersson TB, Hellman U, Diczfalusy U, Johansson I, Ingelman-Sundberg M (2012) Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 287 (9): 6307–6317
83. Plitzko B, Ott G, Reichmann D, Henderson CJ, Wolf CR, Mendel RR, Bittner F, Clement B, Havemeyer A (2013) The involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2 and mitochondrial cytochrome b5 in *N*-reductive metabolism in human cells. *The Journal of biological chemistry* 288 (28): 20228–20237
84. Lederer F, Ghir R, Guiard B, Cortial S, Ito A (1983) Two Homologous Cytochromes b₅ in a Single Cell. *European Journal of Biochemistry* 132 (1): 95–102
85. Borgese N, D'Arrigo A, Silvestris M de, Pietrini G (1993) NADH-cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 325 (1-2): 70–75
86. D'Arrigo A, Maneran E, Longhill R, Borgese N (1993) The Specific Subcellular Localization of Two Isoforms of Cytochrome b₅ Suggests Novel Targeting Pathways. *The Journal of biological chemistry* 268 (4): 2802–2808
87. Kimura S, Kawamura M, 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 (6): 3580–3589
88. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S *et al.* (2009) BioGPS. An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome biology* 10 (11): R130
89. Plitzko B, Havemeyer A, Bork B, Bittner F, Mendel R, Clement B (2016) Defining the Role of the NADH-Cytochrome-b₅ Reductase 3 in the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzyme System. *Drug metabolism and disposition* 44 (10): 1617–1621
90. Clement B, Immel M, Terlinden R, Wingen F-J (1992) Reduction of Amidoxime Derivatives to Pentamidine in vivo. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 325 (1): 61–62
91. Clement B und Raether W (1985) Amidoximes of Pentamidine: Synthesis, Trypanocidal and Leishmanicidal Activity. *Arzneimittelforschung* 35 (II) (7): 1009–1014
92. Kadlubar FF und Ziegler DM (1974) Properties of a NADH-Dependent *N*-Hydroxy Amine Reductase Isolated from Pig Liver Microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics* 162: 83–92

93. Clement B, Lomb R, Möller W (1997) Isolation and Characterization of the Protein Components of the Liver Microsomal O₂-insensitive NADH-Benzamidoxime Reductase. *Journal of Biological Chemistry* 272 (31): 19615–19620
94. Clement B, Behrens D, Amschler J, Matschke K, Wolf S, Havemeyer A (2005) Reduction of sulfamethoxazole and dapson hydroxylamines by a microsomal enzyme system purified from pig liver and pig and human liver microsomes. *Life sciences* 77 (2): 205–219
95. Hall JE, Kerrigan JE, Ramachandran K (1998) Anti-*Pneumocystis* Activities of Aromatic Diamidoxime Prodrugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (3): 666–674
96. Huang TL, Bacchi CJ, Kode NR, Zhang Q, Wang G, Yartlet N *et al.* (2007) Trypanocidal activity of piperazine-linked bisbenzamidines and bisbenzamidoxime, an orally active prodrug. *International journal of antimicrobial agents* 30 (6): 555–561
97. Gruenewald S, Wahl B, Bittner F, Hungeling H, Kanzow S, Kotthaus J, Schwering U, Mendel RR, Clement B (2008) The fourth molybdenum containing enzyme mARC. Cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs. *Journal of medicinal chemistry* 51 (24): 8173–8177
98. Jakobs HH, Froriep D, Havemeyer A, Mendel RR, Bittner F, Clement B (2014) The Mitochondrial Amidoxime Reducing component (mARC): Involvement in Metabolic Reduction of *N*-Oxides, Oximes and *N*-Hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem* (9): 2381–2387
99. Ginsel C (2017) Publikation und Dissertation in Vorbereitung, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
100. Cribb AE, Spielberg SP, Griffin GP (1995) *N*₄-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P4502C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes. *Drug metabolism and disposition* 23 (3): 406
101. Lavergne SN, Kurian JR, Bajad SU, Maki JE, Yoder AR, Guzinski MV, Graziano FM, Trepanier LA (2006) Roles of endogenous ascorbate and glutathione in the cellular reduction and cytotoxicity of sulfamethoxazole-nitroso. *Toxicology* 222 (1): 25–36
102. Ott G, Plitzko B, Krischkowski C, Reichmann D, Bittner F, Mendel RR, Kunze T, Clement B, Havemeyer A (2014) Reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine (SMX-HA) by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Chemical research in toxicology* 27 (10): 1687–1695
103. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2014) Stryer Biochemie, 7. Aufl. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
104. Schaaf CP, Zschocke J (2013) Basiswissen Humangenetik, 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin

105. Ott G. (2013) Untersuchungen zu genetischen Variationen im mARC-haltigen N-reduktiven Enzymsystem. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
106. Meyer J, Richter N, Hecker M (1997) High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Nitric Oxide Synthase-Related Arginine Derivatives in Vitro and in Vivo. *Analytical Biochemistry* 247 (1): 11–16
107. Hecker M, Schott C, Bucher B, Busse R, Stoclet JC (1995) Increase in serum N^ω-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide. *European Journal of Pharmacology* 275 (1): R1-R3
108. Daghigh F, Fukuto JM, Ash DE (1994) Inhibition of Rat Liver Arginase by an Intermediate in NO Biosynthesis, N^ω-hydroxy-L-arginine. Implications for the Regulation of Nitric Oxide Biosynthesis by Arginase. *Biochemical and biophysical research communications* 202 (1): 174–180
109. Boucher JL, Moali C, Tenu JP (1999) Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (8): 1015-1028
110. Schade D, Kotthaus J, Clement B (2010) Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective. Current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 126 (3): 279–300
111. Holowatz LA, Thompson CS, Kenney WL (2006) L-Arginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilatation in aged human skin. *The Journal of Physiology* 574 (2): 573–581
112. Durante W, Johnson FK, Johnson RA (2007) Arginase: A critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34 (9): 906–911
113. Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Henry Y, Mansuy D (1992) Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N^ω-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochemical and biophysical research communications* 187 (2): 880–886
114. Vetrovsky P, Stoclet JC, Entlicher G (1996) Possible mechanism of nitric oxide production from N^ω-hydroxy-L-arginine or hydroxylamine by superoxide ion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28 (12): 1311–1318
115. Renaud JP, Boucher JL, Vadon S, Delaforge M, Mansuy D (1993) Particular Ability of Liver P450s3a to Catalyze the Oxidation of N^ω-Hydroxyarginine to Citrulline and Nitrogen Oxides and Occurrence in NO Synthases of a Sequence Very Similar to the Heme-Binding Sequence in P450s. *Biochemical and biophysical research communications* 192 (1): 53–60

116. Kotthaus J, Wahl B, Havemeyer A, Kotthaus J, Schade D, Garbe-Schönberg D, Mendel RR, Bittner F, Clement B (2011) Reduction of *N*^ω-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *The Biochemical journal* 433 (2): 383–391
117. Plitzko B, Havemeyer A, Kunze T, Clement B (2015) The pivotal role of the mitochondrial amidoxime reducing component 2 in protecting human cells against apoptotic effects of the base analog *N*⁶-hydroxylaminopurine. *The Journal of biological chemistry* 290 (16): 10126–10135
118. Mikula M, Rubel T, Karczmarski J, Goryca K, Dadlez M, Ostrowski J (2011) Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Functional & integrative genomics* 11 (2): 215–224
119. Page R, Morris C, Williams J, Ruhland Cv, Malik AN (1997) Isolation of Diabetes-Associated Kidney Genes Using Differential Display. *Biochemical and biophysical research communications* 232 (1): 49–53
120. Malik AN, Rossios C, Al-Kafaji G, Shah A, Page RA (2007) Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochemical and biophysical research communications* 357 (1): 237–244
121. Chen X, Li X, Wang P, Liu Y, Zhang Z, Zhao G *et al.* (2010) Novel Association Strategy with Copy Number Variation for Identifying New Risk Loci of Human Diseases. *PloS one* 5 (8): e12185
122. Jakobs H (2014) Studien zur Verknüpfung der mitochondrialen Amidoxim reduzierenden Komponente (mARC) mit dem Energiestoffwechsel. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
123. Neve EPA, Köfeler H, Hendriks DFG, Nordling A, Gogvadze V, Mkrtchian S, Näslund E, Ingelman-Sundberg M (2015) Expression and Function of mARC. Roles in Lipogenesis and Metabolic Activation of Ximelagatran. *PloS one* 10 (9): e0138487
124. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M *et al.* (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466 (7307): 707–713
125. Aslibekyan S, Goodarzi MO, Frazier-Wood AC, Yan X, Irvin MR, Kim E *et al.* (2012) Variants identified in a GWAS meta-analysis for blood lipids are associated with the lipid response to fenofibrate. *PloS one* 7 (10): e48663
126. Jakobs HH, Mikula M, Havemeyer A, Strzalkowska A, Borowa-Chmielak M, Dzwonek A, Gajewska M, Hennig EE, Ostrowski J, Clement B (2014) The *N*-reductive system composed of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b5 (CYB5B) and cytochrome b5 reductase (CYB5R) is regulated by fasting and high fat diet in mice. *PloS one* 9 (8): e105371

127. Koscielny G, Yaikhom G, Iyer V, Meehan TF, Morgan H, Atienza-Herrero J *et al.* (2014) The International Mouse Phenotyping Consortium Web Portal, a unified point of access for knockout mice and related phenotyping data. *Nucleic acids research* 42 (Database issue): D802-D809
128. Meier A (2016) Einfluss des mARC2-Knockouts auf die Reduktion *N*-hydroxylierter Strukturen. Masterarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
129. Rixen S (2017) Einfluss des mARC2-Knockouts auf den *N*-reduktiven Metabolismus. Masterarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
130. Nicholson JK und Wilson ID (1989) High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 21 (4-5): 449–501
131. Abeling NGGM, van Gennip AH, Bakker HD, Heerschap A, Engelke U, Wevers RA (1995) Diagnosis of a new case of trimethylaminuria using direct proton NMR spectroscopy of urine. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 18 (2): 182–184
132. Gibb SW, Wood JW, Fauzi R, Mantoura C (1995) Automation of flow injection gas diffusion-ion chromatography for the nanomolar determination of methylamines and ammonia in seawater and atmospheric samples. *Journal of Automatic Chemistry* 17 (6): 205–212
133. Wills RBH, Silalahi J, Wootton M (1987) Simultaneous Determination of Food-Related Amines by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 10 (14): 3183–3191
134. Zhu Y, Jameson E, Crosatti M, Schäfer H, Rajakumar K, Bugg TDH, Chen Y (2014) Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (11): 4268-4273
135. Erupe ME, Liberman-Martin A, Silva PJ, Malloy QGJ, Yonis N, Cocker DR, Purvis-Roberts KL (2010) Determination of methylamines and trimethylamine-*N*-oxide in particulate matter by non-suppressed ion chromatography. *Journal of Chromatography A* 1217 (13): 2070–2073
136. Tjoa S and Fennessey P (1991) The Identification of Trimethylamine Excess in Man: Quantitative Analysis and Biochemical Origins. *Analytical Biochemistry* (197): 77–82
137. Nnane IP und Damani LA (2001) Pharmacokinetics of trimethylamine in rats, including the effects of a synthetic diet. *Xenobiotica* 31 (10): 749–755
138. Mamer OA, Choinière L, Treacy EP (1999) Measurement of Trimethylamine and Trimethylamine *N*-Oxide Independently in Urine by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 276 (1): 144–149

139. Mamer OA, Choinière L, Lesimple A (2010) Measurement of urinary trimethylamine and trimethylamine oxide by direct infusion electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 406 (1): 80–82
140. Soderquist JA, Anderson CL (1986) Crystalline Anhydrous Trimethylamine *N*-Oxide. *Tetrahedron Letters* 27 (34): 3961–3962
141. Hansch C, Leo A, Hoekman D (1995) Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society, Washington, DC
142. Godfrey AG und Ganem B (1990) Ready oxidation of halides to aldehydes using trimethylamine *N*-oxide in dimethylsulfoxide. *Tetrahedron Letters* 31 (34): 4825–4826
143. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76–85
144. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* (227): 680–685
145. Clement B, Mau S, Deters S, Havemeyer A (2005) Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 (1- (2s) -2-4- (hydroxyamino)iminomethylbenzoylamino-1-oxopropyl-4-piperidinyloxy-acetic acid). *Drug metabolism and disposition* 33 (11): 1740–1747
146. Froriep D (2013) Reduktion *N*-oxygenierter Verbindungen durch die mitochondriale Amidoxim Reduzierende Komponente (mARC). Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
147. Mulrooney SB und Waskell L (2000) High-level expression in *Escherichia coli* and purification of the membrane-bound form of cytochrome *b*₅. *Protein expression and purification* 19 (1): 173–178
148. Plitzko B (2010) Optimierung der in-vitro Rekonstitution des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
149. Estabrook RW und Werringloer J (1978) The Measurement of Difference Spectra: Application to the Cytochromes of Microsomes. *Methods in enzymology* (52): 212–220
150. Whitby LG (1953) A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochemical Journal* 54 (3): 437–442
151. Schwering U (2010) Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

152. GE Analytical Instruments (2010) Sievers Nitric Oxide Analyzer NOA 280i: Operation and Maintenance Manual
153. Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* 327 (5962): 167
154. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471 (7340): 602–607
155. Thomas Winckler (2017) Genom-Editierung mit dem CRISPR-Cas9-System. *Pharmakon* 5 (4): 249–257
156. Le Cong, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N *et al.* (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339 (6121): 819
157. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8 (11): 2281–2308
158. Zhang Lab (2017) CRISPR Design Tool. <http://crispr.mit.edu/>
159. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino A *et al.* (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154 (6): 1380–1389
160. Heianza Y, Ma W, Manson JE, Rexrode KM, Qi L (2017) Gut Microbiota Metabolites and Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death. A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Journal of the American Heart Association* 6 (7)
161. Indorf P (2017) Dissertation in Vorbereitung, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
162. Kalimuthu P, Havemeyer A, Clement B, Kubitzka C, Scheidig AJ, Bernhardt PV (2017) Human mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). An electrochemical method for identifying new substrates and inhibitors. *Electrochemistry Communications* 84 (Supplement C): 90–93
163. Wiechmann M (1997a) Grenzen und Möglichkeiten bei der Analytik mit Dansylchlorid I. Reaktion von aromatischen Sulfonylchloriden mit aliphatischen tertiären Aminen: Der Hinsberg-Test* unter mikroanalytischen Gesichtspunkten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 358: 967–980
164. Wiechmann M (1997b) Grenzen und Möglichkeiten bei der Analytik mit Dansylchlorid II. Bildung von sekundären Dansylaminen bei der Reaktion von Dansylchlorid mit N-Oxiden aliphatischer tertiärer Amino-Verbindungen analog der Polonovski-Reaktion. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 358: 981–984

165. Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ (1978) Establishment and Characterization of Three New Continuous Cell Lines Derived from Human Breast Carcinomas. *Cancer Research* 38 (10): 3352
166. Baravalle R, Di Nardo G, Bandino A, Barone I, Catalano S, Andò S, Gilardi G (2017) Impact of R264C and R264H polymorphisms in human aromatase function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 167 (Supplement C): 23–32
167. Patel S (2017) Disruption of aromatase homeostasis as the cause of a multiplicity of ailments. A comprehensive review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 168 (Supplement C): 19–25, und darin enthaltene Literatur
168. Krebs JF, Fierke CA, Alexander RS, Christianson DW (1991) Conformational mobility of His-64 in the Thr-200 → Ser mutant of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry* 30 (38): 9153–9160
169. Krebs JF, Ippolito JA, Christianson DW, Fierke CA (1993) Structural and Functional Importance of a Conserved Hydrogen Bond Network in Human Carbonic Anhydrase II. *The Journal of biological chemistry* 268 (36): 27458–27466
170. Abdel-Aziz AAM, Angeli A, El-Azab AS, Abu El-Enin MA, Supuran CT (2017) Synthesis and biological evaluation of cyclic imides incorporating benzenesulfonamide moieties as carbonic anhydrase I, II, IV and IX inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25 (5): 1666–1671, und darin enthaltene Literatur
171. Yeung CK, Adman ET, Rettie AE (2007) Functional characterization of genetic variants of human FMO3 associated with trimethylaminuria. *Archives of biochemistry and biophysics* 464 (2): 251–259
172. The Human Protein Atlas (2017) Tissue expression of FMO3. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000007933-FMO3/tissue>
173. The Human Protein Atlas (2017) Tissue expression of mARC1. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000186205-MARC1/tissue>
174. The Human Protein Atlas (2017) Knowledge-based annotation. <https://www.proteinatlas.org/about/assays+annotation#ihk>
175. UniProt Knowledgebase (2017) UniProtKB - P31513 (FMO3_HUMAN). <http://www.uniprot.org/uniprot/P31513>
176. Clement B, Weide M, Ziegler DM (1996) Inhibition of Purified and Membrane-Bound Flavin-Containing Monooxygenase 1 by (N,N-Dimethylamino)stilbene Carboxylates. *Chemical research in toxicology* 9 (3): 599–604

177. Shimizu M, Shiraishi A, Sato A, Nagashima S, Yamazaki H (2015) Potential for drug interactions mediated by polymorphic flavin-containing monooxygenase 3 in human livers. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 30 (1): 70–74
178. Wang Z, Levison BS, Hazen JE, Donahue L, Li X-M, Hazen SL (2014) Measurement of trimethylamine-*N*-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 455: 35–40
179. Engel LW, Young NA (1978) Human Breast Carcinoma Cells in Continuous Culture. A Review. *Cancer Research* 38 (11 Part 2): 4327
180. Hermey G (2011) Der Experimentator. Neurowissenschaften. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
181. Pećina-Šlaus N (2003) Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International* 3: 1-7, und darin enthaltene Literatur
182. Researchgate Zellwachstum von ZR-75-1 Zellen. https://www.researchgate.net/post/My_ZR-75-1_breast_cancer_cell_line_grows_very_very_slowly_does_anyone_have_experience_with_this_cell_line
183. Chanda R, Ganguly AK (1988) Polyamines in relation to human breast, rectal and squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 39 (3): 311–318
184. Singh R, Pervin S, Wu G, Chaudhuri G. (2001) Activation of caspase-3 activity and apoptosis in MDA-MB-468 cells by *N*^ω-hydroxy-L-arginine, an inhibitor of arginase, is not solely dependent on reduction in intracellular polyamines. *Carcinogenesis* 22 (11): 1863–1869
185. Singh R, Pervin S, Wu G, Chaudhuri G (2001) Activation of caspase-3 activity and apoptosis in MDA-MB-468 cells by *N*^ω-hydroxy-L-arginine, an inhibitor of arginase, is not solely dependent on reduction in intracellular polyamines. *Carcinogenesis* 22 (11): 1863–1869
186. Delage B, Fennell DA, Nicholson L, McNeish I, Lemoine NR, Crook T, Szlosarek PW (2010) Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *International journal of cancer* 126 (12): 2762–2772
187. Bauer PM, Fukuto JM, Buga GM, Pegg AE, Ignarro LJ (1999) Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase by S-nitrosylation. *Biochemical and biophysical research communications* 262 (2): 355–358

188. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G (2000) Arginase Activity in Human Breast Cancer Cell Lines: N^ω-Hydroxy-L-arginine Selectively Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in MDA-MB-468 Cells. *Cancer Research* 60: 3305–3312
189. Mayr S (2017) CRISPR/Cas mit HEK-293 Zellen. persönliches Gespräch auf der MoTEC 2017 sowie E-mailkorrespondenz
190. Lackner DH, Carré A, Guzzardo PM, Banning C, Mangena R, Henley T *et al.* (2015) A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nature communications* 6: 10237
191. Eroglu E, Gottschalk B, Charoensin S, Blass S, Bischof H, Rost R *et al.* (2016) Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. *Nature communications* 7: 10623
192. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D *et al.* (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16): 6062–6067
193. Lattin JE, Schroder K, Su AI, Walker JR, Zhang J, Wiltshire T *et al.* (2008) Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome Research* 4: 5
194. The Human Protein Atlas (2017) Tissue expression of mARC2. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000117791-MARC2/tissue>

ANHANG

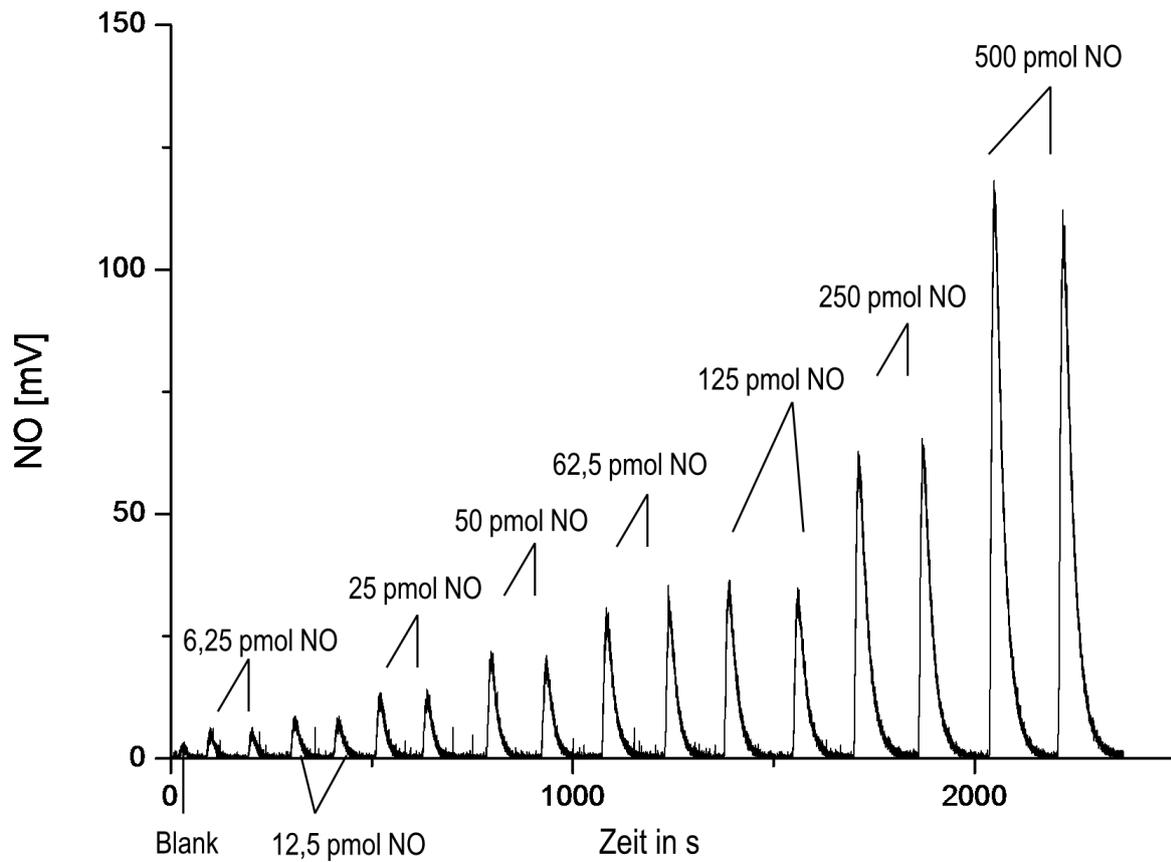


Abbildung I: Kalibrierungskurve des NO-Analyzers mittels Umsetzung von Kaliumiodid und Kaliumnitrit in schwefelsaurer Lösung

Die Vermessung sowie Erstellung der Abbildung wurden im Arbeitskreis Schwarz, Universität Köln, durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. (Detektionsgrenze: 1,2 mV; Bestimmungsgrenze: 4,0 mV)

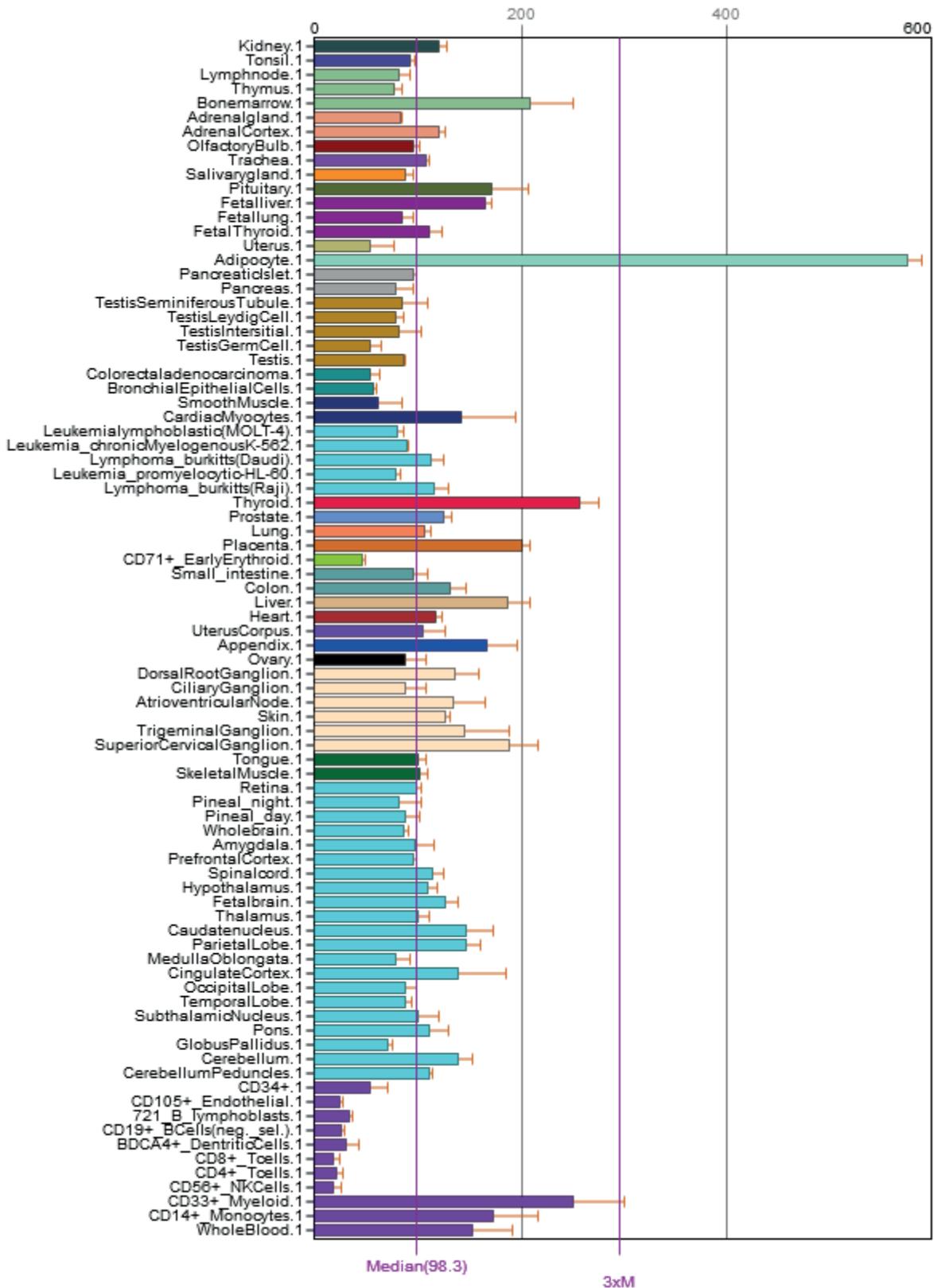


Abbildung II: mARC1 Genexpression humaner Gewebe

<http://biogps.org/gene/64757>. Datenset aus Su *et al.* [192]

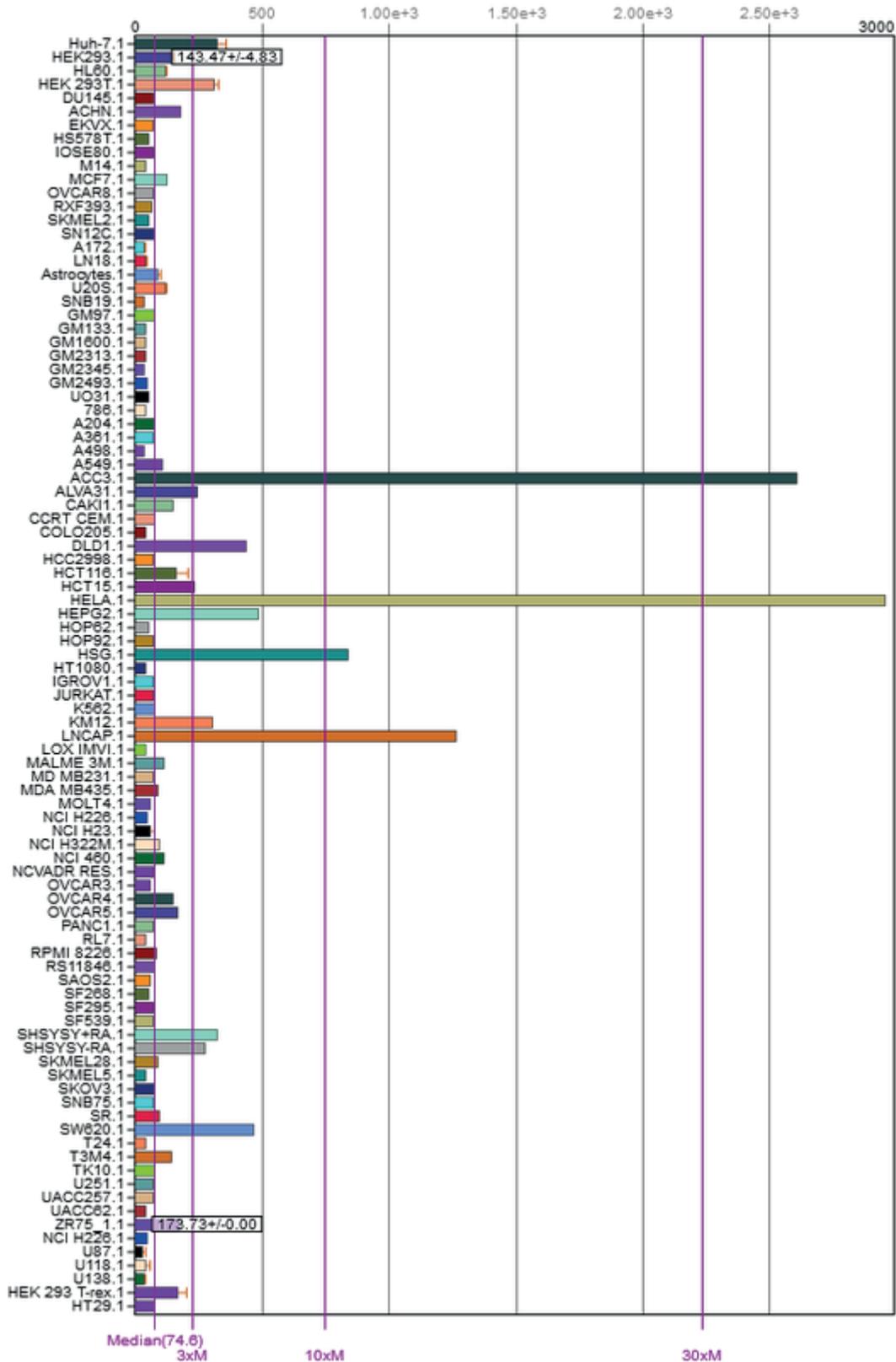


Abbildung III: mARC1 Genexpression humaner NCI60 Zelllinien

<http://biogps.org/gene/64757>. Die in dieser Arbeit verwendeten ZR-75-1 Zellen sowie die diskutierten HEK-293 Zellen sind markiert. Datenset aus Su *et al.* [192]

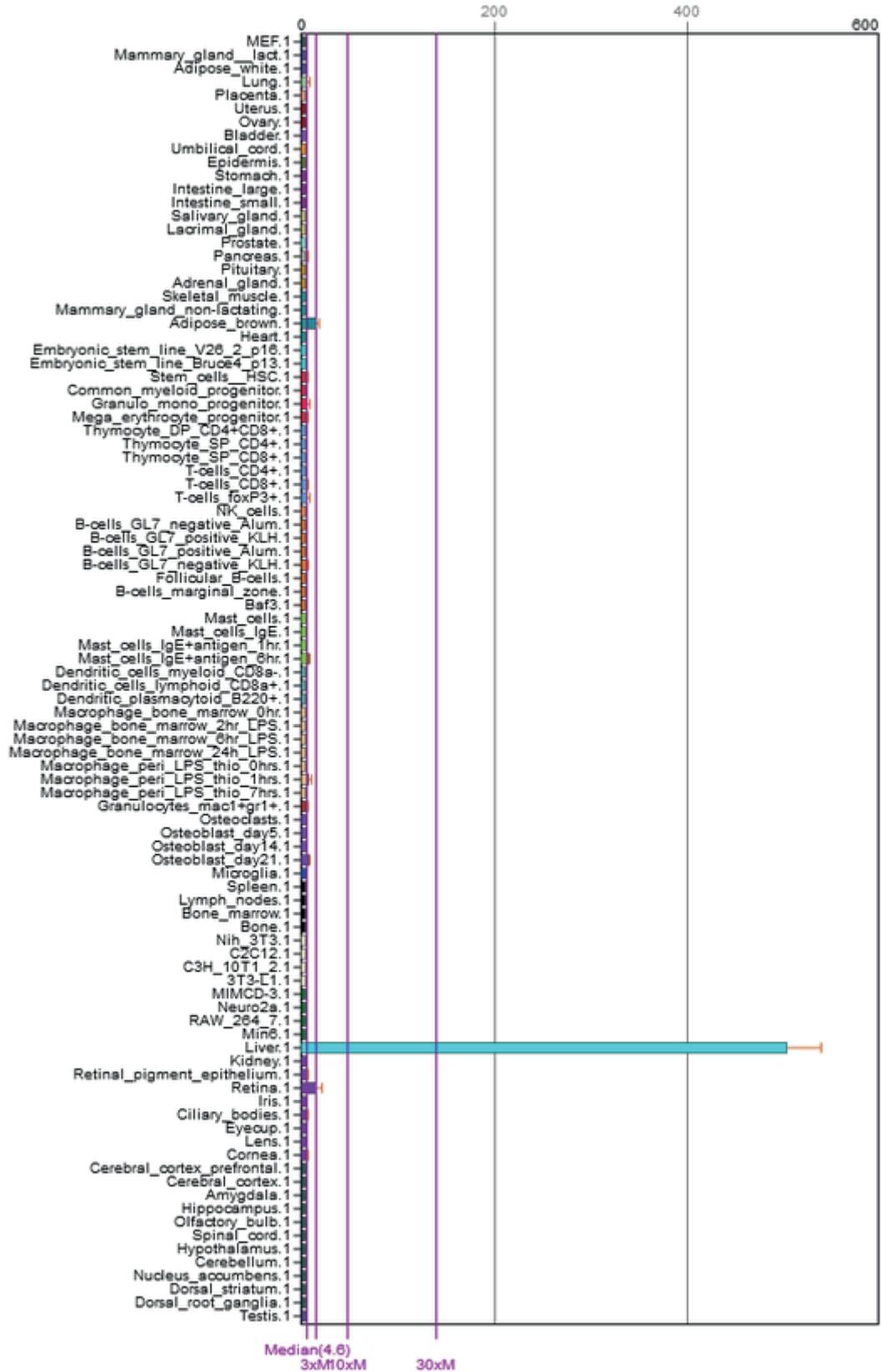


Abbildung IV: mARC1 Genexpression muriner Gewebe und Zelllinien

<http://biogps.org/gene/64757>. Datenset aus Lattin *et al.* [193]

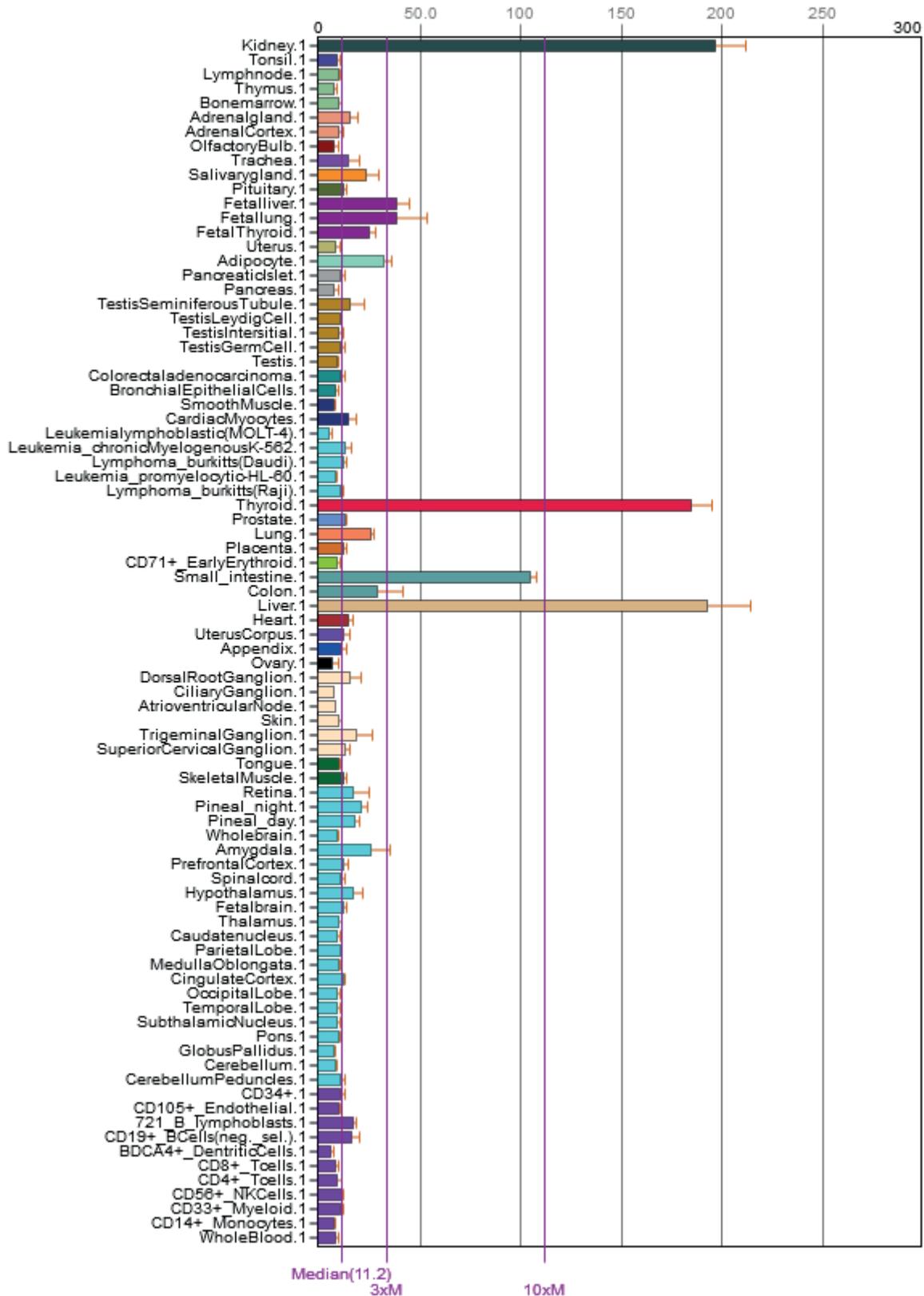


Abbildung V: mARC2 Genexpression humaner Gewebe

<http://biogps.org/gene/54996>. Datenset aus Su *et al.* [192]

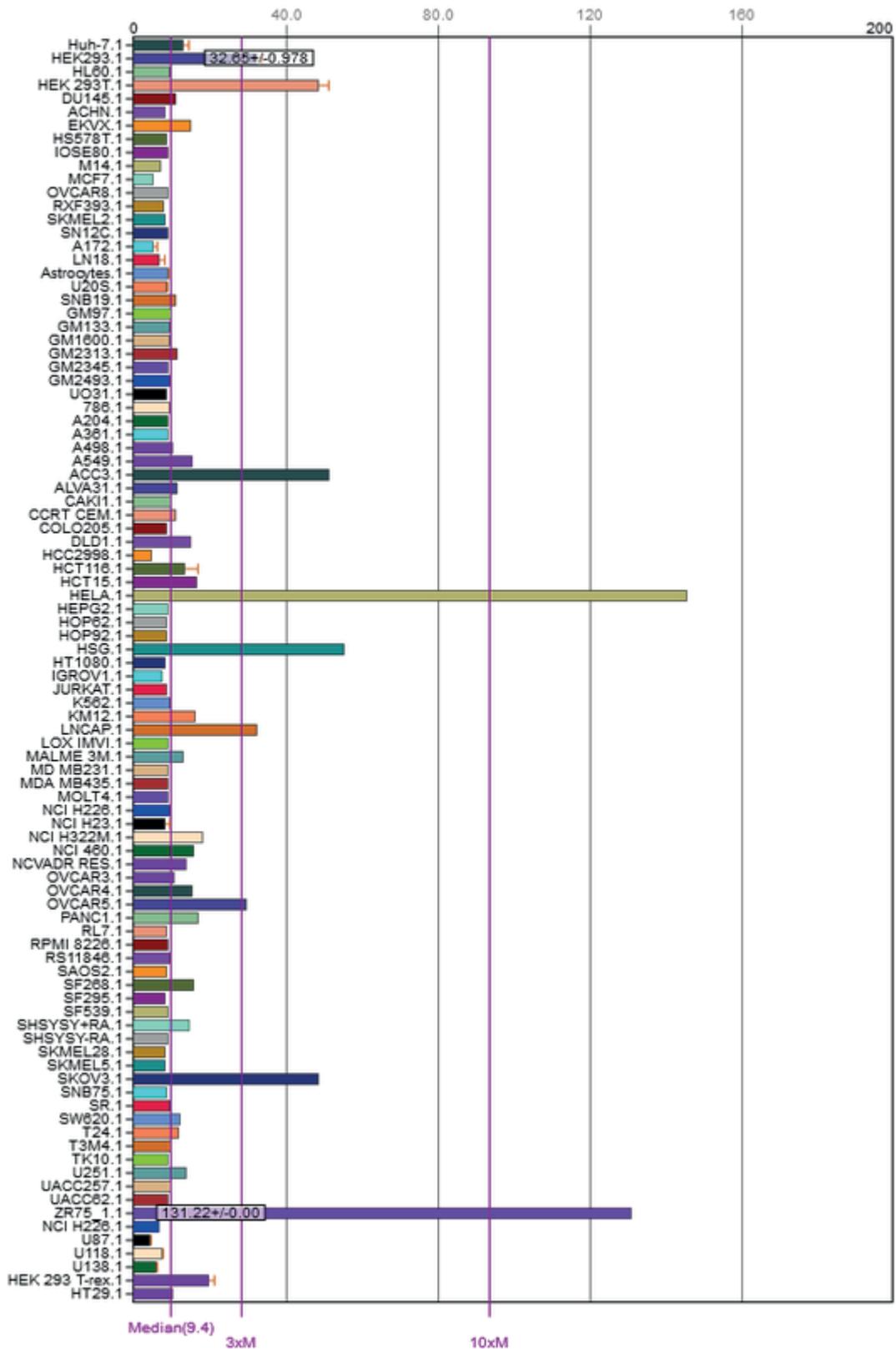


Abbildung VI: mARC2 Genexpression humaner NCI60 Zelllinien

<http://biogps.org/gene/54996>. Die in dieser Arbeit verwendeten ZR-75-1 Zellen sowie die diskutierten HEK-293 Zellen sind markiert. Datenset aus Su *et al.* [192]

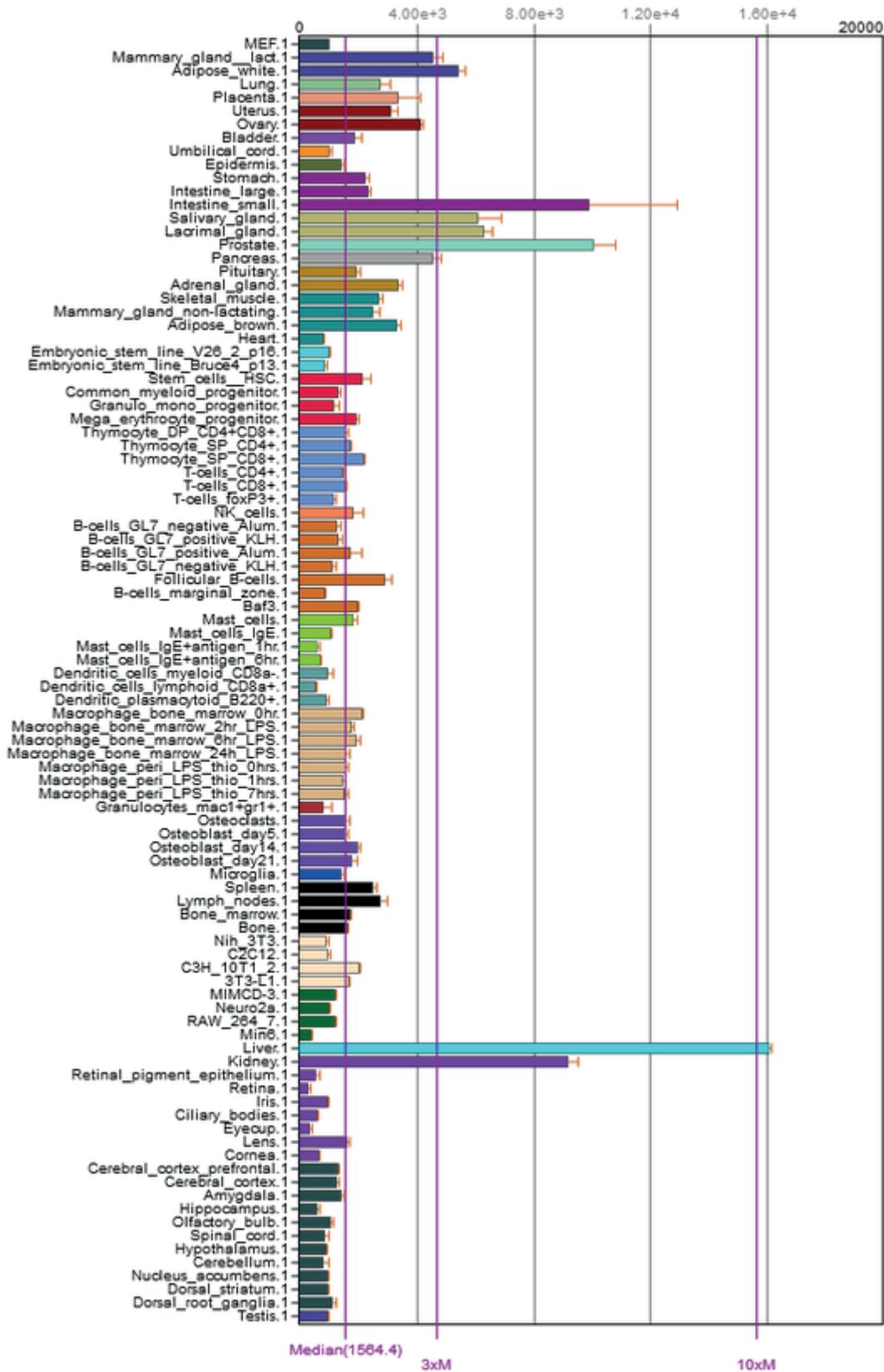


Abbildung VII: mARC2 Genexpression muriner Gewebe und Zelllinien

<http://biogps.org/gene/54996>. Datenset aus Lattin *et al.* [193]

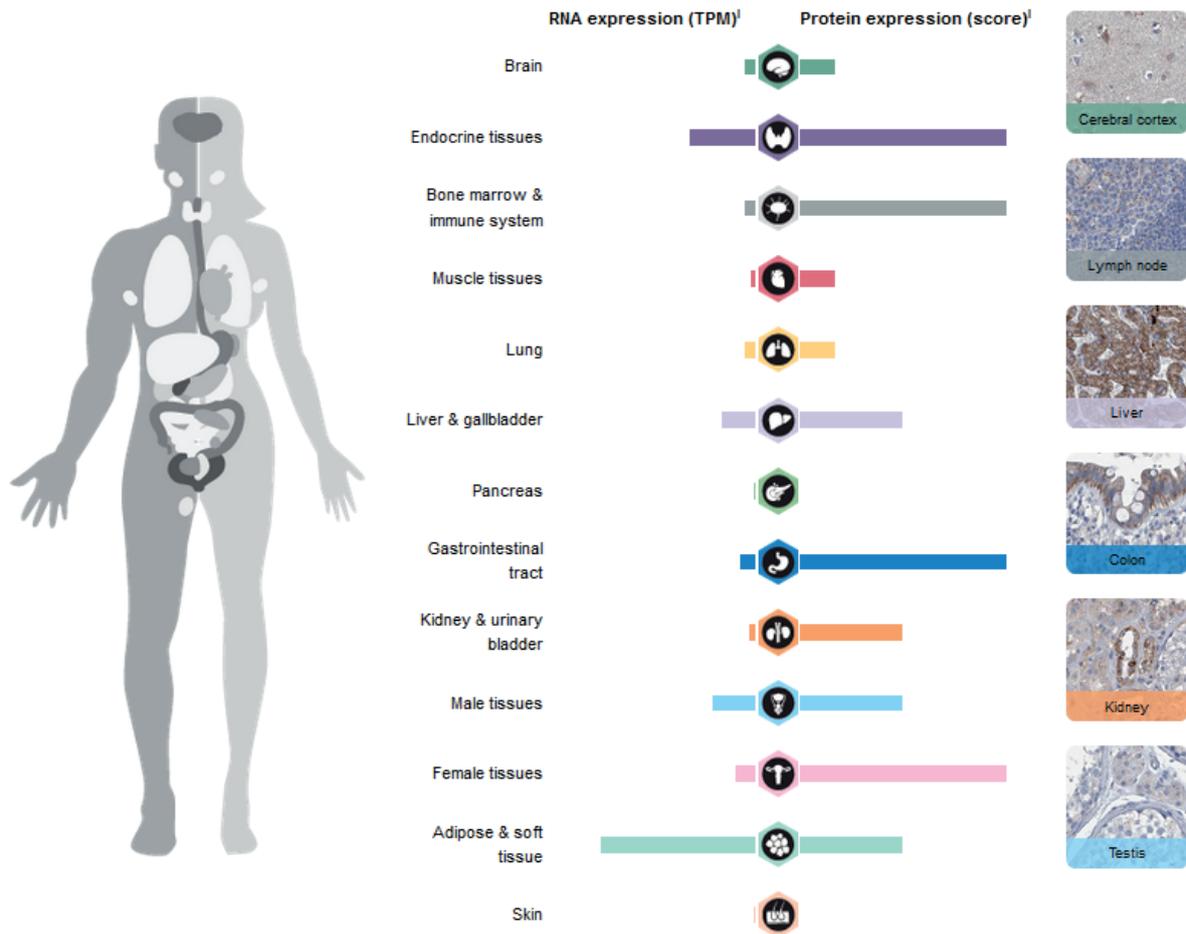


Abbildung VIII: Expressionsmuster von mARC1

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186205-MARC1/tissue>. [173] [172] Die untersuchten Gewebe wurden an Hand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt. Die Balken der RNA-Expression geben den jeweils höchsten gefundenen Wert für die RNA-Expression einer jeweiligen Gruppe in *transcripts per million* (TPM) an. Die Balken der Protein-Expression zeigen den jeweils höchsten gefundenen Wert für die Protein-Expression einer jeweiligen Gruppe als Punktzahl (*score*). Der *score* wird aus einer Evaluierung von immunohistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, RNA-Sequenzdaten und Protein-/Gencharakteristika erstellt. [174] Rechts sind Bilder ausgewählter, angefärbter Gewebe zu sehen.

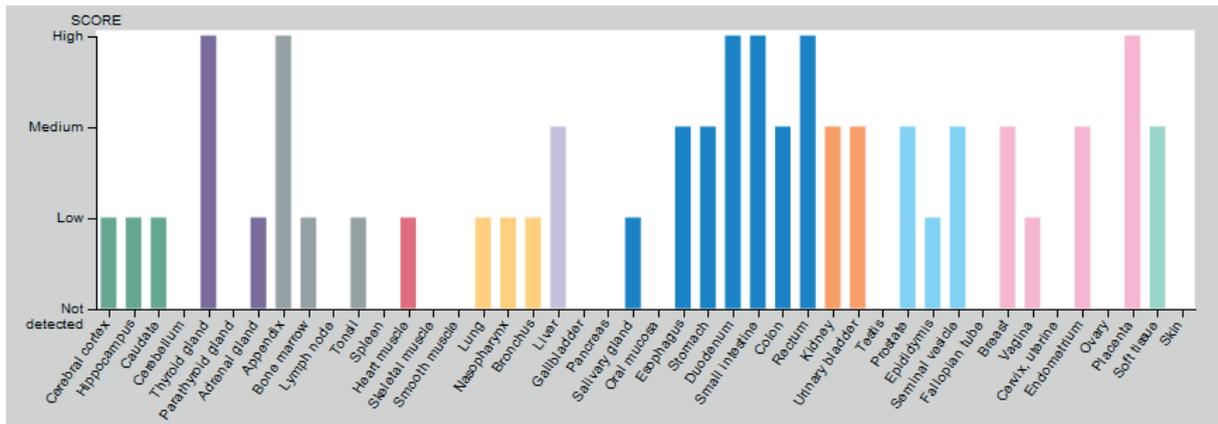


Abbildung IX: Proteinexpressionsübersicht von MARC1

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186205-MARC1/tissue>. [173] Die untersuchten Gewebe wurden an Hand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt und werden durch entsprechende Farben dargestellt (s. für die Farbzunordnung Abbildung VII). Die Balken der Protein-Expression zeigen den jeweils höchsten gefundenen Wert für die Protein-Expression einer jeweiligen Gruppe als Punktzahl (score). Der score wird aus einer Evaluierung von immunohistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, RNA-Sequenzdaten und Protein-/Gencharakteristika erstellt. [174] Ergab die Evaluierung unklare Ergebnisse, wird keine Proteinexpression in der Übersicht angezeigt.[172]

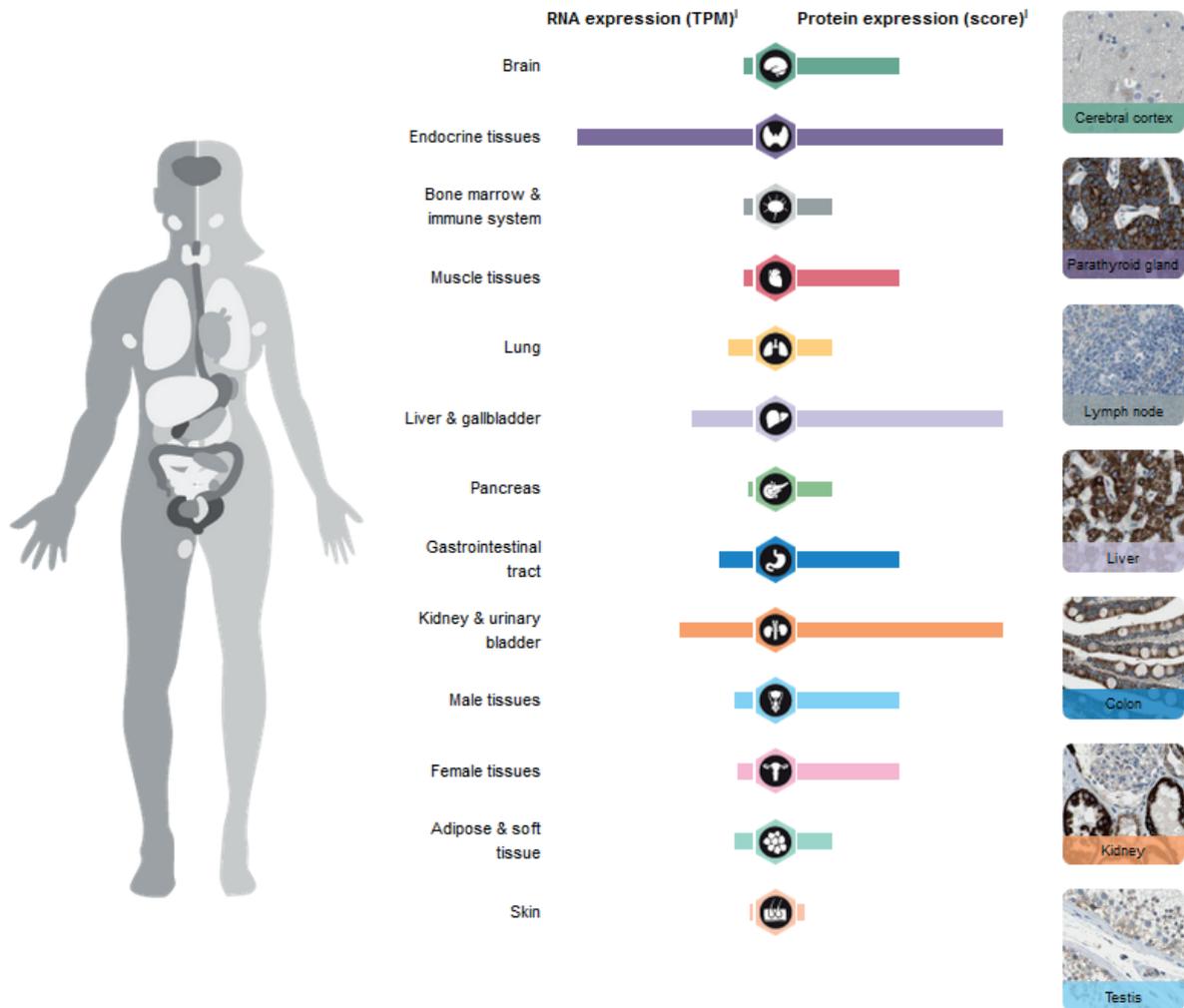


Abbildung X: Expressionsmuster von mARC2

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000117791-MARC2/tissue>. [194] [172] Die untersuchten Gewebe wurden an Hand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt. Die Balken der RNA-Expression geben den jeweils höchsten gefundenen Wert für die RNA-Expression einer jeweiligen Gruppe in *transcripts per million* (TPM) an. Die Balken der Protein-Expression zeigen den jeweils höchsten gefundenen Wert für die Protein-Expression einer jeweiligen Gruppe als Punktzahl (*score*). Der *score* wird aus einer Evaluierung von immunohistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, RNA-Sequenzdaten und Protein-/Gencharakteristika erstellt. [174] Rechts sind Bilder ausgewählter, angefärbter Gewebe zu sehen.

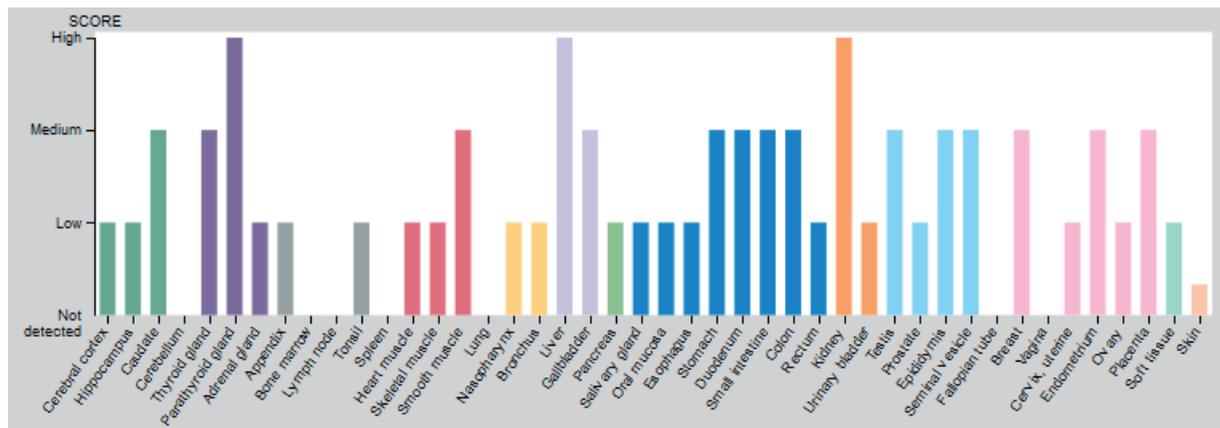


Abbildung XI: Proteinexpressionsübersicht von MARC2

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000117791-MARC2/tissue>. [194][172] Die untersuchten Gewebe wurden an Hand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt und werden durch entsprechende Farben dargestellt (s. für die Farbzuoordnung Abbildung IX). Die Balken der Protein-Expression zeigen den jeweils höchsten gefundenen Wert für die Protein-Expression einer jeweiligen Gruppe als Punktzahl (score). Der score wird aus einer Evaluierung von immunohistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, RNA-Sequenzdaten und Protein-/Gencharakteristika erstellt. [174] Ergab die Evaluierung unklare Ergebnisse, wird keine Proteinexpression in der Übersicht angezeigt.

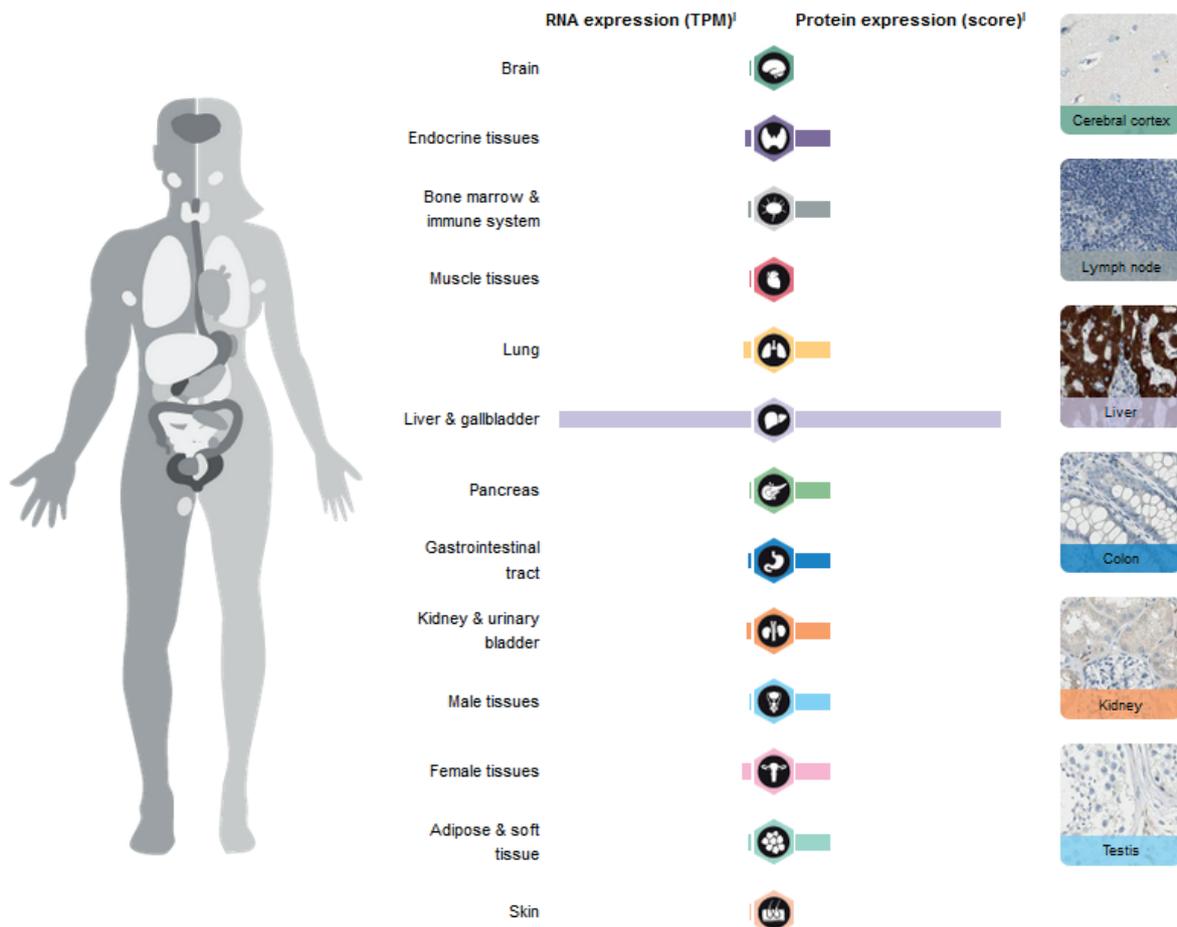


Abbildung XII: Expressionsmuster von FMO3

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007933-FMO3/tissue>. [172] Die untersuchten Gewebe wurden an Hand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt. Die Balken der RNA-Expression geben den jeweils höchsten gefundenen Wert für die RNA-Expression einer jeweiligen Gruppe in *transcripts per million* (TPM) an. Die Balken der Protein-Expression zeigen den jeweils höchsten gefundenen Wert für die Protein-Expression einer jeweiligen Gruppe als Punktzahl (*score*). Der *score* wird aus einer Evaluierung von immunohistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, RNA-Sequenzdaten und Protein-/Gencharakteristika erstellt. [174] Rechts sind Bilder ausgewählter, angefärbter Gewebe zu sehen.

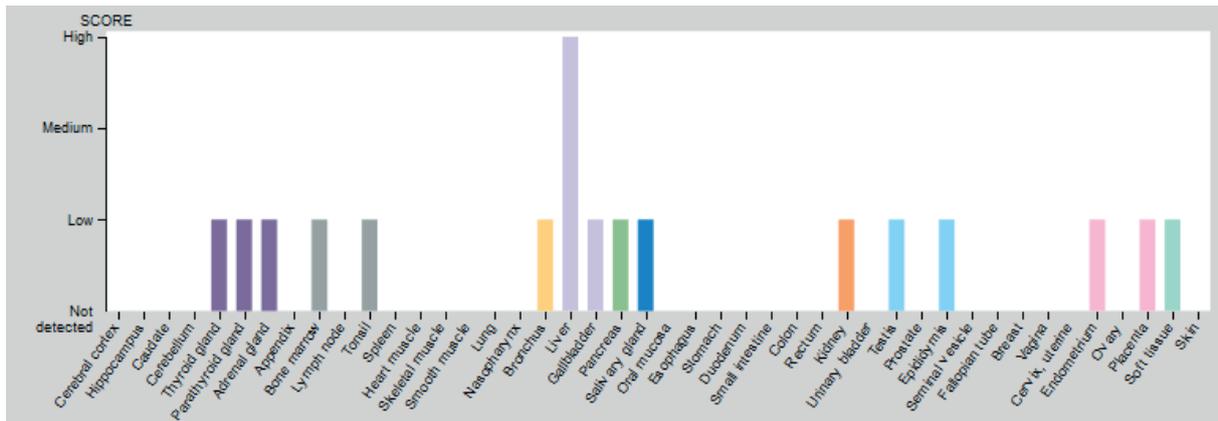


Abbildung XIII: Proteinexpressionsübersicht von FMO3

<https://www.proteinatlas.org/ENSG0000007933-FMO3/tissue>. [172] Die untersuchten Gewebe wurden an Hand ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt und werden durch entsprechende Farben dargestellt (s. für die Farbuordnung Abbildung XI). Die Balken der Protein-Expression zeigen den jeweils höchsten gefundenen Wert für die Protein-Expression einer jeweiligen Gruppe als Punktzahl (score). Der score wird aus einer Evaluierung von immunohistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern, RNA-Sequenzdaten und Protein-/Gencharakteristika erstellt. [174] Ergab die Evaluierung unklare Ergebnisse, wird keine Proteinexpression in der Übersicht angezeigt.

ERKLÄRUNG ZU §7 UND §8 DER PROMOTIONSORDNUNG

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

Teile dieser Arbeit sind bereits vorab wie folgt veröffentlicht worden:

Publikationen:

Schneider J, Girreser U, Havemeyer A, Bittner F, Clement B. (2017) Detoxification of Trimethylamine *N*-oxide by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component mARC, *Chemical Research in Toxicology* (submitted)

Tagungsbeiträge:

Schneider J, Girreser U, Havemeyer A, Clement B. (2015) TMAO as a potential substrate for mARC. *Posterpräsentation, Frontiers in Medicinal Chemistry*, Marburg

Schneider J, Girreser U, Clement B. (2015) The mitochondrial amidoxime reducing component and its potential role in prevention of cardiovascular disease. *Posterpräsentation und Vortrag, Molybdenum and Tungsten Enzymes Conference*, Balatonfüred, Ungarn

Schneider J, Girreser U, Clement B. (2015) The mitochondrial amidoxime reducing component and its potential role in prevention of cardiovascular disease. *Posterpräsentation, DPhG Jahrestagung*, Düsseldorf

Schneider J; Girreser U; Havemeyer ; Tyl-Bielicka A; Pysniak K; Ramotowska E; Mikula M; Clement B. (2016) The molybdoenzyme mARC detoxifies trimethylamine *N*-oxide, a risk factor for cardiovascular disease. *Posterpräsentation, EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry*, Manchester, Großbritannien

Schneider J; Girreser U; Havemeyer ; Tyl-Bielicka A; Pysniak K; Ramotowska E; Mikula M; Clement B. (2016) The molybdoenzyme mARC detoxifies trimethylamine *N*-oxide, a risk factor for cardiovascular disease. *Posterpräsentation, DPhG Jahrestagung*, München

Schneider J; Girreser U; Havemeyer ; Tyl-Bielicka A; Pysniak K; Ramotowska E; Mikula M; Clement B. (2016) The molybdoenzyme mARC detoxifies trimethylamine *N*-oxide, a risk factor for cardiovascular disease. *Posterpräsentation, Life Sciences Student Conference*, Kiel

Schneider J; Girreser U; Havemeyer ; Tyl-Bielicka A; Pysniak K; Ramotowska E; Mikula M; Clement B. (2017) The molybdoenzyme mARC detoxifies trimethylamine *N*-oxide, a risk factor for cardiovascular disease. *Posterpräsentation und Kurzvortrag, DPhG Doktorandentagung, Frankfurt am Main*

Schneider J; Girreser U; Havemeyer ; Tyl-Bielicka A; Pysniak K; Ramotowska E; Mikula M; Clement B. (2017) The molybdoenzyme mARC detoxifies trimethylamine *N*-oxide, a risk factor for cardiovascular disease. *Posterpräsentation und Vortrag, Molybdenum and Tungsten Enzymes Conference, Santa Fe, NM, USA*

Schneider J; Girreser U; Havemeyer ; Tyl-Bielicka A; Pysniak K; Ramotowska E; Mikula M; Clement B. (2017) The molybdoenzyme mARC detoxifies trimethylamine *N*-oxide, a risk factor for cardiovascular disease. *Posterpräsentation, European ISSX Meeting, Köln*

Rixen S, Schneider J, Havemeyer A, Tyl-Bielicka A; Pysniak K; Ramotowska E, Mikula M, Clement B. (2017) Murine knockout studies confirm the involvement of the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) in *N*-reductive metabolism. *Posterpräsentation, DPhG Jahrestagung, Saarbrücken*

Ort, Datum

Jennifer Schneider

DANKSAGUNG

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

PROF. DR. BERND CLEMENT.

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater herzlich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Forschungsthemas verknüpft mit der Freiheit bei der Gestaltung sowie die Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze danke ich für wertvolle Ratschläge in den mARC- und Forschungsgruppensitzungen.

Dr. Ulrich Girreser danke ich herzlich für die Betreuung, die er mir insbesondere während der analytischen Methodenentwicklung zukommen ließ, und die darüber hinaus durch stete Diskussionsbereitschaft, Fachkompetenz, Ehrlichkeit und die nötige Portion Humor gekennzeichnet war.

Bei meinen Kooperationspartnern möchte ich mich bedanken: bei Dr. Florian Bittner (ehemals TU Braunschweig) für rege Diskussionen zu mARC; bei Hannah Lutterbeck und Prof. Dr. Hermann Bange (Geomar Kiel) für die Einführung in die NO-Analytik; bei Daniel Bender, Prof. Dr. Günter Schwarz und dem gesamten Arbeitskreis (Universität Köln) für rege Diskussionen auf Tagungen sowie die Arbeit am NO-Analyzer im Kölner Labor; bei Dr. Michal Mikula und seiner Arbeitsgruppe (Maria Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology in Warschau, Polen) für die gute Zusammenarbeit im KO-Mausprojekt; bei PD Dr. Dirk Schmidt-Arras (CAU Kiel) für die Einführung und Betreuung bei molekularbiologischen Arbeiten; bei Christian Kubitzka und Prof. Dr. Axel Scheidig für wertvolle Diskussionen und Ratschläge während der Forschungsgruppensitzungen sowie Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Dem gesamten Team danke ich für die Zusammenarbeit bei der Betreuung des sechsten Semesters, insbesondere meinen Co-Doktoranden Birte, Eva, Merle, Pascal, Helene, Carsten und Inken.

Julia, Rebecca, Antje, Dirk und Uli danke ich herzlich für das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit!

Während der Promotion habe ich zahlreiche schöne Momente in und auch außerhalb des Instituts erlebt, die ich meinen lieben Kollegen zu verdanken habe. Egal, wie frustrierend, stressig oder anstrengend die Forschungsarbeit manchmal war, ich habe mich in der Institutsfamilie immer sehr gut aufgehoben gefühlt. Und auch über Fortschritte und Erfolge konnten wir uns immer gemeinsam freuen. Aus Kollegen wurden Freunde - und die Freundschaften, die am Institut geschmiedet wurden, halten über die Promotionszeit hinaus. Dafür danke ich euch!

Stefan, Steffi und meinen drei bezaubernden Nichten danke ich für zahlreiche schöne Erlebnisse, die in meiner Erinnerung immer mit hellem Kinderlachen und Sonnenschein verbunden sind, ihr Verständnis für meinen oft vollen Terminkalender und ihre Unterstützung.

Bei Andreas möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er mich während der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt hat.

Rebecca danke ich von Herzen für die tolle gemeinsame Zeit, das Rücken-Frei-Halten während stressiger Phasen (von denen es viele gab) und die feierabendlichen Fachdiskussionen auf der Couch.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem Lebensweg immer bedingungslos unterstützt haben. Dafür danke ich euch sehr!

KURZFASSUNG

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) bildet zusammen mit den beiden Transportproteinen Cytochrom b_5 (Cyb5) und seiner NADH-abhängigen Cytochrom b_5 Reduktase (Cyb5R) ein *N*-reduktive Enzymsystem, das *in vitro* eine Vielzahl *N*-hydroxylierter und *N*-oxygenierter Verbindungen reduzieren kann. Alle bisher untersuchten Säugergenome enthalten zwei mARC-Gene, die für die beiden mARC-Proteine mARC1 und mARC2 kodieren. Da sie hochkonserviert sind, ist von einer essentiellen Funktion von mARC auszugehen. Durch die Reduktion von N^ω -Hydroxy-L-arginin (NOHA) konnte bereits im Vorfeld eine Beteiligung von mARC am Stickstoffmonoxid (NO)-Stoffwechsel und damit an einem kardiovaskulären Stoffwechselprozess postuliert werden. Es wurde nun untersucht, ob mARC die anaerobe Reduktion von Nitrit zu NO katalysieren kann. Dies konnte nicht bestätigt werden, eine klinisch relevante, mARC-abhängige NO-Freisetzung aus Nitrit ist daher in Frage zu stellen. Dies gilt auch für das aus Glyceroltrinitrat (GTN) entstehende Nitrit, dass durch Reduktion zu NO zur Wirkung des therapeutisch eingesetzten NO-Donators beiträgt. Eine direkte, mARC-abhängige GTN-Reduktion zu NO konnte ebenfalls nicht gezeigt werden.

Das mARC1-haltige Enzymsystem ist jedoch am Metabolismus der endogenen Verbindung Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) beteiligt, die in hohen Plasmakonzentrationen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (*cardiovascular diseases*, CVD) verursacht. Die mARC-vermittelte Reduktion konnte mit Hilfe einer neu entwickelten, empfindlichen und robusten Analytik unter Verwendung verschiedener, enzymatischer Testsysteme nachgewiesen werden. Damit wurde erstmals ein humanes Enzym identifiziert, dass TMAO zu seinem Vorläufer Trimethylamin (TMA) reduzieren kann. Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse, dass mARC durch Flavinhaltige Monooxygenasen (FMOs) entstandene Verbindungen entgiften kann. Bemerkenswert dabei ist, dass diese Reaktion ausschließlich durch mARC1, jedoch nicht durch mARC2 katalysiert wird. Diese Beobachtung ist allen bisher untersuchten *N*-Oxiden gemein und unterscheidet sie von allen anderen bekannten Substraten.

Ein mittels CRISPR/Cas durchgeführter hmARC1-Knockout (KO) in humanen ZR-75-1 Zellen führte zu einer Zellpopulation, die sowohl in ihrem Wachstum als auch in ihrer Morphologie verändert war. Der Erfolg des KOs konnte dennoch nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Daher steht eine weitere Charakterisierung nach Etablierung einer reinen, genotypisierten KO-Zellkultur noch aus.

ABSTRACT

The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) forms, together with the electron transport proteins cytochrome b_5 (Cyb5) and its NADH-dependent cytochrome b_5 reductase (Cyb5R), an *N*-reductive enzyme system, which reduces a vast variety of *N*-hydroxylated and *N*-oxygenated compounds *in vitro*. All hitherto investigated mammalian genomes harbour two genes that encode for the two mARC proteins, mARC1 and mARC2, respectively. As they are both highly conserved, an essential function of mARC is assumable. The reduction of *N*^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) led to the postulation of a participation of mARC in nitric oxide (NO) metabolism and thus in a cardiovascular metabolic pathway, beforehand. It was now investigated whether mARC catalyses the anaerobic reduction of nitrite to NO. Although being published earlier, the nitrite reduction was not reproducible, questioning a clinical relevant, mARC-dependent NO release of nitrite. This is also the case for nitrite originating from glycerol trinitrate (GTN), which contributes to the effect of the therapeutically used NO-donor by reduction to NO. A direct, mARC-dependent GTN reduction to NO could as well not be determined.

However, the mARC1-containing enzyme system contributes to the metabolism of the endogenous compound trimethylamine *N*-oxide (TMAO) that, in high plasma concentrations, causes an elevated risk for cardiovascular diseases (CVD). The mARC-dependent reduction was determined with a newly developed, sensitive and robust analytical method by using several enzymatic test systems. Thus, a human enzyme catalysing the reduction of TMAO to its precursor trimethylamine (TMA) was identified for the first time. Simultaneously, these results indicate that mARC is able to detoxify a metabolite emerging from flavin-containing monooxygenases (FMOs). Remarkably, this reaction is exclusively catalysed by mARC1, but not by mARC2. This observation is common throughout the so-far investigated *N*-oxides and distinguishes them from all other known substrates.

A hmARC1 knockout (KO) in human ZR-75-1 cells, conducted via CRISPR/Cas, resulted in a cell population that was altered in both growth and morphology. However, the successful KO was not unequivocally confirmed. Thus, further investigation with a pure and genotyped KO cell culture is still pending.