

**Entwicklung eines schnellen Assays zur Findung  
von Substraten und Inhibitoren der mitochondrialen  
Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC)**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Patrick Marcel Indorf**

Kiel 2020



Erster Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Tag der mündlichen Prüfung:

27.11.2020

Zum Druck genehmigt:

27.11.2020

Prof. Dr. Frank Kempken

(Dekan)



*Für meine Familie.*







**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Strukturformelverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biotransformation .....	1
1.2 Reduktionen in der Biotransformation .....	3
1.3 Molybdänhaltige Enzyme .....	4
1.3.1 Molybdän .....	4
1.3.2 Der Molybdän-Cofaktor .....	4
1.3.3 Xanthinoxidoreduktase .....	6
1.3.4 Aldehydoxidase .....	7
1.3.5 Sulfitoxidase .....	7
1.3.6 Nitratreduktase .....	8
1.3.7 Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) .....	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2 Geräte und Materialien .....</b>	<b>15</b>
2.1 Reagenzien .....	15
2.2 Materialien .....	17
2.3 Geräte .....	18
<b>3 Experimentelle Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Der NADH-Assay .....	19
3.1.1 Durchführung des NADH-Assays für Substratmessungen .....	19
3.1.2 Durchführung des NADH-Assays für Kinetikbestimmungen .....	20
3.1.3 Durchführung des NADH-Assays für Inhibitormessungen .....	20
3.1.4 Durchführung des NADH-Assays für 96-Well-Platten-Versuche .....	20
3.2 LC-MS-Analytik .....	22
3.3 Der Peroxidase-Assay .....	23
3.4 Sonstige Methoden .....	25

3.4.1	Prüfung auf Reinheit von Hydroxyharnstoff nach <i>Pharmacopoea Europaea</i> ...	25
3.4.2	Durchführung des Ammoniak-Assays .....	25
3.4.3	Bestimmung von Benzamidin via HPLC .....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse mit Diskussion.....</b>	<b>27</b>
4.1	Etablierung des NADH-Assays.....	27
4.1.1	Theoretische Grundlagen.....	27
4.1.2	Validierung des NADH-Assays.....	28
4.1.3	Untersuchung zum NADH Verbrauch ohne Substrat.....	29
4.1.4	Anaerober Verbrauch von NADH .....	30
4.2	Substrate/funktionelle Gruppen mit <i>N-O</i> -Bindung.....	31
4.2.1	Theoretische Grundlagen.....	31
4.2.2	Hydroxyharnstoff und Derivate .....	32
4.2.2.1	Einführung.....	32
4.2.2.2	Hydroxyharnstoff .....	32
4.2.2.3	Zileuton .....	36
4.2.3	<i>N</i> -Oxide.....	38
4.2.3.1	Einführung.....	38
4.2.3.2	Senecivernin- <i>N</i> -oxid.....	39
4.2.3.3	Resazurin.....	43
4.2.3.4	Amitriptylin- <i>N</i> -oxid und Nicotinamid- <i>N</i> -oxid .....	45
4.2.4	Amidoxime/Oxime .....	46
4.2.4.1	Einführung.....	46
4.2.4.2	Epacadostat .....	47
4.2.4.3	CM433 .....	49
4.2.4.4	disc-Substanzen.....	52
4.2.4.5	Obidoximchlorid und Pralidoximchlorid.....	55
4.2.4.6	Upamostat und Ximelagatran .....	56
4.2.5	Hydroxamsäuren.....	60
4.2.5.1	Einführung.....	60
4.2.5.2	Fosmidomycin und FR900098.....	61

---

4.2.5.3	Deferoxamin.....	63
4.2.6	Nitrosamine.....	64
4.2.6.1	Einführung.....	64
4.2.6.2	NNK.....	65
4.2.7	Hydroxylamin und <i>N</i> -hydroxylierte Nucleoside.....	66
4.2.7.1	Einführung.....	66
4.2.7.2	Hydroxylamin.....	67
4.2.7.3	<i>N</i> -hydroxylierte Nucleoside.....	69
4.2.8	Nitrit.....	70
4.2.8.1	Einführung.....	70
4.2.8.2	Ergebnisse.....	71
4.2.9	<i>N</i> - <i>O</i> -haltige Heterozyklen.....	75
4.2.9.1	Einführung.....	75
4.2.9.2	Isoxazole.....	76
4.3	Substrate/funktionelle Gruppen mit <i>O</i> - <i>O</i> -Bindung.....	76
4.3.1	Theoretische Grundlagen.....	76
4.3.2	Wasserstoffperoxid.....	79
4.3.3	Rolle von mARC in der zellulären Wasserstoffperoxidregulation.....	85
4.3.4	Organische Peroxide.....	87
4.4	Substrate/funktionelle Gruppen mit <i>S</i> - <i>O</i> - oder <i>S</i> - <i>N</i> -Bindung.....	88
4.4.1	Sulfoxide.....	88
4.4.2	Isothiazole.....	90
4.5	Substrate/funktionelle Gruppen mit <i>N</i> - <i>N</i> -Bindung.....	92
4.5.1	Azide und Hydrazine.....	92
4.6	Sonstige Substrate.....	97
4.6.1	Anorganische Substanzen.....	97
4.6.2	Organische Substanzen.....	98
4.7	Inhibitoren von mARC.....	98
4.7.1	Theoretische Grundlagen.....	98
4.7.2	<i>N</i> -Hydroxycarbamate als Inhibitoren von mARC1.....	100

4.7.3	Postulierter Mechanismus der Inhibition von mARC1 durch.....	
	..... <i>N</i> -Hydroxycarbamate .....	107
4.7.4	Inhibition von mARC durch anorganische Substanzen.....	109
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>111</b>
5.1	Substrate.....	111
5.2	Inhibitoren .....	119
5.3	Ausblick.....	120
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
	<b>Erklärung zu §8 der Promotionsordnung .....</b>	<b>141</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>142</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>144</b>
	<b>Kurzfassung .....</b>	<b>145</b>
	<b>Abstract .....</b>	<b>146</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

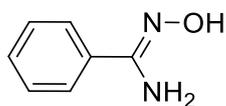
AO	Aldehydoxidase
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser ( <i>Aqua bidestillata</i> )
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CDK7	<i>candidate diabetes-associated kidney gene 7</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CYB5B	Cytochrom b <sub>5</sub> Typ b
CYB5R3	NADH-Cytochrom b <sub>5</sub> -Reduktase Isoform 3
CYP450	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase ( <i>fatty acid amide hydrolase</i> )
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FMO	Flavinhaltige Monooxygenasen
GC	Gaschromatographie
GDH	Glutamatdehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )

IMM	innere mitochondriale Membran ( <i>inner mitochondrial membrane</i> )
IMS	Intermembranraum ( <i>intermembrane space</i> )
IRIDA-Syndrom	Eisenrefraktäre Eisenmangelanämie ( <i>iron-refractory iron deficiency anemia</i> )
$K_{\text{eff}}$	Katalytische Effizienz definiert als $K_{\text{kat}}/K_{\text{m}}$
KCN	Kaliumcyanid
$K_{\text{kat}}$	Wechselzahl ( <i>turnover frequency</i> )
$K_{\text{i}}$	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
$K_{\text{m}}$	Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung ( <i>liquid chromatography–mass spectrometry</i> )
MAO	Monoaminoxidase
mARC	mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Moco	Molybdän-Cofaktor
MOSC	<i>Moco sulfurase C-terminal domain</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NF- $\kappa$ B	spezifischer Transkriptionsfaktor ( <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> )
NNK	Nikotin abgeleitetes Nitrosaminketon ( <i>nicotine-derived nitrosamine ketone</i> )
NR	Nitratreduktase

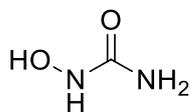
---

OMM	äußere mitochondriale Membran ( <i>outer mitochondrial membrane</i> )
PA	Pyrrolizidinalkaloide
PAM	Peptidylglycin- $\alpha$ -amidierende Monooxygenase
pH	dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration mit -1 multipliziert ( <i>potententia hydrogenii</i> )
phpa	4-Hydroxyphenylelessigsäure ( <i>4-Hydroxyphenylacetic acid</i> )
phpa Dimer	2-2'-Dihydroxybiphenyl-5,5'-Essigsäure ( <i>2,2'-dihydroxybiphenyl-5,5'-diacetat</i> )
pka	dekadischer Logarithmus der Säurekonstante mit -1 multipliziert
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
SMAP	2-Sulfamoylacetylphenol
SO	Sulfitoxidase
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
VIS	Sichtbares Licht ( <i>visible spectrum</i> )
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>world health organisation</i> )
XDH	Xanthindehydrogenase
ZNS	zentrales Nervensystem

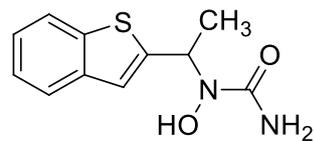
## Strukturformelverzeichnis



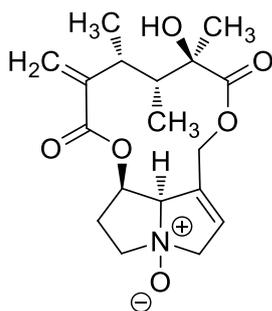
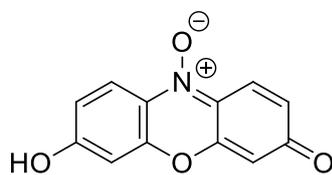
Benzamidoxim



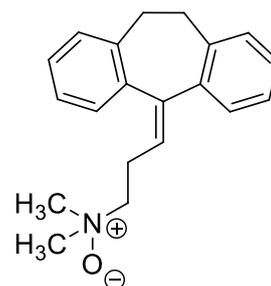
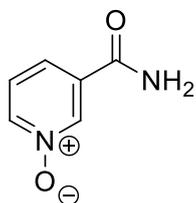
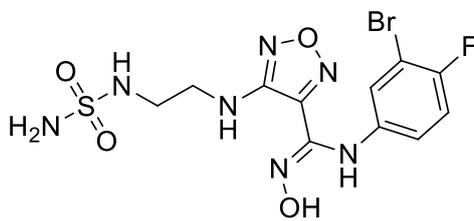
Hydroxyharnstoff



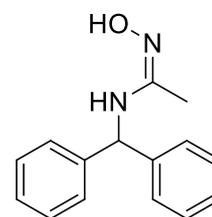
Zileuton

Senecivernin *N*-oxid

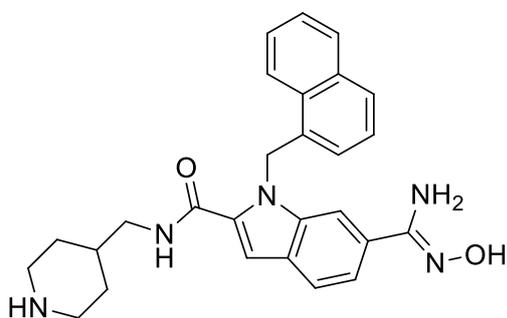
Resazurin

Amitriptylin *N*-oxidNicotinamid *N*-oxid

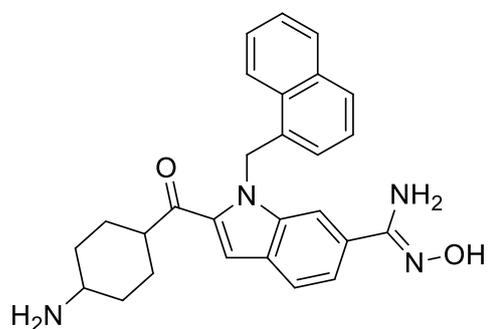
Epacadostat



CM433

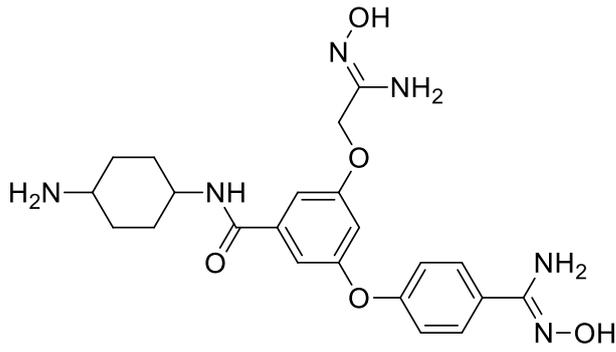


DISC50

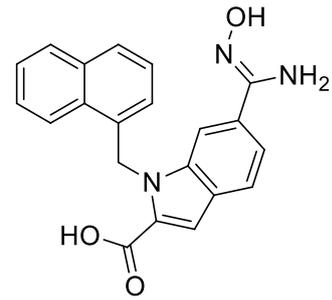


DISC51

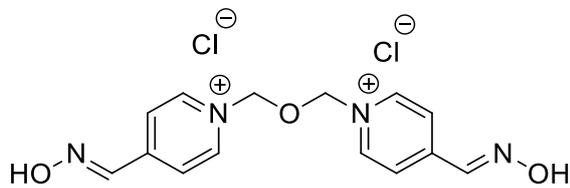
Strukturformelverzeichnis von Substraten und Inhibitoren in chronologischer Reihenfolge.



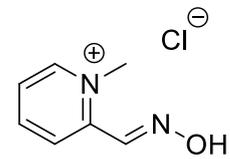
DISC77



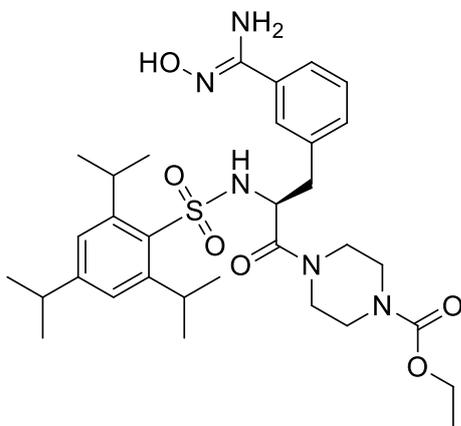
DISC790



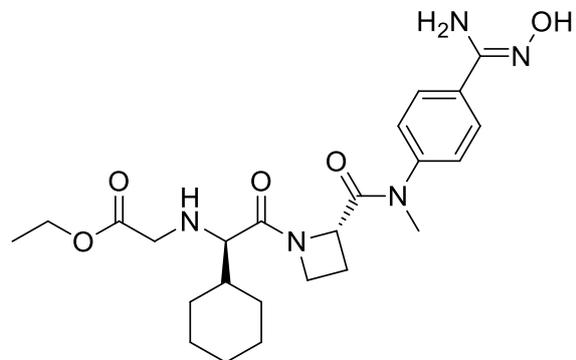
Obidoximchlorid



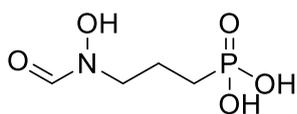
Pralidoximchlorid



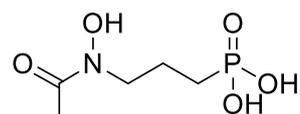
Upamostat



Ximelagatran

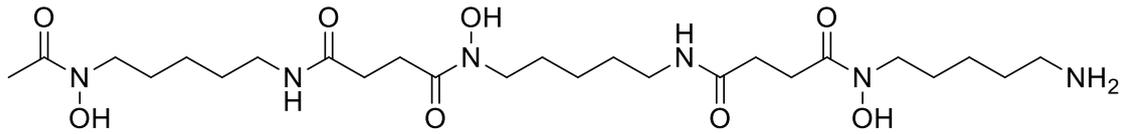


Fosmidomycin

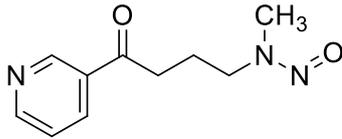


FR900098

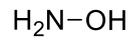
Strukturformelverzeichnis von Substraten und Inhibitoren in chronologischer Reihenfolge.



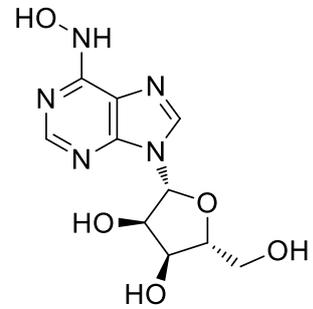
Deferoxamin



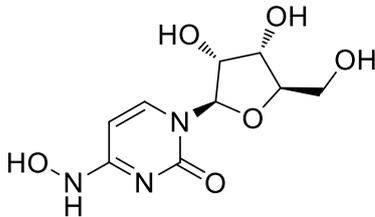
Nikotin abgeleitetes  
Nitrosaminketon (NNK)



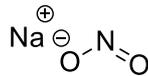
Hydroxylamin



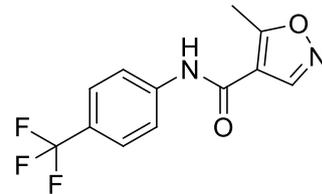
N-Hydroxyadenosin



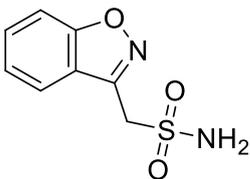
N-Hydroxycytidin



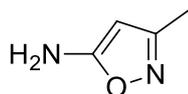
Natriumnitrit



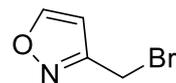
Leflunomid



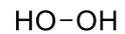
Zonisamid



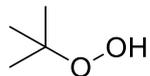
5-Amino-3-methylisoxazol



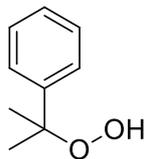
3-Bromomethylisoxazol



Wasserstoffperoxid



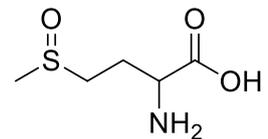
tert-Butylhydroperoxid



Cumulhydroperoxid

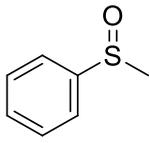


DMSO

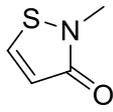


Methioninsulfoxid

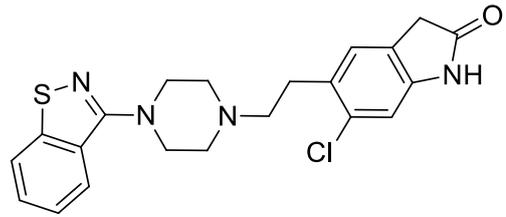
**Strukturformelverzeichnis von Substraten und Inhibitoren in chronologischer Reihenfolge.**



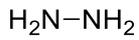
Methylphenylsulfoxid



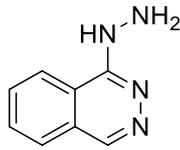
Methylisothiazolinon



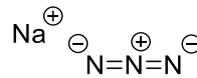
Ziprasidon



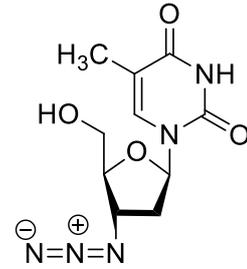
Hydrazin



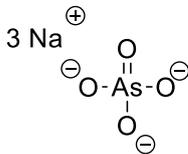
Hydralazin



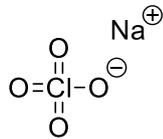
Natriumazid



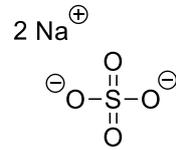
Zidovudin



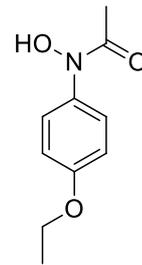
Natriumarsenat



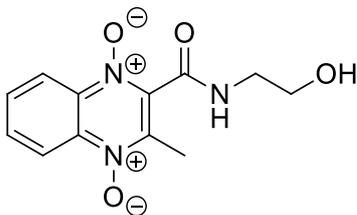
Natriumperchlorat



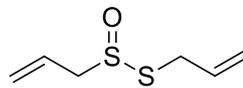
Natriumsulfat



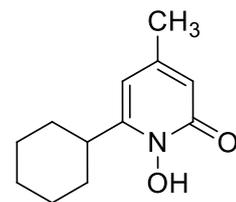
N-Hydroxyphenacetin



Olaquinox

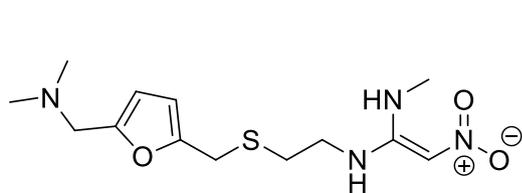


Allicin

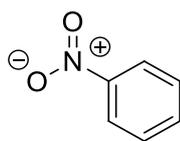


Ciclopirox

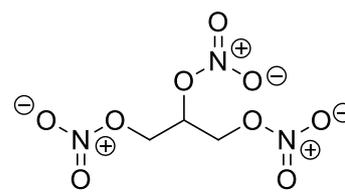
**Strukturformelverzeichnis von Substraten und Inhibitoren in chronologischer Reihenfolge.**



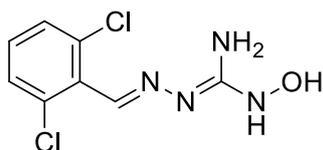
Ranitidin



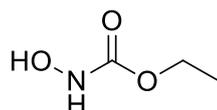
Nitrobenzol



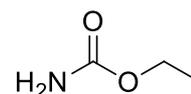
Glyceroltrinitrat



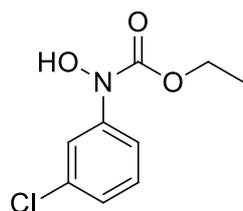
Guanoxabenz



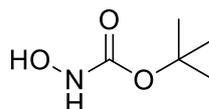
N-Hydroxyurethan



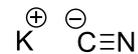
Urethan



Ethyl-3-(chlorphenyl)-N-hydroxycarbamat



N-BOC-Hydroxylamin



Kaliumcyanid

Strukturformelverzeichnis von Substraten und Inhibitoren in chronologischer Reihenfolge.

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Biotransformation

Biotransformation bezeichnet die enzymatische Umsetzung körpereigener Stoffe (Endobiotika) sowie die Umsetzung körperfremder Stoffe (Xenobiotika), welche nicht für die Energiegewinnung oder als Spurenelement für physiologische Prozesse genutzt werden können. Sie hat primär den Zweck, diese Substanzen durch Erhöhung der Hydrophilie ausscheidbar zu machen. Vordergründig ist dabei die renale Ausscheidung. Die biliäre Ausscheidung spielt vergleichsweise eine untergeordnete Rolle. Die Xenobiotika sowie deren Metabolite können auch zum Teil über andere Wege, wie über die Haut oder über die Atemluft eliminiert werden. Für den Metabolismus dieser Substanzen ist eine Reihe von unterschiedlichen Enzymen verantwortlich. Diese lassen sich in einer Phase I- und Phase II-Reaktion einteilen, wobei, je nach Substanz, nicht beide Phasen ablaufen müssen. In einer Phase I-Reaktion werden durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt, was in vielen Fällen die Voraussetzung für eine Phase II-Reaktion bildet [1] (Abbildung 1.1).

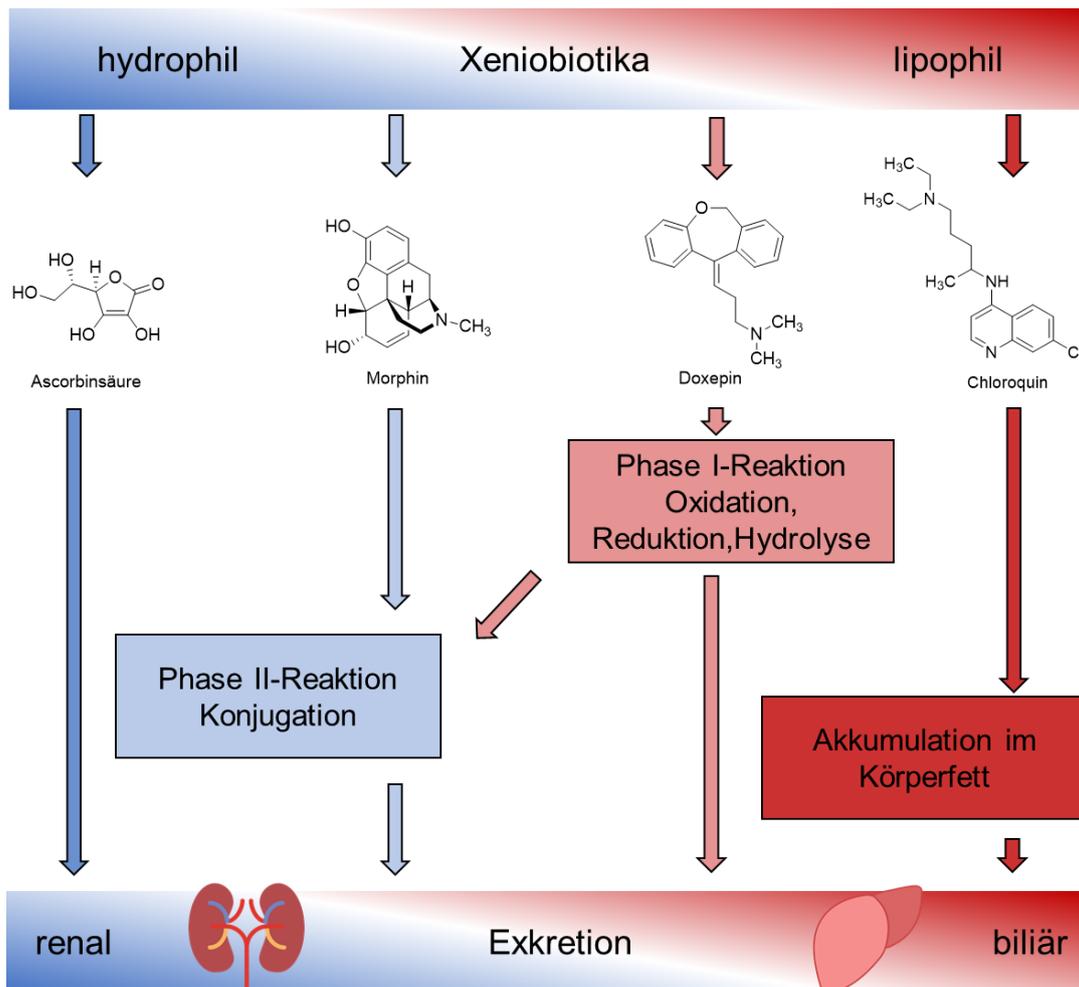


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Wege der Biotransformation anhand einiger ausgewählter Arzneistoffe modifiziert nach Herdegen [2].

Phase II-Reaktionen werden auch als Konjugationsreaktionen bezeichnet. Bei diesen Reaktionen findet eine Konjugation mit Substanzen wie Glutathion (GSH), Glucuronid, Acetat oder Sulfat statt. Hauptmetabolisierungsort ist die Leber, wobei auch andere Gewebe wie Lunge, Niere, Haut, Gehirn oder Interstitium einen relevanten Teil beitragen [3].

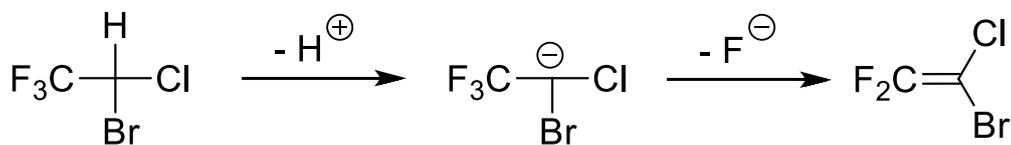
Im Fall von einem Arzneimittel kann die Metabolisierung eine Inaktivierung, Aktivierung oder Toxifizierung darstellen. In den meisten Fällen wird der Arzneistoff durch den Metabolismus inaktiviert. Oral aufgenommene Arzneistoffe werden im Gastrointestinaltrakt absorbiert und dann durch *Vena portae hepatis* (Pfortader) zu der Leber transportiert. Einige Arzneistoffe können dabei überwiegend oder vollständig verstoffwechselt werden. Dieses Phänomen wird als First-Pass-Effekt bezeichnet. Durch den First-Pass-Effekt sinkt die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe [3]. Dies bedingt, dass einige Arzneistoffe unter Umgehung der Leberpassage beispielsweise via intravenöse Gabe verabreicht werden müssen. Einige Arzneistoffe, aber auch endogene Substanzen und Gifte, unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf. Hierbei durchläuft der Arzneistoff beispielsweise eine Phase II-Reaktion in der Leber, wird dann über die Galle wieder in den Darm sezerniert, wo das Konjugat vom Darmmikrobiom wieder gespalten wird und der Arzneistoff erneut absorbiert wird. Dadurch zirkuliert die aktive Form des Arzneistoffs länger im Körper, was gegenteilig zum First-Pass-Effekt, zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit führt. Eine Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs wie etwa durch die Gabe von Antibiotika, welche das Darmmikrobiom dezimieren oder Substanzen, welche die Darmmotilität erhöhen, kann daher Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen haben [3].

Wenn ein Arzneistoff erst durch den Metabolismus in die aktive Form überführt wird, spricht man von einem Prodrug. Vorteile können einerseits die Verbesserung der Pharmakokinetik sein, andererseits das sogenannte Drug-Targeting. Letzteres wird genutzt, um gezielt die physiologischen Gegebenheiten in einem Zielorgan auszunutzen, damit die pharmakologisch aktive Substanz direkt am Wirkort freigesetzt wird und somit sowohl die Dosis reduziert werden kann als auch systemische Nebenwirkungen minimiert werden können. In der modernen Arzneistoffentwicklung nimmt die Betrachtung der Biotransformationswege einen immer größeren Stellenwert ein. Grund dafür ist unter anderem eine Vermeidung einer metabolischen Biotoxifizierung von den Arzneistoffen. Nichtsdestotrotz gibt es gerade in dem Bereich der lang etablierten Arzneistoffe einige Beispiele für eine metabolische Toxifizierung. Das wohl prominenteste Beispiel ist die Toxifizierung von Paracetamol. Dieses wird *in vivo* zum Chinonimin, welches mithilfe von GSH detoxifiziert wird. Sind die GSH-Speicher aufgebraucht, reagiert das Chinonimin mit unterschiedlichen Verbindungen in der Leber. Dies kann zum Leberversagen und daraus folgend bis zum Tod führen [3]. Eine Biotoxifizierung tritt allgemein vermehrt dann auf, wenn, wie auch im Beispiel von Paracetamol, die körpereigenen

Detoxifizierungsmechanismen erschöpft sind (wie GSH, Vitamin C und Vitamin E). Besonders kritisch hierbei sind radikalische Zwischenstufen von Oxidations- und Reduktionsreaktionen zu sehen, da diese sehr reaktiv sind und somit ein erhebliches Schädigungspotential besitzen. In der modernen Arzneistoffentwicklung wird daher der Arzneistoffkandidat häufig so modifiziert, dass solche Reaktionen generell vermieden werden oder es werden Sollbruchstellen eingebaut, welche beispielsweise gezielt eine Hydrolyse des Ausgangsmoleküls begünstigen [3].

## 1.2 Reduktionen in der Biotransformation

Bei dem Metabolismus von Arzneistoffen nehmen die Oxidationen in der Phase I-Reaktion eine dominierende Rolle ein. Hauptverantwortlich dafür ist die CYP450-Enzymfamilie. Unter der Prämisse die Hydrophilie für die Ausscheidung zu erhöhen, ist es auch einleuchtend, dass Oxidationen einen höheren Stellenwert haben als die gegenteilige Reduktion. Grundlage dafür ist, dass die Einführung eines Sauerstoffs die Polarität der Ausgangsverbindung zumeist erhöht. Nichtsdestotrotz gibt es Enzyme, die Reduktionen in der Phase I-Reaktion katalysieren. Vornehmlich sind reduzierende Enzyme dabei in Bakterien zu finden, welche Reduktionen von Arzneistoffen als Teil der Darmflora katalysieren [4]. Hier wurden unter anderem die Reduktionen von Nitrobenzol und Azo-Verbindungen wie Sulfasalazin detektiert [5]. Aber es gibt auch Reduktionen, welche von körpereigenen Enzymen katalysiert werden. Unter hypoxischen Bedingungen sind einige Vertreter der CYP450-Enzymfamilie dazu in der Lage eine Reduktion zu katalysieren. Hierbei können beispielsweise Vertreter der Subfamilie CYP4502B polyhalogenierter Kohlenwasserstoffe reduzieren. Dies ist vor allem aus toxikologischer Sicht interessant, da in Folge der Reduktion hochreaktive Radikale entstehen, welche Proteine, Lipide und DNA schädigen und als Ursache für die sogenannten Halothan-Hepatitis gelten [6] (Abbildung 1.2).



Halothan

Abbildung 1.2: Reduktiver Abbau des Anästhetikums Halothan unter Abspaltung von Fluorid nach *Aktorics et al.* [5].

Neben diesen Reaktionen können auch Carbonylverbindungen reduziert werden. Hierfür verantwortlich sind die Aldo-Keto-Reduktasen und die Alkohol-Dehydrogenasen, welche Alkohole als Endprodukt hervorbringen [1]. Die NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase kann über eine Hydrazo-Zwischenstufe, Azoverbindungen zu primären Aminen reduzieren [7].

Unbekannt ist bislang noch der genaue Biotransformationsweg von unterschiedlichen Nitroverbindungen, welche im Menschen reduziert werden [1]. Wichtig ist zudem die Reduktion von verschiedensten *N*-oxygenierten Verbindungen, welche in den folgenden Kapiteln näher betrachtet wird.

### 1.3 Molybdänhaltige Enzyme

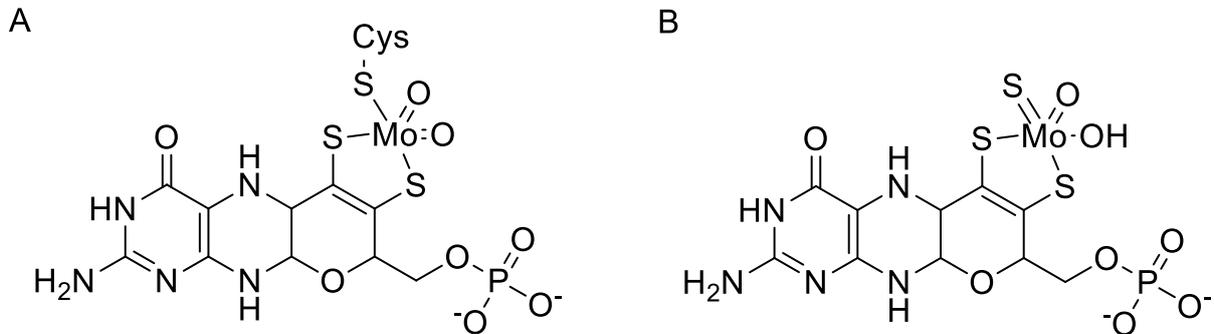
#### 1.3.1 Molybdän

Molybdän ist ein chemisches Element mit der Ordnungszahl 42, welches zu den Übergangsmetallen in der Chromgruppe gehört. In chemischen Verbindungen kann Molybdän in den Oxidationsstufen  $\text{Mo}^{\text{II}+}$ ,  $\text{Mo}^{\text{III}+}$ ,  $\text{Mo}^{\text{IV}+}$ ,  $\text{Mo}^{\text{V}+}$  und  $\text{Mo}^{\text{VI}+}$  auftreten, wobei  $\text{Mo}^{\text{IV}+}$  und  $\text{Mo}^{\text{VI}+}$  die relevantesten sind [8]. Molybdän ist für nahezu alle Lebewesen ein essentielles Spurenelement [9]. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Zufuhr von 50-100  $\mu\text{g}$  Molybdän für einen Erwachsenen [10]. Im Gegensatz zu anderen Schwermetallen wie Eisen, Kupfer oder Mangan, sind Überdosierungen bzw. Vergiftungen durch Molybdän selten beobachtet worden. Bei Arbeitern aus Molybdän-verarbeitenden Fabriken konnten erhöhte Harnsäure-Serumspiegel und gesteigerte Coeruloplasminwerte festgestellt werden [11]. In Tierversuchen an Ratten konnten Reproduktions- und Entwicklungsstörungen nach erhöhter Zufuhr von Molybdän ermittelt werden [11]. Daraus resultierend wurde die tägliche aufgenommene Menge Molybdän, die als unbedenklich gilt, auf 600  $\mu\text{g}$  beziffert [11]. Auch ein Molybdänmangel ist äußerst selten zu beobachten. Ein manifester Molybdänmangel konnte bei Patienten diagnostiziert werden, die über einen längeren Zeitraum künstlich ernährt wurden. Grundlage dabei war entweder ein zu geringer Molybdängehalt in der parenteralen Ernährung oder ein zu hoher Kupfergehalt. Kupfer und Schwefel können mit Molybdän im Blutplasma unlösliche Komplexe bilden, welche den Transport von Molybdän ins Gewebe unterbinden. Somit steht Molybdän nicht für den Einbau in Enzymen zur Verfügung [12]. Ein häufigerer Grund für eine Dysfunktion bei den molybdänhaltigen Enzymen ist eine erbliche Stoffwechselerkrankung die mit einer mangelnden Molybdän-Cofaktor-Synthese einhergeht. Die Molybdän-Cofaktor-Defizienz wird in Kapitel 1.3.2 näher erläutert.

#### 1.3.2 Der Molybdän-Cofaktor

Molybdän wird für den Aufbau molybdänhaltiger Enzyme benötigt. In eukaryotischen Organismen konnten bislang sieben Molybdoenzyme identifiziert werden, während in Prokaryonten weit mehr als 50 Enzyme mit vielfältigen Funktionen gefunden wurden [13]. Unter anderem nehmen diese wichtige Funktionen im Kohlenhydrat-, Schwefel- und Stickstoffmetabolismus ein und sind daher als essenzieller Bestandteil für das Leben auf der Erde anzusehen [14]. Dabei ist die bioverfügbare Form vom Molybdän das Molybdat, welches von den Zellen aufgenommen wird. Molybdänhaltige Enzyme katalysieren Redoxreaktion und

nutzen dabei die Oxidationsstufen  $\text{Mo}^{\text{IV}}$ ,  $\text{Mo}^{\text{V}}$  und  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  um in Zwei-Elektronenübergängen das jeweilige Substrat zu oxidieren oder zu reduzieren [15]. Die Enzyme weisen, mit Ausnahme der bakteriellen Nitrogenase, als Gemeinsamkeit den Molybdän-Cofaktor, kurz Moco, auf, welcher Molybdän im aktiven Zentrum einer tricyclischen Pterinstruktur, auch Molybdopterin genannt, enthält [13] (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Darstellung des Molybdän-Cofaktors aus der Sulfitoxidase-Familie (A) und aus der Xanthinoxidase-Familie (B).**

Die vier humanen Molybdoenzyme und die eukaryotische Nitratreduktase lassen sich anhand ihrer Liganden in zwei unterschiedliche Familien unterteilen. Bei beiden Familien wird das Molybdän über fünf Liganden wovon jeweils zwei Oxo- und zwei Schwefelliganden sind, fixiert. Zu der Familie der Xanthinoxidasen lässt sich die Xanthinoxidoreduktase sowie die Aldehydoxidase, einordnen. Die Familie zeichnet sich einerseits dadurch aus, dass es zwischen dem Zentralatom und dem Protein keine kovalente Bindung gibt (sondern eine koordinative Bindung) und andererseits durch die Tatsache, dass das Moco final modifiziert werden muss, um eine Aktivität des Enzyms zu erreichen [13]. Der Schwefel ist dabei terminal gebunden und wichtig für die katalytische Aktivität. Zu der zweiten Familie gehören die Sulfitoxidasen. Sie bestehen aus der Sulfitoxidase und der Nitratreduktase. Diese Familie zeigt, zur Abgrenzung zu den Xanthinoxidasen, eine Bindung von dem Molybdän zu einem Cystein im Protein auf [13]. Das verbleibende humane Molybdoenzym mARC wurde ehemals der Familie der Sulfitoxidasen zugeordnet [16]. Genauso wie die Sulfitoxidase und die Nitratreduktase findet die Bindung des Mocos über ein Cystein statt. Jüngste Daten, welche aus der Kristallstruktur von mARC stammen, zeigen jedoch, dass mARC eine evolutionäre Zwischenstufe zwischen den älteren Xanthinoxidasen und den jüngeren Sulfitoxidasen darstellen könnte [17]. Die Konfirmation des Mocos beispielsweise, lässt eine Einordnung von mARC in beide Familien zu [17, 18]. Eine Eigenschaft, die mARC mit den Xanthinoxidasen hingegen teilt, ist die fehlende Reaktion auf die Zugabe von KCN. Vertreter der Sulfitoxidasen verlieren dabei die Aktivität und es entsteht ausgehend von dem Moco-koordinierende Cystein

Thiocyanat. mARC hingegen teilt diese Eigenschaft nicht [19]. Somit ist eine eindeutige Zuordnung von mARC in eine Familie nicht möglich.

Die Relevanz dieser molybdänhaltigen Enzyme zeigt sich deutlich bei der Molybdän-Cofaktor-Defizienz-Erkrankung. Verursacht wird diese meist durch eine Mutation in den Genen *MOSC1* (Typ A) oder *MOSC2* (Typ B) wobei auch ein Typ C vorhanden ist, welcher durch die Mutation des Gens *GPHN* verursacht wird [20]. Eine Mutation in einem der drei genannten Genen verursacht einen Mangel von einem der Enzyme, welche für die körpereigene Moco-Synthese verantwortlich ist. Dadurch fehlt der Moco für die katalytische Aktivität der vier humanen Molybdoenzyme. Infolgedessen entwickelt sich kurz nach der Geburt ein spezifisches Krankheitsbild, welches unbehandelt tödlich verläuft. Die seltene Krankheit äußert sich durch Probleme bei der Nahrungsaufnahme, Erbrechen und unkontrollierten Krampfanfällen [20]. Diagnostiziert werden kann sie anhand eines Urintests, der die Sulfitkonzentration misst. Sulfit ist durch den Mangel an Sulfitoxidase, welche Sulfit zu Sulfat oxidiert, erhöht. Zur Differentialdiagnose von einem isolierten Sulfitoxidasemangel kann die Harnsäure zusätzlich bestimmt werden. Bei einem Moco-Mangel kommt es auch zu einer Hypourikämie, welche dann in Kombination mit den Sulfittest auf einen Defekt in einer der drei genannten Genen schließen lässt [20]. Trotz des Mangels von allen molybdänhaltigen Enzymen ähnelt diese Erkrankung sehr dem isolierten Sulfitoxidasemangel. Grund dafür ist die besondere metabolische Relevanz, die die Sulfitoxidase innehat. Eine Störung verursacht eine Akkumulation von Sulfit, Thiosulfat sowie S-Sulfocystein, welche in der Folge eine schwere Form der Enzephalopathie auslösen [21]. Dies dominiert auch die Symptomatik eines Moco-Mangels [22]. Zur Behandlung der Erkrankung hat die Vorstufe des Mocos, das cyclische Pyranopterinmonophosphat, eine *Orphan Drug Designation* in Europa und den USA erhalten. Hierdurch konnte bislang erfolgreich der Typ A des Moco-Mangels behandelt werden, während Typ B und Typ C davon nicht beeinflusst werden. Dabei werden vorhandene Hirnschädigung nicht wiederhergestellt, jedoch bessert sich die Krampfsymptomatik [22, 23].

### 1.3.3 Xanthinoxidoreduktase

Die Xanthinoxidoreduktase erfüllt wichtige Funktionen im Harnsäurezyklus, indem es sowohl die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin als auch die Oxidation von Xanthin zur Harnsäure katalysiert. Damit nimmt die Xanthinoxidoreduktase eine Schlüsselposition im Abbau von Purinen ein [24]. Die Xanthinoxidoreduktase besteht aus zwei identischen Untereinheiten, welche benötigt werden, um FAD und den Moco zu binden. Wie auch die Aldehydoxidase hat die Xanthinoxidoreduktase ein breites Substratspektrum. Neben dem namensgebenden Xanthin kann die Xanthinoxidoreduktase eine große Zahl von Aldehyden und aromatischen Heterozyklen hydroxylieren [25]. Im Körper kann die Xanthinoxidoreduktase in zwei Formen auftreten als Xanthinoxidase oder als Xanthindehydrogenase. Dabei kann die

Xanthindehydrogenase in die Xanthinoxidase überführt werden. Diese kann in Folge dessen nicht mehr  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor benutzen, sondern überträgt stattdessen die Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Je nachdem wie die Transformation von der Xanthindehydrogenase zu der Xanthinoxidase stattfindet, ist der Vorgang reversibel oder irreversibel. Die Umwandlung kann nur bei tierischen Xanthinoxidoreduktasen in dieser Form stattfinden, pflanzliche Xanthinoxidoreduktasen können dies nicht [26]. Ein weiterer Unterschied zwischen pflanzlichen und tierischen Xanthinoxidoreduktasen ist zudem, dass Säugetiere direkt Wasserstoffperoxid erzeugen können, wenn Sauerstoff der finale Elektronenakzeptor darstellt. Jedoch sind sowohl pflanzliche als auch tierische Xanthinoxidoreduktasen mit dem Metabolismus von reaktiven Sauerstoffspezies verbunden [13]. Funktionell werden humane Xanthinoxidoreduktasen neben den bereits beschriebenen Aufgaben zudem eine Rolle im Entzündungsgeschehen [27], sowie bei der Formation von Milchfetttröpfchen in der Brustdrüse [28] zugeschrieben. Die vielfach eingesetzten Arzneistoffe Allopurinol und Febuxostat sind Hemmstoffe der Xanthinoxidoreduktase. Sie verhindern bei einer Hyperurikämie ( $>6,8$  mg/dl Harnsäure), die sich im akuten Stadium als Gichtkrankung äußert, die Akkumulation der Uratkristalle, welche die typischen Beschwerden in den betroffenen Gelenken und im späteren Verlauf, die chronische interstitielle Nephritis, verursacht [29].

#### 1.3.4 Aldehydoxidase

Die Aldehydoxidase entstand evolutionär aus einer Genduplikation der Xanthinoxidoreduktase und hat daraus resultierend eine hohe Sequenzhomologie und den gleichen Aufbau der prosthetischen Gruppen [30]. Während Nagetiere vier unterschiedliche Aldehydoxidasen besitzen, hat der Mensch lediglich eine Variante [31]. Die Aldehydoxidase besitzt ein sehr breites Substratspektrum, was eine unspezifische Rolle in der Biotransformation und Detoxifizierung nahelegt. Dies beinhaltet neben dem Metabolismus von aliphatischen Heterozyklen, Purine und Pteridine, vor allem die Hydroxylierung von aromatischen Heterozyklen sowie die Oxidation von Aldehyden [32]. Die genaue physiologische Funktion der Aldehydoxidase ist nicht bekannt. Es wird jedoch mit der Formation von Neurotransmittern und dem Metabolismus von Retinoiden in Verbindung gebracht [33]. Trotz großer Gemeinsamkeit mit der Xanthinoxidoreduktase, hat die Aldehydoxidase lediglich eine Oxidasefunktion und kann die Substrate nicht reduzieren. Analog zu der Xanthinoxidoreduktase können als Reaktionsprodukt der Aldehydoxidase Wasserstoffperoxid und reaktive Sauerstoffspezies entstehen [13].

#### 1.3.5 Sulfitoxidase

Die Sulfitoxidase ermöglicht die Oxidation von Sulfit zu Sulfat und hat daher eine zentrale Rolle bei der Detoxifizierung von Intermediaten des Abbaus der Aminosäuren Cystein und

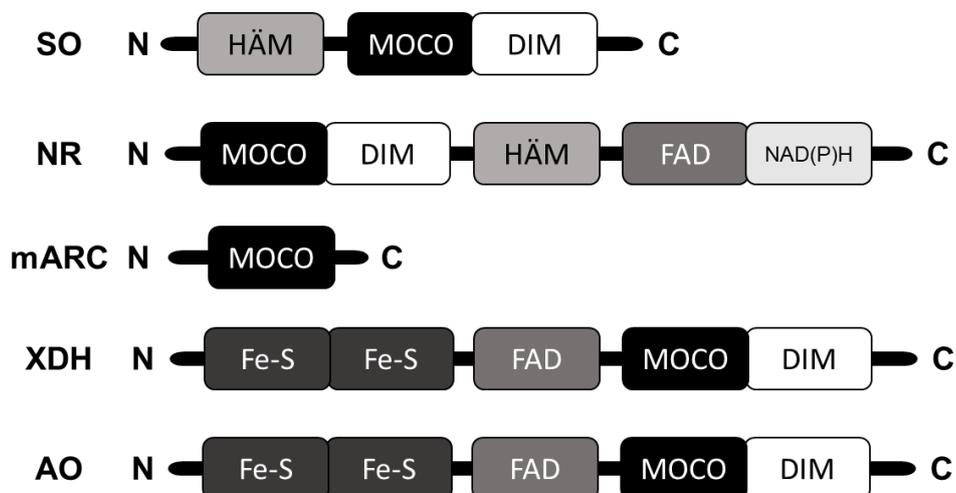
Methionin. Hierbei gibt es deutliche Unterschiede zwischen tierischer und pflanzlicher Sulfitoxidase. Während die tierische Sulfitoxidase im Intermembranraum (IMS) von Mitochondrien lokalisiert ist und Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor benutzt, ist die pflanzliche Sulfitoxidase in den Peroxisomen zu finden und benutzt, ähnlich wie die Xanthinoxidase, molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor [13, 34].

### 1.3.6 Nitratreduktase

Die Nitratreduktase ist das einzig in dieser Arbeit aufgeführte nicht humane Enzym. Es ist jedoch vom Aufbau her nahe verwandt und wird daher hier mit besprochen. Die Nitratreduktase hat eine wichtige Funktion im globalen Stickstoffkreislauf, da sie die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysiert und somit für die Stickstoffassimilation mitverantwortlich ist. Die Nitratreduktase kommt dabei in Bodenbakterien sowie den meisten höheren Pflanzen vor. Zudem kann sie Nitrit zu dem Signalmolekül Stickstoffmonoxid reduzieren, welches das Pflanzenwachstum beeinflusst [13, 35].

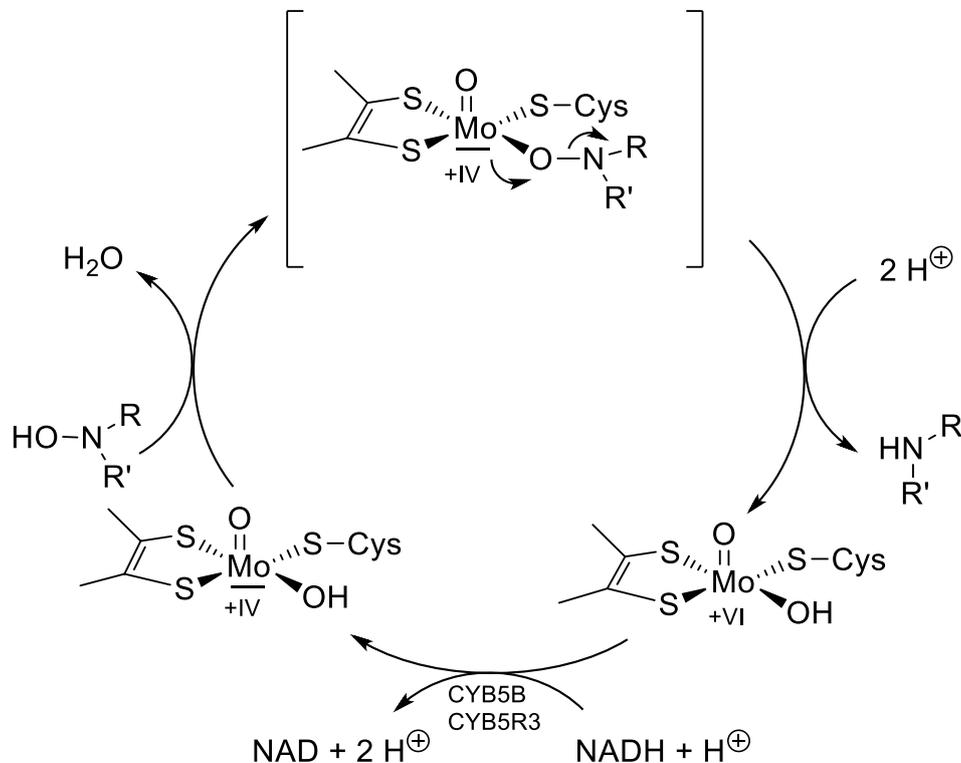
### 1.3.7 Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC)

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) wurde 2006 erstmals beschrieben [36]. mARC untergliedert sich in zwei paraloge Formen, mARC1 und mARC2, welche durch die beiden Gene *MARC1* und *MARC2* kodiert werden, die in Tandemanordnung mit lediglich 5044 Basenpaaren Abstand, auf Chromosom 1 orientiert sind. Die beiden paralogen Formen besitzen eine zu 66% identische Sequenz und haben zu 80% Ähnlichkeit [19]. Im Vergleich zu den anderen eukaryotischen molybdänhaltigen Enzymen wie der Xanthindehydrogenase (XDH), der Sulfitoxidase (SO), der Nitratreduktase (NR) und der Aldehydoxidase (AO), weist mARC den einfachsten Aufbau auf, da es lediglich die Moco-bindende Domäne besitzt (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4:** Die Domänen von eukaryotische molybdänhaltige Enzyme modifiziert nach *Mendel et al.* [13]. Oben sind die Enzyme der Sulitoxidase-Familie aufgetragen, unten die Familie der Xanthinoxidasen, während mARC Aspekte beider Familien vereint und daher in der Mitte abgebildet ist. DIM steht für Dimerisierungsdomäne, Fe-S steht für den Eisen-Schwefel Cluster.

Beide mARC-Enzyme sind Teil eines 3-Komponentensystems, bestehend aus mARC, Cytochrom b5 Typ b (CYB5B) und der NADH-Cytochrom b5-Reduktase Isoform 3 (CYB5R3). Zusammen sind diese in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher *N*-oxygenierter Verbindungen unter Verbrauch von NADH zu reduzieren [37]. Für die Reduktion überträgt die flavinhaltige CYB5R3 die Elektronen jeweils einzeln auf die Hämgruppe der CYB5B, welche wiederum die Elektronen einzeln auf mARC überträgt [38]. Damit ähnelt das 3-Komponentensystem in der Gesamtheit der Nitratreduktase, welche die Häm- und FAD-Domäne im Enzym integriert hat und ebenfalls NADH zur Elektronenübertragung nutzen kann (Abbildung 1.4). Anhand der starken Ähnlichkeit zu der Nitratreduktase wurde der Reaktionsmechanismus, angelehnt an dem Reaktionsmechanismus der Nitratreduktase, wie folgt postuliert (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5: Postulierter Reaktionszyklus für die Reduktion einer *N*-oxygenierten Verbindung durch das mARC-Enzymssystem nach Havemeyer et al. [16].** Der Mechanismus wurde dem der Nitratreduktase nachempfunden [39]. Als Elektronendonator fungiert NADH, welcher über CYB5B und CYB5R3 zwei Elektronen überträgt und das Molybdän von +IV auf +VI reduziert. In diesem Zustand kann die *N*-oxygenierte Verbindung im aktiven Zentrum am Molybdän binden. Nach der Eliminierung von Wasser, überträgt das Molybdän zwei Elektronen auf den Stickstoff und reduziert die Substanz somit.

Nachgewiesen wurde die mARC-abhängige Reduktion von Hydroxamsäuren sowie Sulfhydroxamsäuren [40], *N*-Oxiden [41], Amidoximen und Oximen [42], *N*-hydroxylierte Guanidine [37], *N*-hydroxylierte Amidinohydrazone [41] und Hydroxylaminen [43] (Auswahl in Abbildung 1.6 gezeigt).

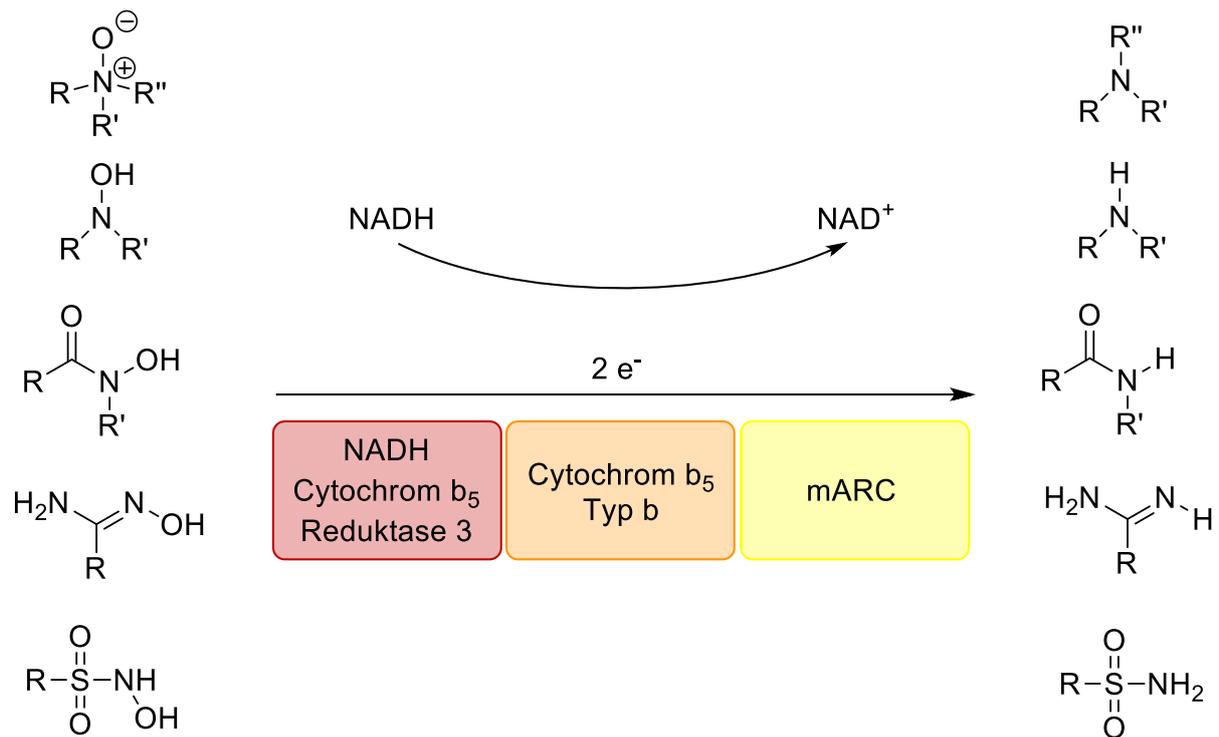


Abbildung 1.6: Auswahl bislang nachgewiesene Reduktionen von funktionellen Gruppen durch das 3-Komponentensystem [44].

mARC ist hochkonserviert und konnte bislang in allen untersuchten Säugetiergenomen gefunden werden [37]. Die physiologische Funktion von mARC ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es ist nachgewiesen beteiligt bei der NO-Homöostase [45, 46], dem Lipidstoffwechsel [47–49] sowie der Detoxifizierung von mutagenen Substanzen wie beispielsweise *N*-hydroxylierter Nucleoside [43]. In jüngster Vergangenheit trat hierbei vor allem die Funktion im Energiestoffwechsel in den Vordergrund. Sowohl im Tiermodell als auch bei epidemiologischen Übersichtsarbeiten am Menschen wurde mARC mit Diabetes und abermals dem Fettstoffwechsel in Verbindung gebracht [50, 51].

So konnte im Mausmodell, bei denen das Gen *MARC2* ausgeknockt wurde ein phänotypischer Unterschied durch ein geringeres Körpergewicht zu dem Wildtyp festgestellt werden. Die Knockout-Mäuse besaßen einen höheren Schreckreflex und wiesen eine erhöhte Körpertemperatur auf. Zudem gab es einige relevante Unterschiede in den Blutwerten von wichtigen Energiestoffwechselprodukten. Die mARC2-Knockout-Maus hatte geringer Gesamtcholesterin- und Triglyceridwerte, jedoch ein erhöhtes Glucoselevel [50]. In einer experimentellen Untersuchung unter Fütterung einer hochkalorischen Diät (60 % der Kalorien aus Fett) zeigte die Knockout-Mäuse über einen Zeitraum von 23 Wochen einen signifikant geringere Körpermassenzunahme als die Vergleichsgruppe auf. Diese entsprach annähernd der Körpermassenzunahme der Vergleichsgruppe unter einer normalen Diät (10 % der

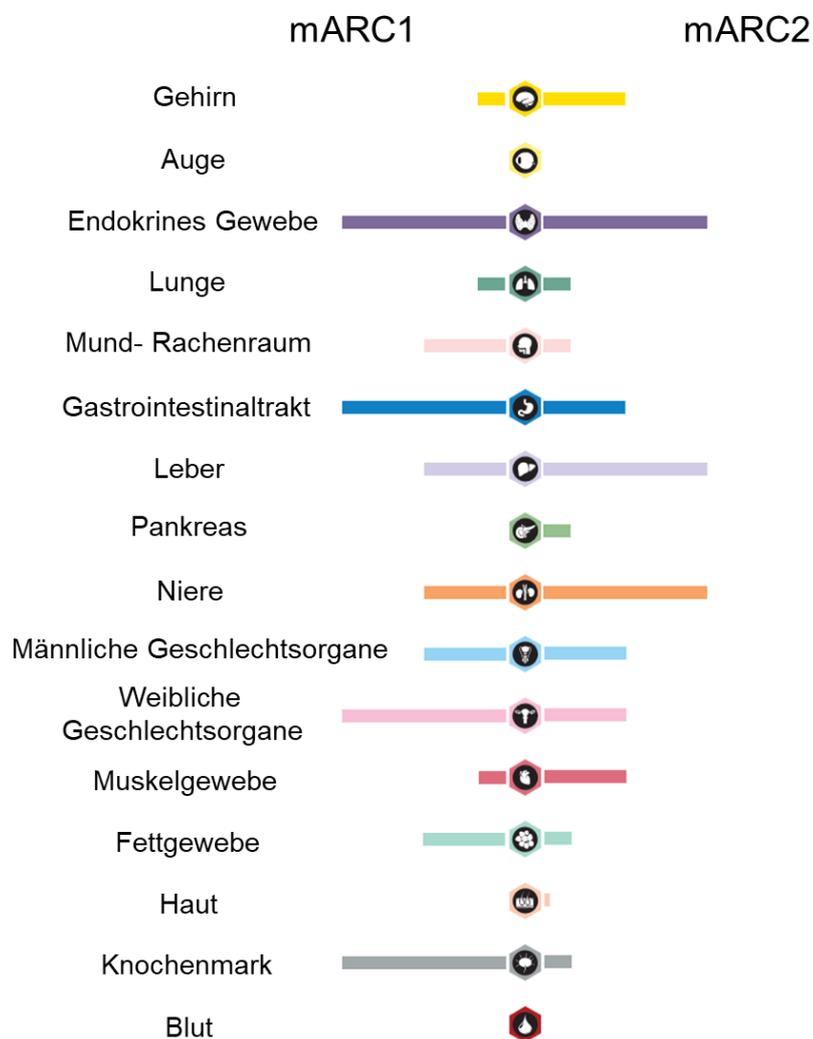
Kalorien aus Fett), sodass die Knockout-Mäuse eine Resistenz zu der Entwicklung von Übergewicht induziert durch hochkalorische Nahrung aufwiesen [50]. Histologisch zeigten die Knockout-Mäuse unter der hochkalorischen Diät eine mikrovesikuläre Steatose und hepatozelluläre Ballonbildung während die Vergleichsgruppe keinerlei pathologische Unterschiede aufzeigten. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die Erkenntnis, dass die mARC2 Knockout-Mäuse per se überlebensfähig waren. Hierbei kann spekuliert werden, ob mARC1 dabei physiologisch in einigen Prozessen das fehlende mARC2 ausgeglichen hat. Es müsste daher zusätzlich untersucht werden, ob eine Maus mit einem doppelten Knockout überlebensfähig ist oder nicht, um zu beweisen ob mARC essenziell für den Organismus ist.

Die Arbeitsgruppe um *Emdin* konnte eine humane mARC1-Missens-Variante identifizieren, welche verminderten Inzidenz für nichtalkoholische sowie alkoholische Fettleberzirrhose-Subtypen assoziiert ist [51]. Es konnte gezeigt werden, dass Leberverfettung signifikant weniger auftrat bei Trägern der Variante. Neben geringeren Leberfettwerten und verminderten Levels an Blutcholesterin konnten zudem geringere Aktivität von Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase, die zur Diagnose von Leberschäden herangezogen werden, gefunden werden. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um *Chen*, welche bereits im Jahr 2010 eine genetische Variante von mARC2 identifizieren konnten, die mit einem gesteigerten Risiko für Diabetes Typ-1 und Typ-2 einhergeht [52], kann somit von einer wichtigen Rolle von mARC im Energiestoffwechsel ausgegangen werden. Da bislang noch nicht untersucht wurde, ob das humane mARC1 dem murinen mARC1 oder dem murinen mARC2 entspricht, könnten die Beobachtungen aus dem Tiermodell und humanen Entdeckungen in einem Zusammenhang stehen. Auf Ebene der Nukleotidsequenz-Basenfolge zeigt humanes mARC1 mit 80 % eine höhere Ähnlichkeit zum murinen mARC2 auf als zum murinen mARC1, welches lediglich eine Übereinstimmung von 74 % aufweist [53].

In der humanen Zelle ist mARC an der äußeren mitochondrialen Membran (OMM) lokalisiert, wobei die C-terminale katalytische Domäne in das Cytosol ragt [54]. Zudem kann mARC in Peroxisomen bei Mäusen und Ratten gefunden werden [55, 56]. Im Gegensatz zu der Expression in Mitochondrien konnte in den Peroxisomen bislang nicht das vollständige 3-Komponentensystem gefunden werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass mARC hier möglicherweise eine andere Funktion innehat. In diesem Zusammenhang wird mARC auch in einer multifunktionalen Rolle als ein Moonlighting-Enzym diskutiert [57], ein Enzym, welches in zumeist unterschiedlichen Lokalisationen unterschiedliche Funktionen innehat. Hierfür gibt es eine Reihe bekannter Beispiele. So ist die Aldehyddehydrogenase, welche den Abbau von toxischen Acetaldehyd im Ethanolmetabolismus katalysiert, in hohen Konzentrationen in der Säugetiercornea und Linse zu finden, wo diese durch die Bindung mit NAD<sup>+</sup> das Gewebe vor

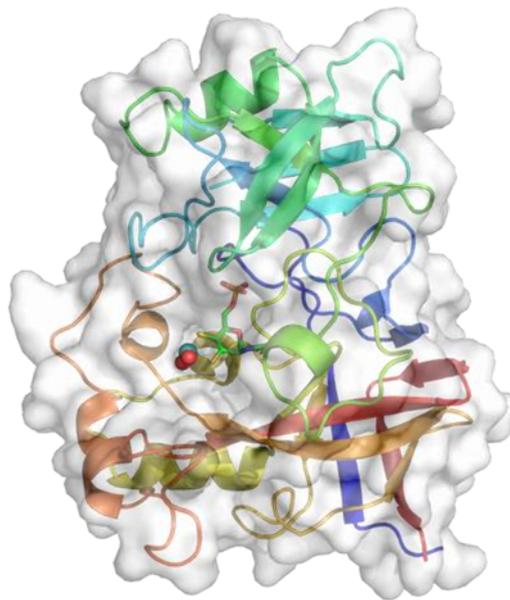
schädlicher UV-Strahlung schützt [58]. Vorstellbar wäre auch für mARC eine Moonlighting-Funktion im Energiestoffwechsel, durch beispielsweise eine Protein-Protein-Interaktion, da bis dato ein Target für die Reduktion durch mARC in diesem Zusammenhang noch nicht identifiziert werden konnte.

Im humanen Zellen kommt dominierend mARC1 vor, welches die höchsten Expressionslevel in Adipozyten aufweist. Jedoch konnten mARC-Enzyme in nahezu allen Geweben gefunden werden. Hohe Level sind auch in Schilddrüse, Leber, Niere und Dünndarm vorhanden [37, 43]. Die Expression von mARC in den einzelnen Geweben auf Proteinebene (differenziertes Bild auf RNA Ebene nicht dargestellt) ist in Abbildung 1.7 gezeigt.



**Abbildung 1.7:** Expressionslevel von humanen mARC1 und mARC2 auf Proteinebene in den unterschiedlichen Geweben nach *the human protein atlas* [59]. Dargestellt ist jeweils der maximal gemessene Wert, welcher sich aus der immunohistologischen Färbung, Proteincharakteristika und RNA-Sequenzdaten zusammensetzt.

Im Jahr 2018 gelang *Kubitza et al.* erstmalig die Kristallisation von humanen mARC1 [60] (Abbildung 1.8). Durch eine Strategie, welche darauf basierte, mARC1 mithilfe des T4-Lysozyms als Fusionsprotein zu kristallisieren, konnten Kristalle gewonnen werden, die mit 1,7 Å zudem über eine sehr hohe Auflösung verfügten. Diese ermöglichte eine nähere Betrachtung des aktiven Zentrums von humanen mARC1. Es konnten dabei zwei Domänen identifiziert werden, welche den Moco im aktiven Zentrum binden, die MOSC-Domäne und die MOSC\_N Domäne. Die MOSC-Domäne enthält das Cystein 273, welches im Fall von mARC1 (Cystein 272 im Fall von mARC2) für die Bindung des Molybdäns benötigt wird. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation des Cysteins sowohl bei mARC1 als auch bei mARC2 zu einer Aufhebung der reduktiven Aktivität führt [61]. Anhand der Kristallstruktur konnte bewiesen werden, dass mARC eine relativ große offene Bindetasche hat. Dies war aufgrund der Bandbreite an unterschiedlichen Substraten mit teils sterisch anspruchsvollen Strukturmerkmalen so erwartet worden.



**Abbildung 1.8: Kristallstruktur von humanen mARC1 [17].** Das aktive Zentrum ist mittig dargestellt. Hervorgehoben ist das Molybdän (türkise Kugel) mit samt der beiden Oxoliganden (rote Kugeln) sowie der Moco, welcher das Molybdän komplexiert.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

In der Vergangenheit wurde die Suche nach neuen endogenen und xenogenen Substraten des mARC-Enzymsystems meist mittels HPLC durchgeführt. Dies brachte jedoch einige Nachteile mit sich. So ist diese Methodik vergleichsweise zeitaufwendig und mit dem Standard UV-Detektor für Substanzen ohne Chromophor nicht ohne Derivatisierung durchführbar. Es konnten wichtige mögliche Substrate wie Wasserstoffperoxid, DMSO oder Hydroxylamin nicht via HPLC überprüft werden. Auch andere analytische Verfahren konnten hierbei nur unter erheblichen Aufwand zur Überprüfung eingesetzt werden, ohne dass eindeutige Ergebnisse erzielt wurden. Neben der Suche nach neuen Substraten würde auch die Suche nach Inhibitoren von einem Schnelltest der enzymatischen Reduktion profitieren. Eine Methode, welche auch in einem Hochdurchsatz-Screening einsetzbar wäre, bietet somit einige Vorteile gegenüber konventionellen Methoden.

Ziel dieser Arbeit war es, eine neuartige Methode zu etablieren, um Substrate und Inhibitoren von mARC in einem einfachen, schnellen und instrumentell wenig aufwendigen Verfahren zu testen. Dies sollte es ermöglichen, bislang nicht untersuchte Substrate zu analysieren, um Hinweise auf die physiologische Bedeutung von mARC sowie der Rolle von mARC im Arzneistoffmetabolismus zu sammeln. Diese Methode sollte auch allgemein in der Arzneistoffentwicklung angewendet werden können, um frühzeitig geeignete Kandidaten zu testen, welche entweder über das Prodrug-Prinzip durch mARC aktiviert werden oder während des Metabolismus durch mARC inaktiviert werden. Durch so ein Verfahren könnten Derivatisierungen der vorhandenen Verbindungen gezielt vorgenommen werden, damit diese besser oder schlechter durch mARC umgesetzt werden können. Zusätzlich bestand die Aufgabe darin durch das Verfahren einen Inhibitor von mARC zu finden, welcher der Ausgangspunkt sein sollte, um einen Einsatz eines mARC-Inhibitors als Arzneistoff zu überprüfen.

## 2 Geräte und Materialien

### 2.1 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
3-Bromomethylisoxazol	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
4-Hydroxyphenylelessigsäure	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
5-Amino-3-methylisoxazol	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Acetonitril Chromasolv	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Allicin	abcr GmbH, Karlsruhe
Amitriptylin- <i>N</i> -oxid	Eigene Synthese [41]
Ammoniak Assay Kit	Megazyme, Bray, Irland
<i>Aqua bidest.</i>	Hauseigene Herstellung
Benzamidin	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Benzamidoxim	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Ciclopirox Olatin	Fagron GmbH & Co. KG, Glinde
CM433	erhalten von Dr. Maccallini, Universität Pescara, Italien
Cumolhydroperoxid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Deferoxaminmesilat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Dimethylaminobenzaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
disc50, disc51, disc77, disc790	discmedicine, Cambridge, USA
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethyl-3-(chlorophenyl)- <i>N</i> -hydroxycarbamat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Epacadostat	BIOMOL GmbH, Hamburg
Fosmidomycin	erhalten von Prof. Dr. Link, Universität Greifswald
FR900098	erhalten von Prof. Dr. Link, Universität Greifswald
Glyceroltrinitrat 1%	Merck KGaA, Darmstadt
Guanoxabenz	Laboratoires Houde, Paris, Frankreich
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt
Hydralazin Hydrochlorid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Hydrazin Monohydrat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Hydroxyharnstoff	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Hydroxylamin Hydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumcyanid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Leflunomid	TCI Deutschland GmbH, Zwiendrecht, Belgien
Meerrettichperoxidase	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
MES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande

Methioninsulfoxid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Methylphenylsulfoxid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
NADH Dinatriumsalz	TCI Deutschland GmbH, Zwijndrecht, Belgien
Natriumarsenat Heptahydrat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumnitrit	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumperchlorat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Natriumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge 0,1 M Titrisol®	Merck KGaA, Darmstadt
<i>N</i> -BOC-Hydroxylamin	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
<i>N</i> -Hydroxyphenacetin	Eigene Synthese [62]
<i>N</i> -Hydroxyurethan	TCI Deutschland GmbH, Zwijndrecht, Belgien
Nicotinamid- <i>N</i> -oxid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Nitrobenzol	Merck KGaA, Darmstadt
NNK	Toronto Research Chemicals, North York, Kanada
Obidoximchlorid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Olaquinoxid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Pralidoximchlorid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Ranitidin	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Resazurin	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Senecivernin	PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth
Senecivernin- <i>N</i> -oxid	PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Tris Pufferan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Upamostat	Wilex AG, München
Urethan	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ximelagatran	AstraZeneca, Mölndal, Schweden
Zidovudin	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Zileuton	BIOMOL GmbH, Hamburg
Ziprasidon Hydrochlorid Monohydrat	TCI Deutschland GmbH, Zwijndrecht, Belgien
Zonisamid	TCI Deutschland GmbH, Zwijndrecht, Belgien

## 2.2 Materialien

Material	Hersteller
96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
DC-Platten ALUGRAM® SIL G/UV <sub>254</sub>	Macherey-Nagel, Düren
Falcon-Tubes	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
HPLC Säule Luna C18(2), 100 Å, 100 * 4.60 mm, 3 µm	Phenomenx Inc, Torrance, USA
HPLC Vorsäule SecurityGuard™ C18	Phenomenx Inc, Torrance, USA
Parafilm	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Pipettenspitze 10 µl, farblos	Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettenspitze 200 µl, gelb	Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettenspitze 1000 µl, blau	Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettenspitze 2500 µl, rot	Sarstedt, Nürnbergrecht
Quartz SUPRASIL UV-Küvette	PerkinElmer, Waltham, USA
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Reaktionsgefäß ROTILABO® 1,5 ml schwarz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
UV-Küvette mikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
UV-Küvette halbmikro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
UV-Küvette	Sarstedt, Nürnbergrecht
Vivaspin Ultrafiltrationseinheit 2,0 ml	Satorius, Göttingen

## 2.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage CP225D	Satorius, Göttingen
Analysenwaage Extend	Satorius, Göttingen
Fluoreszenzspektrometer LS 55	PerkinElmer, Waltham, USA
HPLC Diodenarray-Detektor 1260 Infinity G4212B DAD	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC Entgaser 1260 Infinity G1379B	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC Pumpe 1260 Infinity G1312B	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC Säulenofen 1260 Infinity G1316A TCC	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC thermostabiler Autosampler 1260 Infinity G1367E HiP ALS mit 1260 Infinity G1330B Thermostat	Agilent Technologies, Waldbronn
Ionenfallen-Massen-Spektrometer amZon SL	Bruker, Billerica, USA
Kleinschüttler IKA-Minishaker MS2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Kleinschüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
pH-Meter HI-2211	Hanna Instruments, Vöhringen
Mehrkanalpipette Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelwasserbad GFL 1083	Thermolab®, Burgwedel
Spektralphotometer Cary® 50 Bio mit Walter peltier system PCB 150	Agilent Technologies, Waldbronn
Spektralphotometer UV 1800	Shimadzu, Duisburg
Tischzentrifuge Hettich 1394	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Ultraschallbad BANDELIN Sonorex Super RK510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc, New York, USA
Wasserbad Typ LTG 013	Hach Lange GmbH, Düsseldorf

Die rekombinanten Enzyme wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Scheidig zur Verfügung gestellt. Die Exprimierung und Aufreinigung wurde nach den hier aufgeführten Methoden durchgeführt [19, 63, 64].

### 3 Experimentelle Methoden

#### 3.1 Der NADH-Assay

##### 3.1.1 Durchführung des NADH-Assays für Substratmessungen

Wenn nicht anders angegeben, setzten sich die Messansätze wie folgt zusammen: In einer mikro-UV-Küvette wurden 120 µl MES-Puffer (20 mM, pH 6,0) vorgelegt. In Folgenden wurden jeweils 20 µl mARC (15 µg pro Ansatz), CYB5B (150 pmol pro Ansatz) und CYB5R3 (15 pmol pro Ansatz) hinzugeben. Die Angaben zu den molaren Mengen bei CYB5B und CYB5R3 bezog sich auf den Gehalt von Häm bei CYB5B bzw. auf den Gehalt von FAD bei CYB5R3. In den Kontrollversuchen, in denen nicht alle Enzyme vorhanden waren, wurde anstatt dem jeweiligen Enzyme das fehlende Volumen mit MES-Puffer ausgeglichen. Zu dieser Mixtur wurden darauffolgend 60 µl Substratlösung hinzugegeben. Als Konzentration im Endansatz für die jeweilige Substratlösung wurde, falls möglich, 3 mM, gewählt (in der Regel eine ausreichend hohe Konzentration, um in dem  $V_{max}$  Bereich der Reduktion zu liegen). Konnte aufgrund einer zu hohen Eigenabsorption des Substrates bei 340 nm oder einer zu schlechten Löslichkeit diese Konzentration nicht genutzt werden, wurde eine geringere Konzentration gewählt von minimal 100 µM. Welche die höchstmöglich einsetzbare Konzentration ist, die eingesetzt werden konnte, wurde in einem Vorversuch ohne Protein bestimmt. Um die Löslichkeit zu verbessern, wurde bis zu 10 % DMSO hinzugesetzt. Dieselbe Konzentration DMSO wurde auch in den jeweiligen Kontrollansätzen ohne Substrat verwendet, um die gleichen Bedingungen abzubilden.

Der finale Ansatz bestehend aus Puffer, Protein und Substrat wurde 3 min bei 37 °C im Heizblock des Photometers inkubiert. Dieser Ansatz stellte die Blindprobe dar und die Absorption wurde auf null gesetzt. Zu diesem Inkubationsansatz wurden dann 60 µl NADH-Lösung (1 mM) gegeben und die Messung unverzüglich gestartet. Hierbei wurde in einem Zeitraum von insgesamt 15 min alle 30 Sek. das Absorptionsspektrum zwischen 300 nm und 400 nm aufgezeichnet. Die Messdauer des Versuchs betrug 15 min. Alternativ konnte die Messzeit verkürzt werden, wenn drei aufeinanderfolgende Absorptionsspektren keinerlei signifikante Absorptionsänderung bei 340 nm aufwiesen. Sollte eine weitere Untersuchung durch HPLC oder LC-MS erfolgen, wurden nach Abstoppen der Reaktion 150 µl aus dem Inkubationsansatz zu 150 µl kaltem Methanol gegeben. Anschließend wurde die Mischung 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 200 µl für die weitere Untersuchung entnommen und bei -20 °C, respektive -80 °C für empfindliche Moleküle gelagert. Die Ermittlung der Umsatzrate erfolgte im Nachgang über die Änderung der Absorption bei 340 nm mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Unter Nutzung des literaturbekannten Extinktionskoeffizienten von NADH bei 37 °C ( $6220 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), konnte

die Konzentration des oxidierten NADH berechnet werden. Mithilfe der eingesetzten Enzymmenge und der Zeit konnte daraufhin die Umsatzrate in  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (eingesetzte Enzymmenge)  $\cdot\text{min}^{-1}$  errechnet werden. Jeder Versuch wurde durch unterschiedliche Kontrollmessungen begleitet. So wurde zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der einzelnen Enzymchargen am Ende des Versuchs jeweils die Umsatzrate der BAO-Reduktion ermittelt (diese ist in den Abbildungen nicht mit aufgeführt). Als weitere Kontrollen wurden zur Ermittlung des Grundverbrauchs jeweils die Enzymkombinationen ohne Substrat getestet.

### **3.1.2 Durchführung des NADH-Assays für Kinetikbestimmungen**

Die Bestimmung der Kinetik von Reduktionen durch mARC folgte grundsätzlich den Versuchsablauf aus Abschnitt 3.1.1 mit den folgenden Abweichungen: Die eingesetzte Enzymmenge von mARC, CYB5B und CYB5R3 wurde jeweils halbiert, um eine präzisere Betrachtung für niedrige Substratkonzentrationen zu ermöglichen. Die eingesetzte Substratmenge variierte je nach verwendetem Substrat, um eine Konzentrationsabhängigkeit im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik aufzuzeichnen. Nach Zugabe von NADH-Lösung wurde über einen Messzeitraum von 2 min oder 5 min die Absorption bei 340 nm dauerhaft gemonitort. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden über den linearen Bereich der Messung wurde die Umsatzrate berechnet.

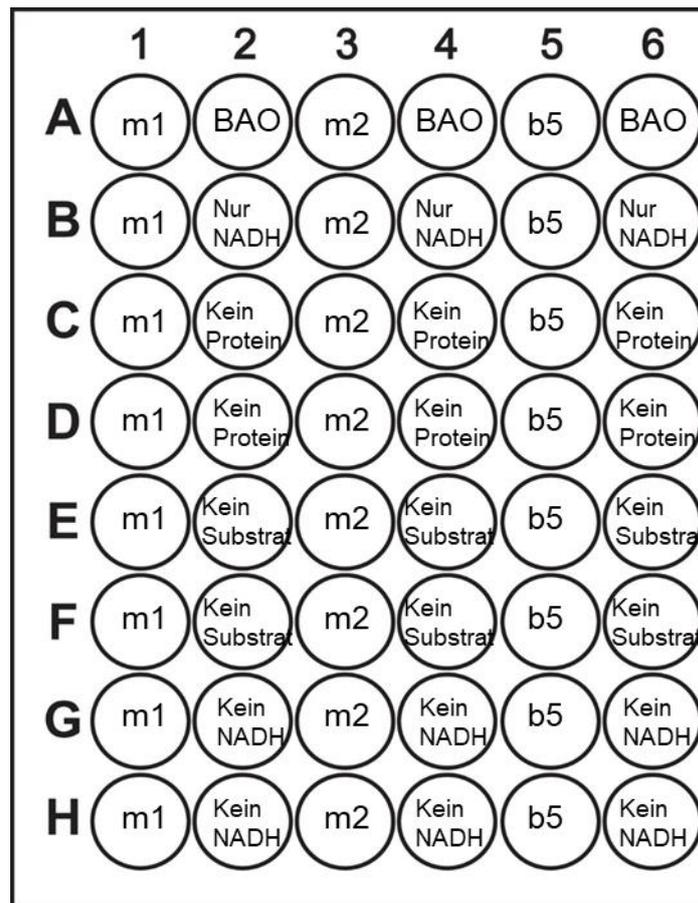
### **3.1.3 Durchführung des NADH-Assays für Inhibitormessungen**

Die Untersuchung von Inhibitoren von mARC folgte grundsätzlich dem Versuchsablauf aus 3.1.1 mit den folgenden Abweichungen: In der Vorinkubation wurde anstelle des Substrates der potenzielle Inhibitor (in unterschiedlicher Konzentration) dazugegeben. Die verwendete Enzymmenge wurde wie bei Methode 3.1.2 halbiert. Zwei Minuten nach Start der Reaktion mit NADH-Lösung wurden 15  $\mu\text{L}$  BAO-Lösung (60 mM) hinzugefügt. Die Reaktion verlief weitere 8 min oder wurde gestoppt, falls drei aufeinanderfolgende Messwerte bei 340 nm keine Veränderungen aufzeigten. Die Kontrollmessung (Inkubation ohne Inhibitor) wurde analog durchgeführt. Die Umsatzraten von BAO mit und ohne Inhibitor wurden anhand der Absorptionsänderung bei 340 nm verglichen, um den Grad der Inhibition zu ermitteln.

### **3.1.4 Durchführung des NADH-Assays für 96-Well-Platten-Versuche**

Der NADH-Assay mit Mikrotiterplatten mit 96 Wells folgte in den Grundsätzen der Methode aus 3.1.1. Eine Substanz wurde dafür auf der Well-Platte in drei Spaltenpaaren (insgesamt 6 Spalten mit je 8 Wells) geprüft. Die erste Spalte eines Spaltenpaares enthielt den kompletten (funktionalen) Inkubationsansatz mit der jeweiligen mARC-Isoform, während die zweite Spalte des Paares ausschließlich aus Kontrollproben bestand, deren Zusammensetzung aus Abbildung 3.1 entnommen werden kann. Die Vermessung der zwei mARC-Isoformen in den ersten beiden Spaltenpaaren wurde durch das dritte Spaltenpaar ergänzt, in dem nach analoger Aufteilung nur CYB5B und CYB5R3 (Spalte 5) gegen Kontrollen (Spalte 6)

vermessen wurden. Pro Well wurden 100  $\mu$ l insgesamt pipettiert. Dabei wurden jeweils MES-Puffer (50  $\mu$ l), Substratlösung (10  $\mu$ l) und Proteinlösung (20  $\mu$ l) für die Standardinkubationsansätze vorgelegt. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C über 3 min inkubiert. Als Blindwert wurden die Kontrollen ohne NADH auf null gesetzt. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20  $\mu$ l NADH-Lösung. Anschließend wurde die Absorption bei 340 nm in einem Abstand von einer Minute über den Zeitraum von 15 min kontinuierlich bestimmt. Als finale Konzentration für das Substrat und BAO wurde, falls möglich, 3 mM gewählt. Im Fall von NADH wurde als Konzentration im Endgefäß 1 mM gewählt.



**Abbildung 3.1: Pipettierschema für die Vermessung eines Substrates auf einer 96-Well-Platte.** In jedem Well wurden 100  $\mu$ l mithilfe von Mehrkanalpipetten insgesamt vorgelegt. Die Kontrollen bei der eine Komponente fehlt wurden durch das gleiche Volumen Puffer ergänzt. Die Kontrolle „BAO“ enthielt anstelle des Substrates BAO und diente der Funktionskontrolle sowie als Referenz. Die Abkürzungen m1 und m2 stehen jeweils für das komplette 3-Komponentensystem. Die Wells mit b5 enthielten CYB5B und CYB5R3 ohne eine mARC-Isoform.

### 3.2 LC-MS-Analytik

Die Messproben entstammen den Inkubationen, welche in der Methodik 3.1.1 beschrieben werden. Für die Substrate, welche aufgrund sehr hoher Eigenabsorption bei der Wellenlänge von 340 nm nicht durch den NADH-Assay vermessen werden konnten, wurde folgendes Protokoll angewendet: Das Substrat wurde mit jeweils 20 µl mARC (7,5 µg pro Ansatz), CYB5B (75 pmol pro Ansatz) und CYB5R3 (7,5 pmol pro Ansatz) 3 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Die Angaben zu den molaren Mengen bei CYB5B und CYB5R3 bezog sich auf den Gehalt von Häm bei CYB5B bzw. auf den Gehalt von FAD bei CYB5R3. Nach Zugabe von NADH-Lösung (1 mM pro Ansatz), wurde erneut über 15 min im Schüttelwasserbad inkubiert (Volumen des Endansatzes: 300 µl). Nach Ablauf der Zeit wurde die Messung durch unverzüglichen Versatz der Proben mit dem gleichen Volumen an kaltem Methanol abgestoppt und 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Es wurden 200 µl des klaren Überstands in ein Eppendorfgefäß überführt und für weitere Untersuchung durch die LC-MS bei -20 °C gelagert.

Proben, welche aus dieser Inkubation erhalten wurden und Proben, welche dem NADH-Assay entstammten, wurden für die Vermessung durch die LC-MS im Folgenden identisch (weiter)behandelt. Es erfolgte für jede Messprobe jeweils eine Injektion von 1 µl und 10 µl Probenlösung. Für die Elution wurde ein Gradient verwendet, welcher sich aus den Fließmittel A: 0,1 % Essigsäure in *Aqua bidest.* und Fließmittel B: Acetonitril, zusammensetzte. Der Verlauf des Gradienten ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1: Zeitliche Abfolge der Standard LC-MS Methodik.**

Zeit in min	Flussrate in ml/min	Fließmittel A in %	Fließmittel B in %	Fluss zu
0	1,0	97	3	Abfall
2,5	1,0	95	5	MS
5,5	1,0	35	65	MS
10	1,0	0	100	MS
11	1,0	0	100	Abfall
11,9	1,0	0	100	Abfall
12	1,0	97	3	Abfall
13	1,0	97	3	Abfall

Die hydrophilen Pufferbestandteile wurden innerhalb der ersten 1,5 min über das Splitventil abgetrennt und nicht analysiert, um Schäden an der LC-MS-Anlage zu vermeiden. Für besonders hydrophile Analyten, welche in diesen Zeitraum eluieren, wurden nicht über das Splitventil abgetrennt (somit wurde auch innerhalb der ersten 1,5 min der Fluss direkt zu der MS geleitet). Die Säulen (stationäre Phase: Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 100 x 4.60 mm, 3 µm und Vorsäule Phenomenex SecurityGuard™ C18) wurden auf 20 °C temperiert und die Flussrate betrug 1,0 ml/min. Konnte keine Peaktrennung von Substrat und dessen reduzierter Form mit diesem Standardprotokoll erhalten werden, wurde die Messzeit auf 30 min

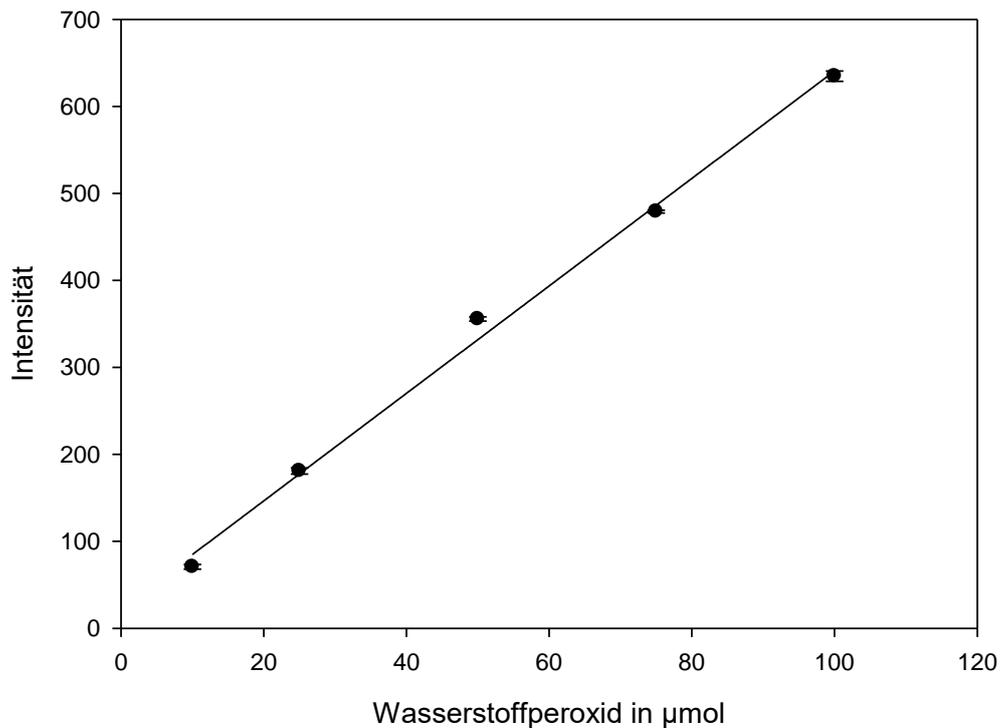
ausgeweitet und der Gradient dementsprechend auf diesen Zeitraum angepasst (die Zeiträume für das Abtrennen der hydrophilen Substanzen zu Anfang sowie die Reinigungsschritte blieben dabei in gleicher Form erhalten). Für einige Substrate konnte aufgrund der erhaltenen Massenspektren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollexperimenten auf eine Peaktrennung verzichtet werden.

Zur Ermittlung der Umsetzungsraten wurde mithilfe von Bruker DataAnalysis 4.0 der  $[M+H]^+$ -Signal von reduzierter Substanz und Ausgangsverbindung gesucht und integriert. Dann wurde der Anteil an reduzierter Form durch die Division des Integrals des entsprechenden  $[M+H]^+$ -Signals mit der Summe der Integrale aus den Signalen von reduzierter Form und Ausgangsverbindung berechnet. Aus diesem folgte dann im Anschluss die Berechnung der Umsetzungsrate mithilfe der dazu benötigten Daten aus dem NADH-Assay (z.B. eingesetzte Enzymmenge und Gesamtvolumen). Für Proben, bei denen keine Peaktrennung im Standardverfahren erreicht werden konnte, wurde mithilfe des Kontrollperiments ohne Protein relevante Massenunterschiede detektiert. Es wurden von Ausgangssubstanz und reduzierter Form neben dem  $[M+H]^+$ -Signal, die jeweiligen Isotopenpeaks +1 und +2 sowie Massen von möglichen Dimeren  $[2M+H]^+$  und Trimeren  $[3M+H]^+$  mit jeweiligen Isotopenpeaks ermittelt. Falls vorhanden, wurden auch  $[M+Na]^+$ - und  $[M+K]^+$ -Signale einbezogen. Aufgrund der weichen Ionisationsmethode (ESI) und meist analogen Fragmentierungsmustern von Ausgangssubstanz und reduzierter Form wurden mögliche Fragmentierungen nicht beachtet, es sei denn, diese wurde in einem für die Berechnung anteilig relevanten Maße beobachtet ( $\geq 1\%$ ). Eine Quantifizierung von den Peaks konnte ab einem Signal-Rausch-Verhältnis (Grundrauschen der LC-MS an den Versuchstagen unterschiedlich) von 10 zu 1 erfolgen. In der Regel konnten so Umsetzungsraten  $\geq 0,5 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  bestimmt werden.

### 3.3 Der Peroxidase-Assay

Der Peroxidase-Assay wurde aufgrund des Versuchsaufbau stets als gekoppelter Assay nach erfolgter Vermessung via NADH-Assay nach der Methodik aus Abschnitt 3.1.1 durchgeführt. Die Vermessung von Wasserstoffperoxid (unterschiedliche Konzentration) erfolgte hierbei im Unterschied zum NADH-Assay, bei dem ein Zeitraum von 15 min vermessen wurde, über 2 min. Nach Durchführung des NADH-Assays wurden 200  $\mu\text{l}$  des Inkubationsmixes in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad behandelt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Danach wurde der Ansatz für eine 1 min bei einer Temperatur von  $0\text{ }^\circ\text{C}$  in einem Eiswasserbad gekühlt. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  MES-Puffer wurde die Mixtur im Schüttelwasserbad für 2 min auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt. Darauf folgte die Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  4-Hydroxyphenylelessigsäure-Lösung (20 mM) und 30  $\mu\text{l}$  Meerrettichperoxidase-Lösung (0,03 mg/ml). Der Inkubationsmix wurde anschließend weitere 10 min auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  temperiert.

Vor der Vermessung am Fluorimeter wurden dem Inkubationsmix 30  $\mu\text{l}$  Natriumhydroxidlösung (10 M) hinzugefügt. Für die Messung am Fluorimeter wurden 850  $\mu\text{l}$  *Aqua bidest.* in einer Quarzküvette vorgelegt. Dazu wurden 150  $\mu\text{l}$  des Inkubationsmixes hinzugegeben. Die Vermessung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm. Die Spaltbreite betrug 2,5 mm und die Scangeschwindigkeit wurde auf 100 nm/min festgelegt. Aufgenommen wurde ein Emissionsspektrum zwischen 340 nm und 540 nm. Als Blindwert wurde jeweils Luft vermessen. Die erhaltenen Messdaten wurden mittels einer Weibull-Verteilung gefittet. Die Bande bei 408 nm wurde zur Evaluierung der Messung genutzt. Für die Erstellung der Kalibriergerade wurde ein analoger Ablauf gewählt und dabei auf die Zugabe von Enzymen während des NADH-Assays verzichtet (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Kalibrierkurve der fluorimetrischen Vermessung von unterschiedlichen Wasserstoffperoxidkonzentrationen ( $R^2=0,996$ ).** Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse einer Dreifachbestimmung mit Fehlerbalken. Die Menge Wasserstoffperoxid dargestellt auf der Abszissen-Achse bezieht sich jeweils auf die Menge Wasserstoffperoxid, welche im NADH-Assay eingebracht wurde.

### 3.4 Sonstige Methoden

#### 3.4.1 Prüfung auf Reinheit von Hydroxyharnstoff nach *Pharmacopoea Europaea*

Die Prüfung auf Reinheit von Hydroxyharnstoff wurde mittels Dünnschichtchromatografie mit folgenden Parametern durchgeführt:

*Untersuchungslösung:* Analysenlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung nach Durchführung von Methode 3.1.1.

*Referenzlösung a:* 12,5 mg Harnstoff *R* in 50 ml Wasser gelöst.

*Referenzlösung b:* 5 mg Harnstoff *R* und 5 mg Hydroxyharnstoff in 50 ml Wasser gelöst.

*Referenzlösung c:* 50 mg Hydroxyharnstoff in 50 ml Wasser gelöst.

*Platte:* DC-Platte mit Kieselgel *R*

*Fließmittel:* Pyridin *R*/ Wasser *R*/ Ethylacetat *R* (2:2:10 V/V/V)

*Auftragen:* 10 µl der Referenzlösungen, 30 µl der Untersuchungslösung aufgrund unbekanntem Gehalts von reduziertem Harnstoff in der Inkubationslösung.

*Laufstrecke:* 2/3 der Platte

*Trocknen:* an der Luft

*Detektion:* Besprühen mit einer Lösung von Dimethylaminobenzaldehyd *R* (10 g/l) in Salzsäure (1 mol/l)

*Eignungsprüfung:* Die Prüfung wurde als geeignet bewertet, wenn die Referenzlösungen zwei unterschiedliche, deutlich voneinander getrennte Flecke aufwiesen.

#### 3.4.2 Durchführung des Ammoniak-Assays

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Zusammensetzung des Messansatzes wie folgt gewählt: In einem Eppendorfgefäß wurden 120 µl MES-Puffer (20 mM, pH 6,0) vorgelegt. Hierzu wurden jeweils 30 µl mARC (7,5 µg pro Ansatz), CYB5B (75 pmol pro Ansatz) und CYB5R3 (7,5 pmol pro Ansatz) gegeben. Die Angaben zu den molaren Mengen bei CYB5B und CYB5R3 bezog sich auf den Gehalt von Häm bei CYB5B bzw. auf den Gehalt von FAD bei CYB5R3. Zu dem Inkubationsansatz wurden 30 µl einer Hydroxylaminlösung in der zu messenden Konzentration gegeben und bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Zum Starten der Reaktion wurde der Ansatz mit 37,5 µl NADH-Lösung versetzt (Konzentration 2 mM im Endgefäß). Nach Ablauf von 15 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 75 µl kalten Methanols gestoppt. Anschließend wurde das Protein

abgetrennt, indem der Ansatz 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert wurde. Für die Untersuchung der Ammoniakkonzentration wurden in einer UV-Küvette 649,5 µl *Aqua bidest.* vorgelegt und anschließend mit 277,5 µl Probe versetzt. Dieser Ansatz wurde 3 min bei 25 °C vorinkubiert und im Photometer als Blindwert gesetzt. Die Messung wurde nach Zugabe von 6,6 µl GDH-Lösung und 66,6 µl NADPH gestartet. Beide Lösungen entstammten dem Megazyme Ammonia Assay Kit, in dem die Konzentration und genaue Zusammensetzung nicht eindeutig deklariert war. Nach 5 min Inkubation bei 25 °C wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Die Methode wurde durch die im Kit beigelegte Ammoniak-Standard-Lösung (Bereich 0,2 µg bis 7,0 µg Ammoniak pro Ansatz) validiert.

### **3.4.3 Bestimmung von Benzamidin via HPLC**

*Stationäre Phase:* LiChrospher 60 RP-select B, 5 µm, 250•4 mm; Vorsäule: LiChrospher 60 RP-select

*Mobile Phase:* 10 mM Octylsulfonat mit 20 % (V/V) Acetonitril

*Retentionszeiten:* Benzamidoxim: 9,3 ± 0,3 min; Benzamidin: 16,3 ± 0,3 min

*Laufzeit:* 20 min

*Detektionswellenlänge:* 229 nm

*Flussrate:* 1,0 ml/min

*Säulentemperatur:* Raumtemperatur

## 4 Ergebnisse mit Diskussion

### 4.1 Etablierung des NADH-Assays

#### 4.1.1 Theoretische Grundlagen

NADH ist ein wichtiges Coenzym im menschlichen Organismus. Es dient als Redoxreaktionspartner für eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme [65]. Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde das Potential erkannt, die Redoxsysteme von NADH und  $\text{NAD}^+$  zur Detektion von enzymatischen Umsetzungen zu nutzen [66].

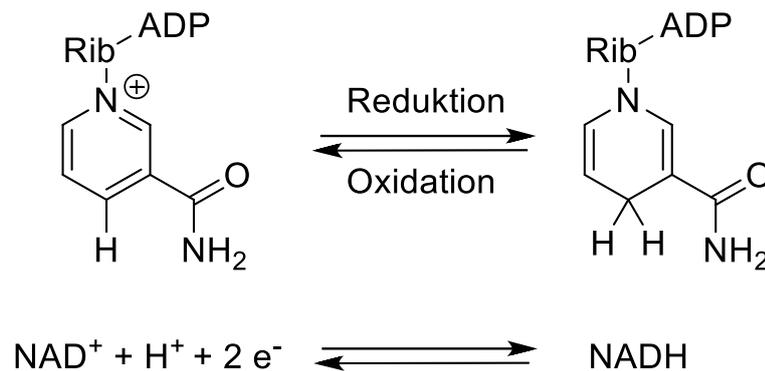


Abbildung 4.1: Redoxgleichgewicht von  $\text{NAD}^+$  und NADH.

Der NADH-Assay basiert auf den unterschiedlichen Absorptionsspektren von NADH und  $\text{NAD}^+$ . Beide Substanzen zeigen aufgrund ihrer Adeninstruktur (Abbildung 4.1) ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Während NADH bei 340 nm auch eine erhöhte Absorption besitzt, zeigt die oxidierte Form  $\text{NAD}^+$  bei dieser Wellenlänge keinerlei Eigenabsorption. Dies beruht darauf, dass sich bei der Reduktion des Nicotinamid ein chinoides System bildet, welches bei höheren Wellenlängen absorbiert als das oxidierte Nicotinamid [67]. Bei der Reduktion eines Substrats durch mARC wird eine stöchiometrische (sofern das jeweilige Substrat lediglich eine funktionelle Gruppe besitzt, welche durch mARC reduzierbar ist) Menge NADH oxidiert zu  $\text{NAD}^+$ . Führt man diese Reaktion bei einer definierten Temperatur (37°C), sowie einem definierten pH-Wert (pH 6) durch, kann für diesen Fall aufgrund des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH ( $6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [68] die Konzentration von dem reduzierten Substrat pro Zeit berechnet werden. Der NADH-Assay kann auch in einer gekoppelten Enzymreaktion genutzt werden, um indirekt die Enzymaktivität oder die Konzentration eines Substrates zu ermitteln. So ist es beispielsweise möglich in einer zweistufigen Reaktionsabfolge Glucose zu bestimmen. Dabei wird Glucose mit einem Überschuss ATP sowie  $\text{NADP}^+$ , Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase inkubiert. Über die Bildung von Glucose-6-phosphat mittels Hexokinase wird in der Folge  $\text{NADP}^+$  reduziert. Als Endprodukte entstehen 6-Phosphogluconat und NADPH, welches

äquivalent zu Ausgangskonzentration von Glucose vorliegt [69]. Diese Reaktion ist nur ein Beispiel für zahlreiche Bestimmungen, die durch diese Detektion ermöglicht werden.

#### 4.1.2 Validierung des NADH-Assays

Um zu beweisen, dass die berechneten Umsetzungsraten aus dem NADH-Assay, den tatsächlichen Umsetzungsraten entsprechen, wurde eine Validierung anhand von einer Vergleichsmessung mit dem Modellsubstrat Benzamidoxim (BAO) per HPLC vorgenommen (Methode 3.4.3). Hierbei wurden fünf unterschiedliche Konzentrationen (15  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ ) BAO, jeweils als Doppelbestimmung, zunächst per NADH-Assay vermessen. Diese Proben wurden danach aufgearbeitet und via HPLC auf das Reaktionsprodukt Benzamidin (BA) untersucht. Der berechnete NADH-Verbrauch aus dem NADH-Assay wurden dann mit den berechneten BA-Konzentrationen korreliert (Abbildung 4.2.).

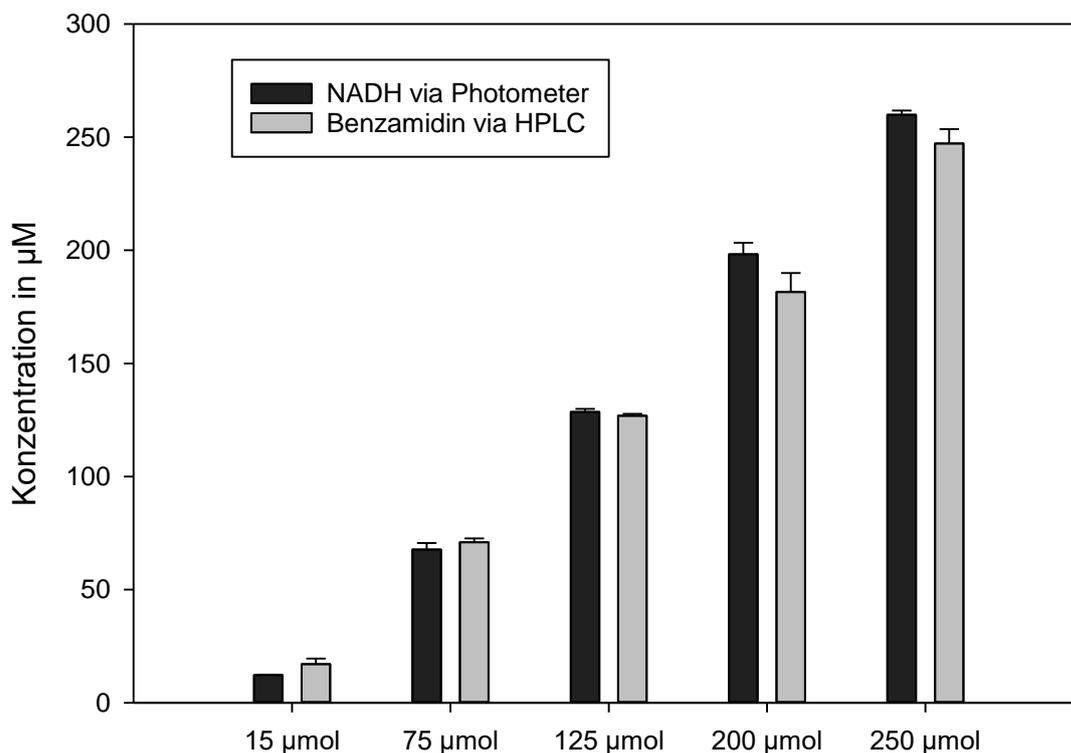


Abbildung 4.2: Vergleichsmessung NADH-Assay und HPLC-Messung.

Es konnte bei keiner untersuchten Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen der berechneten Konzentration von oxidiertem NADH aus dem NADH-Assay und der gemessenen Konzentration des Reaktionsproduktes BA aus der HPLC-Untersuchung festgestellt werden. Für alle folgenden Untersuchungen wurde eine Ausgangskonzentration von 200  $\mu\text{M}$  NADH

gewählt, sodass eine Gesamtumsetzung von dem jeweiligen Substrat stets im validierten Bereich lag. Es wurde zudem ein grundsätzlicher Transfer der Methode zu einem leistungsfähigeren 96-Well-Platten-Verfahren (Methode 3.1.4) durchgeführt. Auch hier konnten die Umsetzungsraten von BAO richtig erhoben werden. Die Methode zeigte jedoch eine größere Streuung von Messwerten (geringere Präzision), sodass mit diesem Verfahren nur Substrate mit höheren Umsetzungsraten zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten. Die Methode ist dennoch für die Findung von Inhibitoren geeignet. Jedoch wurden andere Ziele priorisiert, sodass sich die meisten aufgeführten Ergebnisse in dieser Arbeit auf den NADH-Assay in der Küvette beziehen.

#### 4.1.3 Untersuchung zum NADH Verbrauch ohne Substrat

Da in den vorherigen Versuchen ein Grundumsatz an NADH festgestellt wurde, welcher unabhängig von einer Zugabe eines Substrates war, wurde ein Langzeitversuch etabliert. Aufgrund der Tatsache, dass der Verbrauch von NADH gleichmäßig stark ausfiel bei Versuchen mit dem kompletten 3-Komponentensystem und bei den Kontrollen, welche lediglich CYB5B und CYB5R3 beinhalteten, wurde der Einfluss von mARC1 und mARC2 nicht weiter betrachtet. Der Vergleich einer 90 Minuten Inkubation, die nur NADH enthielt und einer Inkubation in der zusätzlich CYB5B und CYBR3 hinzugefügt wurden, zeigt den Einfluss von den Enzymen (Abbildung 4.3).

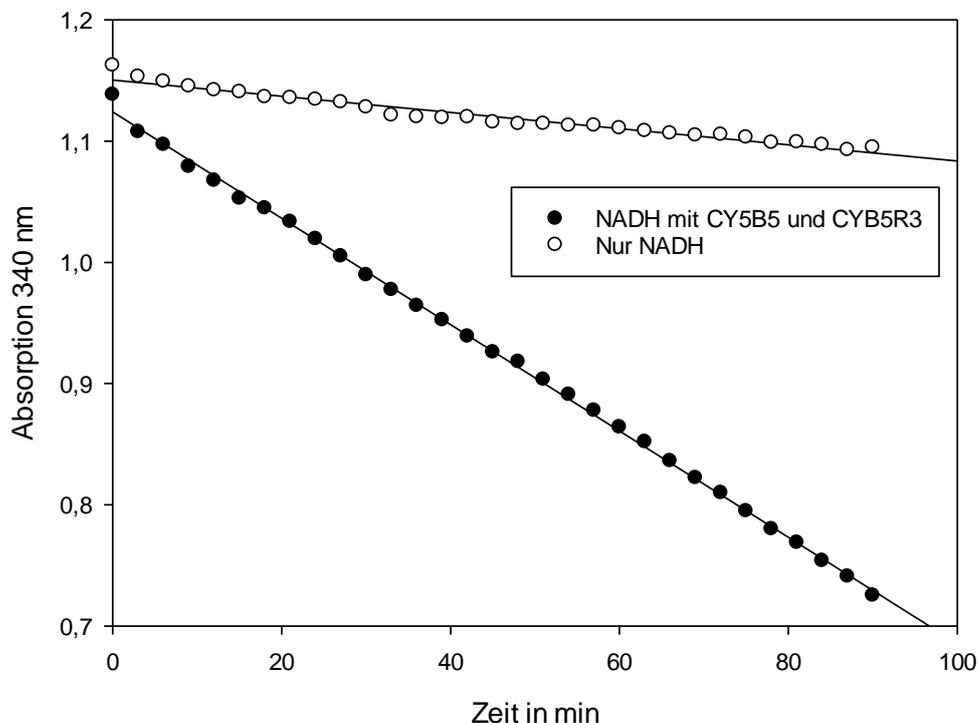


Abbildung 4.3: Langzeitversuch Substratunabhängige Oxidation von NADH.

Während die Inkubation mit CYB5B und CYB5R3 einen Absorptionsunterschied von  $-0,0044 \text{ min}^{-1}$  (entspricht ca.  $0,7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) aufweist, liegt der Wert bei der Inkubation von nur NADH bei  $-0,0007 \text{ min}^{-1}$  (entspricht ca.  $0,11 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Zudem ist anhand der linearen Regression zu sehen, dass der Prozess während der gesamten Inkubationszeit gleichmäßig abläuft.

#### 4.1.4 Anaerober Verbrauch von NADH

Um den Einfluss von Sauerstoff auf den Grundverbrauch durch CYB5B und CYB5R3 zu überprüfen, wurden einige Versuche unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde eine Quarzküvette mit Schliffverschluss vollständig mit MES-Puffer befüllt. Anschließend wurde NADH (in unterschiedlichen Konzentrationen) sowie CYB5B und CYB5R3 zugegeben. Gelöster Sauerstoff in dem Ansatz wurde danach mittels Argonbegasung entfernt. Der Versuchsansatz wurde fest verschlossen und mit Parafilm gesichert. Es folgte einer Vermessung über Nacht mit einem Messabstand von 10 min (Abbildung 4.4.).

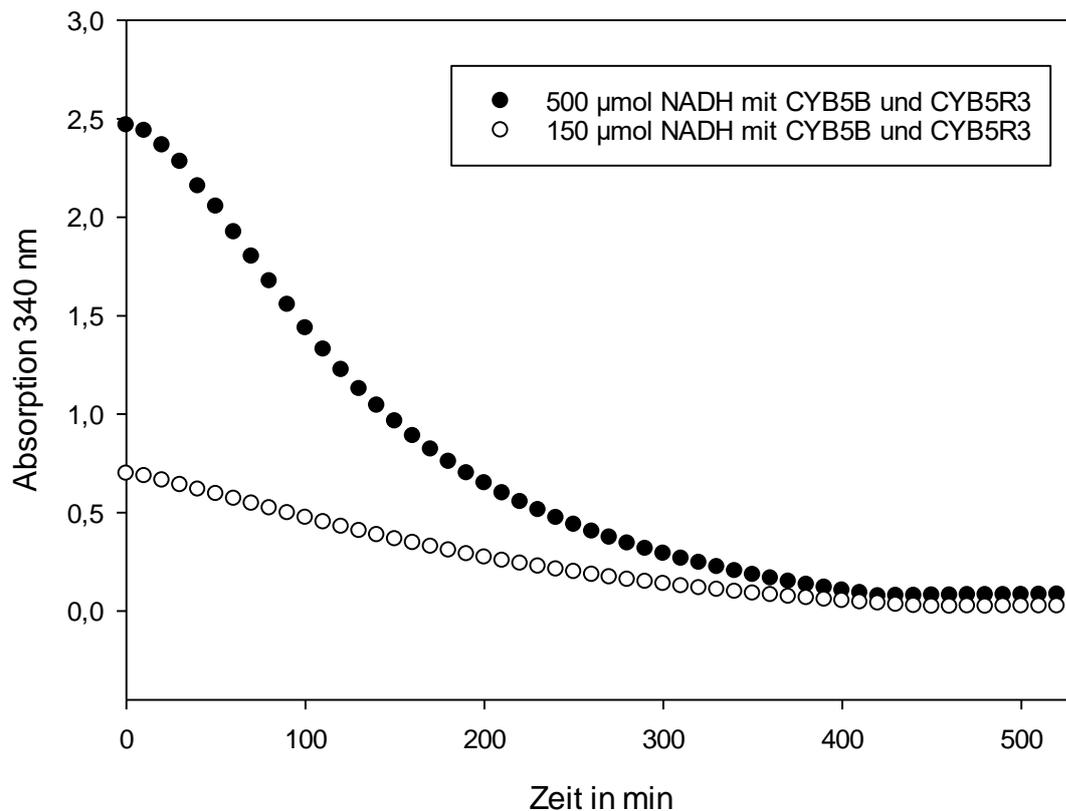


Abbildung 4.4: Anaerobe Versuchsreihe mit unterschiedlichen Ausgangsmengen NADH.

Bei der Vermessung der höheren Konzentration von NADH (500  $\mu\text{mol}$ ) zeigt sich ein leicht sigmoidaler Verlauf. Der Verlauf der Kurve des 150  $\mu\text{mol}$  Ansatzes hingegen erscheint linear. Bei beiden Inkubationen wurde das NADH über die Zeit komplett oxidiert. Betrachtet man den Verbrauch über die ersten 200 min der 150  $\mu\text{mol}$  Inkubation, zeigt sich ein Absorptionsunterschied von  $-0,0022 \text{ min}^{-1}$ . Dies entspricht der Hälfte des Verbrauchs aus der Versuchsreihe aus Kapitel 4.1.3 unter aeroben Bedingungen. Dieses Resultat spiegelt sich aufgrund des unterschiedlichen Verlaufs nicht in der 500  $\mu\text{mol}$  Inkubation wider. Diese Beobachtung kann einerseits konzentrationsabhängig sein oder andererseits sich durch einen unterschiedlichen Sauerstoffgehalt ergeben (beispielsweise resultierend aus einer ungenügenden Entfernung des Restsauerstoffs im 500  $\mu\text{mol}$  Ansatz). Im Vergleich zu dem Versuch 4.1.3. zeigt der 150  $\mu\text{mol}$  Ansatz jedoch deutlich einen Einfluss von Sauerstoff auf die Oxidation von NADH in Gegenwart von CYB5B und CYB5R3. Da die weiteren Untersuchungen von Reduktionen durch das mARC-Enzymsystem nicht unter Ausschluss von Sauerstoff stattfinden sollten, wurden daher stets Kontrollversuche begleitend durchgeführt, welche den Grundumsatz von NADH durch CYB5B und CYB5R3 gemessen haben. Dieser wurde danach für die Berechnung der Umsatzrate für die einzelnen Substrate subtrahiert.

## 4.2 Substrate/funktionelle Gruppen mit *N-O*-Bindung

### 4.2.1 Theoretische Grundlagen

Die erstmalige Entdeckung des mARC-Enzymsystems erfolgte auf Grundlage der Aufklärung der Reduktion von *N*-oxygenierten Verbindungen [36]. Seitdem konnten eine Vielzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen mit einer mARC-abhängigen Reduktion in Verbindung gebracht werden. Hierbei stellt mARC den Gegenspieler für oxidative Enzyme dar, wie den FMOs (flavinhaltige Monooxygenasen) oder CYP450, welche *N*-Oxygenierungen katalysieren können [70, 71]. Dabei sind die *N*-oxygenierten Formen von verschiedenen funktionellen Gruppen, bedingt durch eine erhöhte Reaktivität, häufig für den Menschen toxischer als die reduzierte Form. So können beispielsweise die oxidierte Form von primären Aminen Konjugate mit Estern in der Phase II-Reaktion bilden. Diese wiederum sind instabil und können zu Arylnitreniumionen zerfallen, welche ein erhebliches Potential haben, DNA-Schäden hervorzurufen [72]. Somit stellt die Reduktion in diesen Fällen eine Detoxifizierung dar. Im Folgenden wird auf die unterschiedlichen funktionellen Gruppen mit *N-O*-Bindung näher eingegangen.

## 4.2.2 Hydroxyharnstoff und Derivate

### 4.2.2.1 Einführung

Die Gruppe der Hydroxyharnstoffderivate wurde bislang noch nicht auf eine mARC-abhängige Reduktion untersucht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu Hydroxamsäuren (bekannte mARC-Substrate), stellen Hydroxyharnstoffderivate jedoch eine interessante Gruppe für eine Untersuchung der Reduzierbarkeit durch mARC dar. Als Arzneistoffe mit dieser Struktur sind Hydroxyharnstoff und Zileuton bekannt, welche im Folgenden näher charakterisiert werden.

### 4.2.2.2 Hydroxyharnstoff

Hydroxyharnstoff ist ein seit 1967 etablierter Arzneistoff und gehört zu der WHO Liste der unentbehrlichen Arzneistoffe für die Indikation chronische myeloische Leukämie (CML) (Stand April 2019) [73]. Der Arzneistoff wird zudem bei den Erkrankungen Polycythaemia vera und der Sichelzellenanämie eingesetzt [74]. Trotz dieser langen Zulassung und dem Einsatz bei unterschiedlichen Krankheitsbildern, ist über den Metabolismus von Hydroxyharnstoff nur wenig bekannt. So wird beispielsweise in der Fachinformation des Fertigarzneimittels Litalir® der Firma Bristol-Myers Squibb über die Pharmakokinetik von Hydroxyharnstoff wörtlich geschrieben (Hydroxycarbamid ist hier synonym zu Hydroxyharnstoff verwendet worden):

„Informationen über die pharmakokinetischen Eigenschaften sind begrenzt. Hydroxycarbamid wird gut resorbiert und ist bei oraler Applikation vollständig bioverfügbar. Nach oraler Gabe werden in 0,5 bis zu 2 Stunden maximale Plasmakonzentrationen erreicht. Hydroxycarbamid wird teilweise durch renale Exkretion ausgeschieden. Der Beitrag dieses Ausscheidungswegs zur gesamten Ausscheidung von Hydroxycarbamid ist unklar, da die Anteile der gegebenen Dosis, die im Urin wiedergefunden wurden, von 9 bis 95 % reichten. Die Metabolisierung von Hydroxycarbamid im Menschen wurde nicht untersucht“ [75].

Eine solche Spanne in der Wiederfindungsrate von dem Originalhersteller deutet auf eine ungenügende Untersuchung des Sachverhaltes hin. Frühe Arbeiten zu dem Thema zeigten anhand von radioaktiv markierten <sup>14</sup>C Hydroxyharnstoff eine Reduktion zum Harnstoff im Mausmodell [76]. Das zugehörige Enzym konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden. Klinische Daten in anderen Publikationen zeigten, dass es auch zu einer Hydroxyharnstoff Resistenz kommen kann, welche sich auf das klinische Outcome negativ auswirkt [77]. Überraschend ist auch im Zusammenhang mit der Fachinformation und den klinischen Daten die Dosierungsempfehlung von Hydroxyharnstoff bei der CML. So wird hier in der Anfangsphase eine Konzentration von 40 mg/kg Körpergewicht empfohlen. Aufgrund der sehr geringen molaren Masse von Hydroxyharnstoff (76 g/mol) resultiert dies in sehr hohen molaren Plasmakonzentrationen, die benötigt werden, um im therapeutischen Bereich für Hydroxyharnstoff zu gelangen. Es konnten Plasmakonzentrationen von bis zu 300 µM nach

oralen Applikation im Patienten gefunden werden [78] (zum Vergleich Plasmakonzentration von gängigen Arzneistoffen: Metoprolol 2,67 nM [79], Loratadin 14,6 nM [80]). Aufgrund des Mangels an Daten zum Metabolismus bei einer Verbindung, welche über eine *N-O*-Bindung verfügt, die gleichzeitig mangels Chromophor ohne Derivatisierung schwer durch HPLC zu untersuchen ist (Edukt und Produkt), stellte Hydroxyharnstoff den idealen Kandidaten zur Untersuchung mithilfe des NADH-Assays dar.

Hydroxyharnstoff wurde in einer Konzentration von 3 mM mithilfe des Standardprotokolls aus 3.1.1 getestet. Für mARC1 wurde zudem die Kinetik nach der Methodik aus 3.4.1 bestimmt.

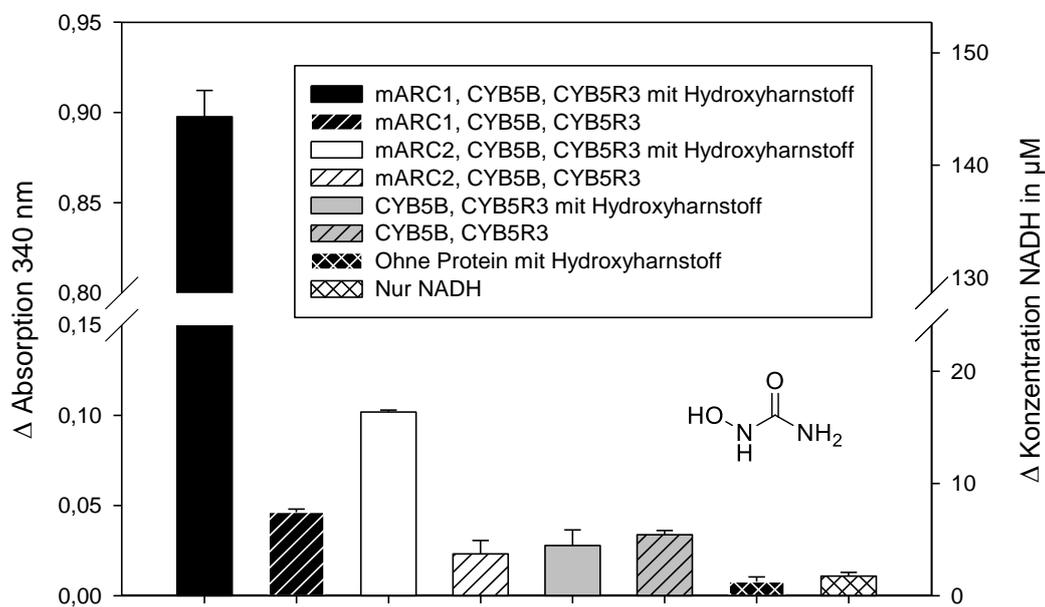


Abbildung 4.5: NADH-Assay Ergebnisse von einer Hydroxyharnstoff Inkubationsreihe nach 3,5 min.

Die Ergebnisse aus dem NADH-Assay (Abbildung 4.5) zeigten eine deutlich höhere Umsetzung von Hydroxyharnstoff durch mARC1 als durch mARC2. Bereits nach 3,5 min war bei der mARC1-Inkubation das vorhandene NADH komplett aufgebraucht. Im Gegensatz dazu, war auch nach 15 min nur ein geringer Teil NADH durch mARC2 verbraucht (Abbildung 4.6).

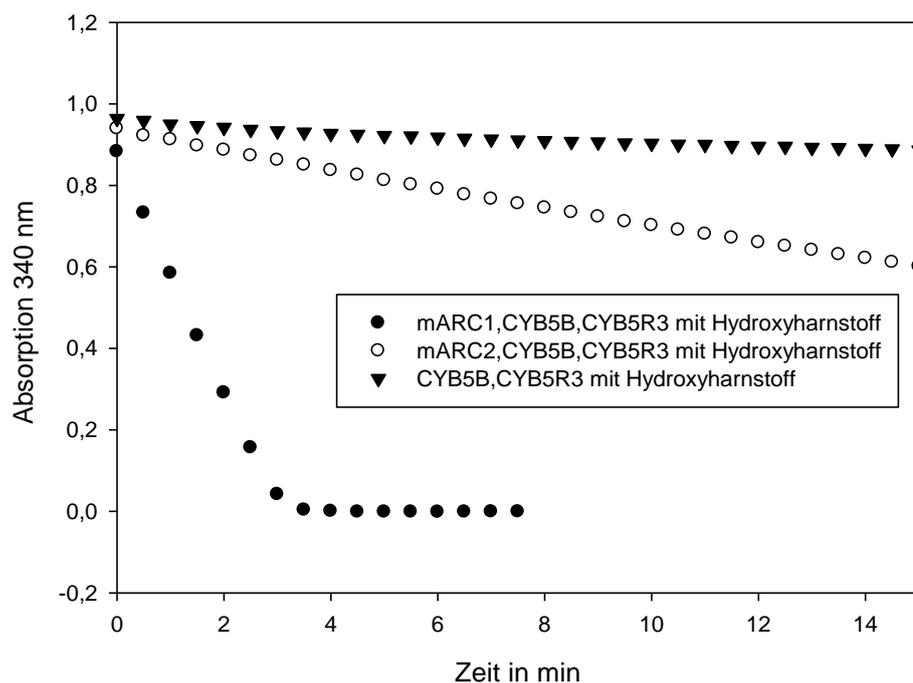


Abbildung 4.6: Vergleich einer mARC1, mARC2 und Kontrollinkubation über 15 min.

Daraus resultierte eine Umsetzungsrate von  $471,5 \pm 8,9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  für mARC1 und  $34,4 \pm 0,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  für mARC2 respektive. Eine Untersuchung durch die LC-MS war aufgrund des geringen Molekulargewichtes nicht ohne Derivatisierung möglich. Daher wurde die Methode zur Bestimmung der Reinheit von Hydroxyharnstoff aus der *Pharmacopoea Europaea* [81] als zweite Detektionsmethode ausgewählt (aufgeführt in Kapitel 3.1.5). Es konnte sowohl bei der mARC1 als auch bei der mARC2 Probe der reduzierte Harnstoff anhand der Referenzproben aus Harnstoff und Hydroxyharnstoff detektiert werden, wobei die Intensität der gelblichen Färbung für die mARC1 Proben wesentlich stärker zu sehen war als die von den mARC2 Proben (Reaktionsprodukt von Harnstoff und dem Ehrlich Reagenz). Die Kontrollen mit nur CYB5B und CYB5R3 zeigten lediglich einen Spot, welcher sich auf der Höhe des Referenzstandards von Hydroxyharnstoff befand.

Aufgrund der hohen Umsetzungsrate wurde für mARC1 eine Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt, um die kinetischen Parameter zu bestimmen. Für mARC2 war dies aufgrund der niedrigen Umsetzungsrate nicht möglich.

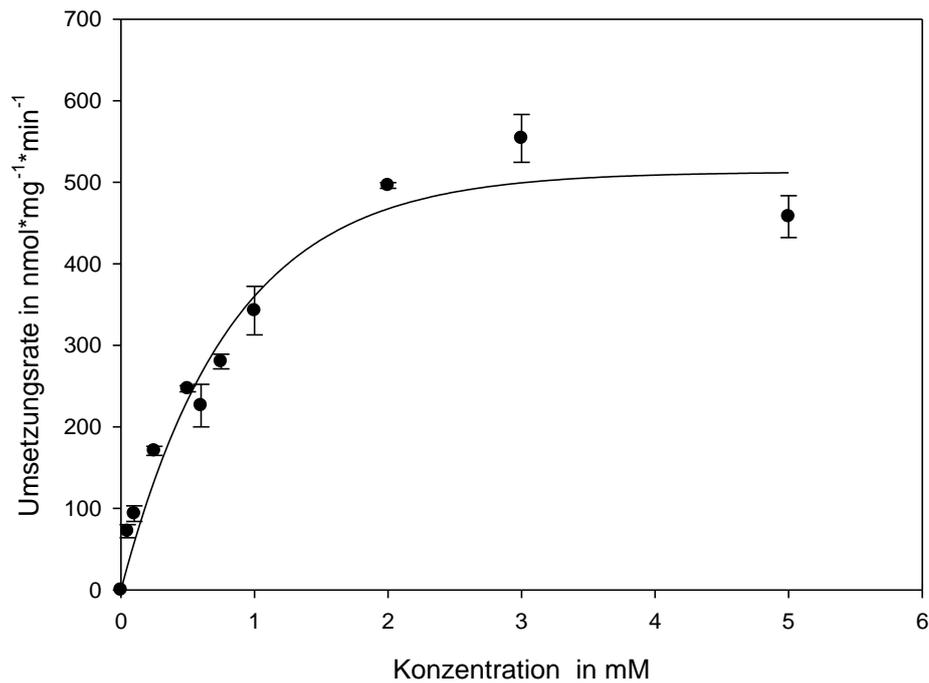


Abbildung 4.7: Michaelis-Menten-Kinetik von mARC1 mit Hydroxyharnstoff.

Tabelle 4.1: Enzymatische Kennziffern der Reduktion von Hydroxyharnstoff durch mARC1.

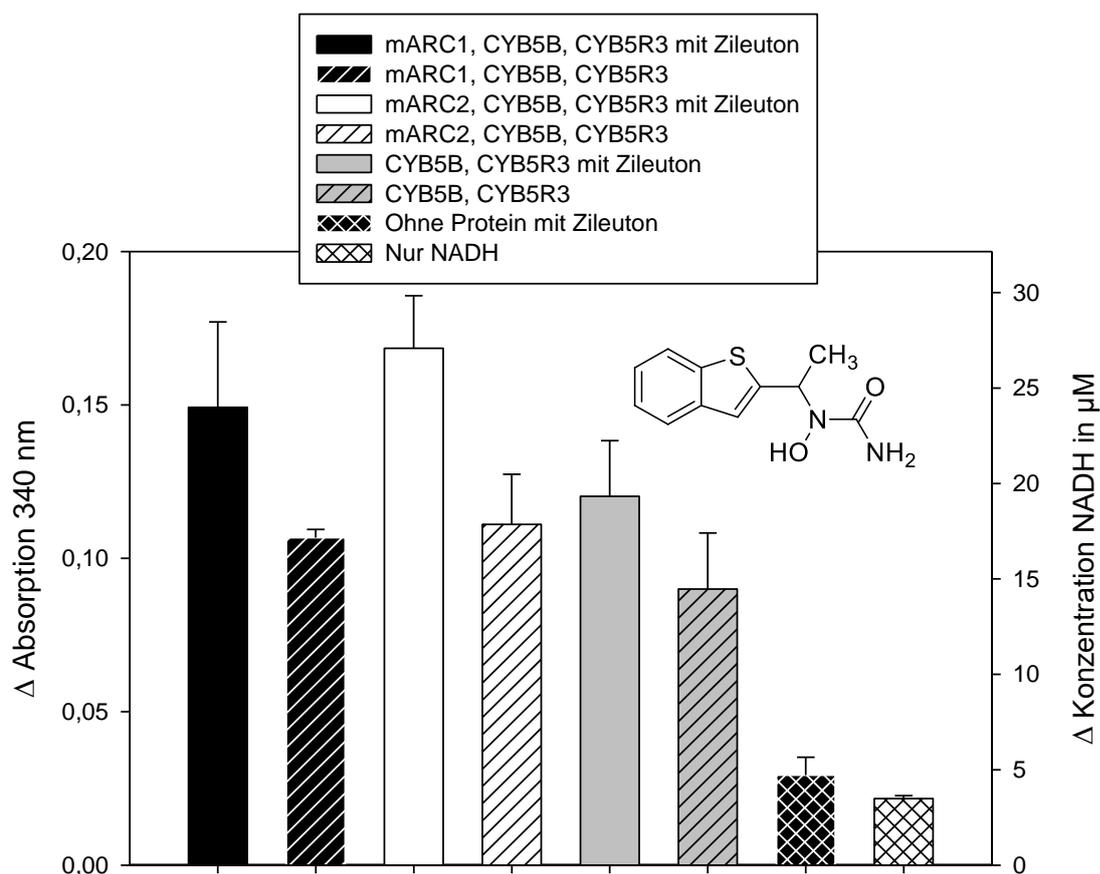
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{kat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$Kat_{\text{eff}}$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
mARC1	566	511	42,6	$7,5 \cdot 10^4$

Die gezeigten Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll, dass mARC1 im Falle von Hydroxyharnstoff für den gefundenen Metabolismus zum Harnstoff verantwortlich ist. Die hohen Umsetzungsraten für mARC1 sind vergleichbar mit dem Modellsubstrat BAO, welches *in vivo* praktisch vollständig reduziert wird [82]. Der  $K_m$ -Wert von 566  $\mu\text{M}$  ist ebenfalls relativ nahe an den im Patienten gefundenen Plasmakonzentrationen (50  $\mu\text{M}$  – 300  $\mu\text{M}$ ) [78]. Der Zusammenhang mit den ungewöhnlich hohen Dosierungen von Hydroxyharnstoff wird deutlich. Man kann davon ausgehen, dass diese benötigt werden, um trotz des starken Metabolismus durch mARC noch eine hinreichende Plasmakonzentration an Hydroxyharnstoff zu erreichen. Interessant wäre auch in diesem Zusammenhang eine klinische Untersuchung der Patientenpopulation, welche resistent gegenüber Hydroxyharnstoff ist. Hierbei, sowie auch in der allgemeinen Patientenpopulation, könnte eine Untersuchung zwischen dem jeweiligen

Ansprechen der Therapie und der individuellen mARC-Aktivität von Interesse sein. Sollte im Rahmen einer Studie ein Zusammenhang festgestellt werden, wäre dies ein Beispiel für eine Patientengruppe, welche von einem mARC-Inhibitor profitieren könnte.

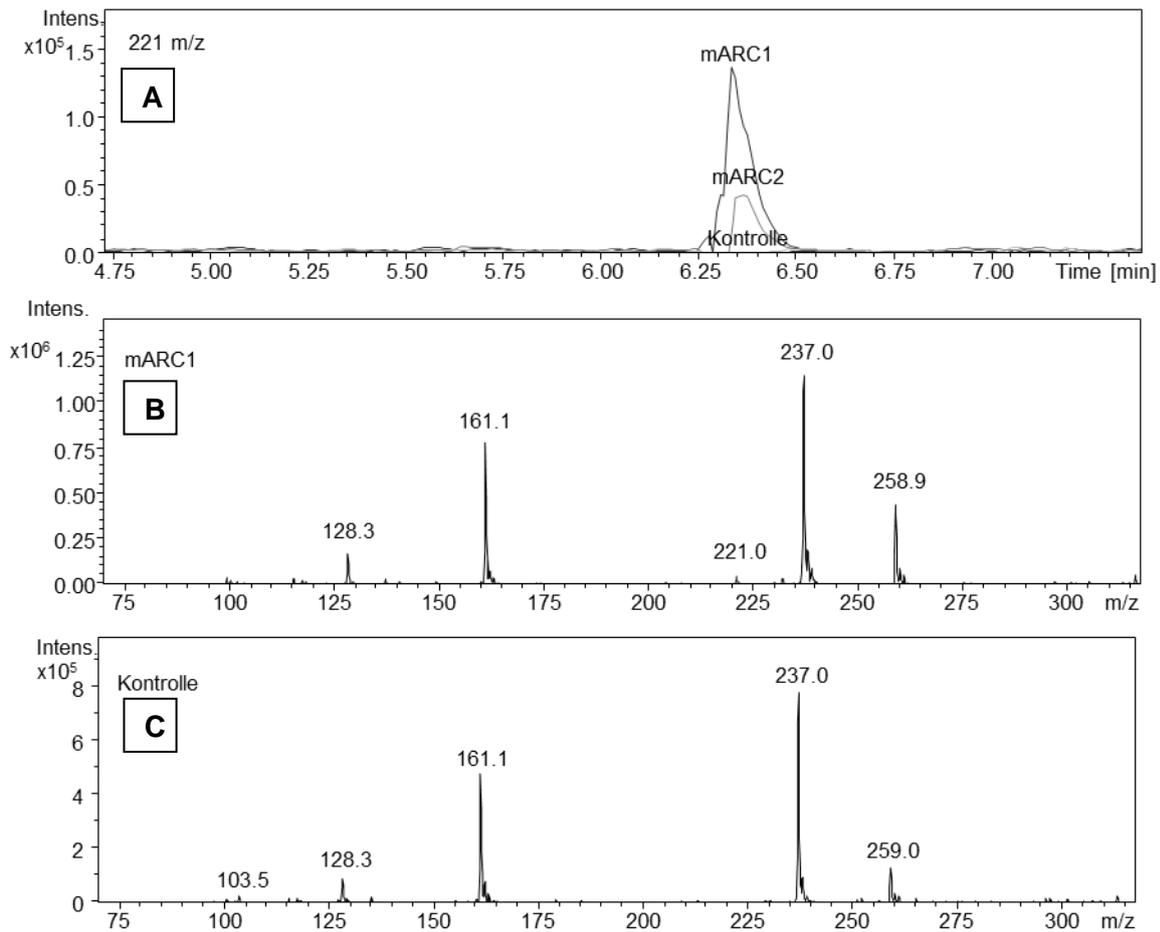
#### 4.2.2.3 Zileuton

Zileuton ist ein etablierter Arzneistoff in der Asthmatherapie. Als Inhibitor der 5-Lipoxygenase im Leukotrienweg wirkt Zileuton anti-inflammatorisch auf das Krankheitsgeschehen [83]. Daten aus Plasmakonzentrationsbestimmungen zeigten, dass etwa 25 % der eingenommenen Dosis von Zileuton als *N*-dehydroxylierter Metabolit Abbott-66193 vorlagen. Als Ursache für die Reduktion wurde hierbei das Mikrobiom im Darm identifiziert [84]. Auf Grundlage der Ergebnisse zu Hydroxyharnstoff sollte der Frage nachgegangen werden, ob mARC eine relevante Rolle im Metabolismus zu Abbott-66193 innehat. Es wurde in einer Konzentration von 1 mM nach der beschriebenen Methode aus 3.1.1 vermessen. Eine Kontrolle der erhaltenen Ergebnisse erfolgte anhand der LC-MS-Methodik nach 3.2.1.



**Abbildung 4.8: NADH-Assay Ergebnisse von einer Zileuton Inkubationsreihe nach 15 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.

Der Unterschied der mARC1- und mARC2-Inkubationen zu den jeweiligen Kontrollen war nicht signifikant, sodass aus diesem Resultat alleine nicht zu deuten war, ob es sich bei Zileuton um ein mARC-Substrat mit eher niedriger Umsetzungsrate handelt oder ob es keinerlei Umsetzung durch mARC gegeben hat. Demnach wurde ein besonderes Augenmerk auf die Resultate der LC-MS-Methodik gegeben.



**Abbildung 4.9: LC-MS-Analytik von verschiedenen Zileuton-Inkubationen.** Grafik A zeigt die Peaks von reduzierten Zileuton (221 m/z) der unterschiedlichen Inkubationen. Für die Kontrollinkubation ist bei Minute 6,3 kein Peak, welcher sich signifikant vom Grundrauschen abhebt, zu detektieren. Grafik B zeigt das Massenspektrum von einer mARC1-Inkubation zwischen der 6 min und 7 min. Grafik C zeigt das Massenspektrum von einer CYB5B- und CYB5R3-Inkubation zwischen der 6 min und 7 min.

Die Daten aus der LC-MS-Untersuchung (Abbildung 4.9.) zeigten ein Signal bei 221 m/z für die mARC1- und die mARC2-Inkubationen, jedoch nicht für die Kontrolluntersuchungen mit CYB5B und CYB5R3. Dieses entspricht den  $[M+H]^+$  von dem reduzierten Zileuton. Da dieses Signal weit über dem Signal-Rausch-Verhältnis lag, konnte eine Reduktion bestätigt werden, sodass auch die Ergebnisse aus dem NADH-Assay für eine Umsetzungsrate herangezogen werden konnten. Die berechneten Umsetzungsraten lagen für mARC1 bei  $6,1 \pm 4,0 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  im NADH-Assay und auf  $2,3 \pm 1,0 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  per LC-MS

ermittelt. Die Umsetzungsraten für mARC2 beliefen sich auf  $8,3 \pm 2,5 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  im NADH-Assay und auf  $0,9 \pm 0,4 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  per LC-MS ermittelt. Der große Unterschied zwischen den gemessenen Umsetzungsraten der beiden Verfahren im Fall von Zileuton liegt an dem LC-MS-Verfahren, welches bei sehr niedriger Umsetzungsrate falsch niedrige Werte liefert. Dies ist damit zu begründen, dass die jeweiligen Isotopenpeaks sich nicht mehr signifikant von dem Rauschen abheben. Im Vergleich zu den zuvor gezeigten Daten von Hydroxyharnstoff zeigt Zileuton eine um den Faktor 77 geringere Umsetzungsrate für mARC1 und eine um den Faktor 4 geringere Umsetzungsrate für mARC2. Dies zeigt, dass die Derivatisierung an dem Stickstoff eine immense Auswirkung für die Stabilität gegenüber der Reduktion durch mARC hat. Dies könnte zum einen aus sterischen Gründen in der Bindetasche, im speziellen bedingt durch den großen Unterschied bei mARC1, der Fall sein, zum anderen könnte die Derivatisierung eine veränderte Reaktivität der *N*-O-Bindung bewirken. Der direkte Vergleich zwischen diesen beiden Arzneistoffen gibt Hinweise für die Verbesserung der Stabilität gegenüber mARC für die Arzneistoffentwickler. Hierbei kann analog zu den Beobachtungen, die bei *Ginsel et al.* für Hydroxamsäuren gemacht wurden [40], gezeigt werden, dass die unsubstituierten Verbindungen deutlich besser umgesetzt werden als die substituierten. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für Struktur-Wirkungsbeziehungen von mARC-Substraten. Ebenfalls könnte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die bakteriellen Enzyme (wie beispielsweise die Molybdoenzyme YcbX oder yiiM [85]), welche dazu führen, dass Abbott-66193 als ein Hauptmetabolit zu finden ist, einen anderen Mechanismus der *N*-O-Reduktion besitzen. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass mARC nur einen geringen Beitrag zu dem Metabolismus von Zileuton zu Abbott-66193 leistet und die bakteriellen Enzyme entscheidend sind

### **4.2.3 N-Oxide**

#### **4.2.3.1 Einführung**

Die funktionelle Gruppe der *N*-Oxide wurde in der Vergangenheit bereits auf eine Reduktion durch mARC untersucht. Das besondere hierbei war, dass im Gegensatz zu allen sonstigen bis dahin geprüften funktionellen Gruppen, alle getesteten Vertreter nur von mARC1 reduziert werden konnten [41, 86]. *N*-Oxide kommen in der Natur als Osmolyt in Fischen vor. Die dafür verantwortliche Substanz, das TMAO, stellt ebenfalls ein mARC-Substrat dar und ist beim Menschen mit einem kardiovaskulären Risiko verbunden [86]. *N*-Oxide kommen in vielen Naturstoffen und auch als Arzneistoffmetabolite vor. Da diese permanent geladen vorkommen [87] und bislang nur durch mARC1 reduziert werden, können weitere Untersuchungen zu dieser funktionellen Gruppe interessante Einblicke in die Unterschiede der Struktur-Aktivitätsbeziehung von mARC1 und mARC2 liefern.

#### 4.2.3.2 Senecivernin-N-oxid

Die Pyrrolizidinalkaloide (PA) umfasst eine Gruppe von über 660 unterschiedlichen sekundären Pflanzenstoffen, welche in über 6000 Pflanzenspezies, vornehmlich in den *Asteraceae*, *Boraginaceae* und *Fabaceae*, vorkommen. Funktionell dienen die Stoffe als Fraßschutz vor Fressfeinden und sind auch für den Menschen toxisch. Hauptaufnahmekquellen sind dabei Verunreinigungen im Honig und unterschiedlichen Teesorten [88]. Die PAs werden durch den Metabolismus in der Leber von Menschen und Nutztieren gegiftet und sind akut vor allem hepatotoxisch [89]. Bei einer chronischen Einnahme sind PAs teratogen und karzinogen und können unter anderem zu Leberzirrhose führen. Untergliedert werden die PAs in vier Hauptgruppen: Retronecin-Typ, Heliotridin-Typ, Otonecin-Typ und Platynecin-Typ (Abbildung 4.10). Wobei diese Untergliederung sich auf die Necinbase bezieht, welche an einer oder beiden Alkoholpositionen jeweils mit einer Necinsäure verestert sind um das vollständige PA zu bilden [88].

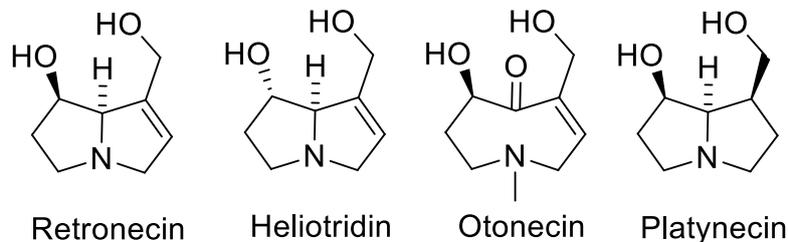
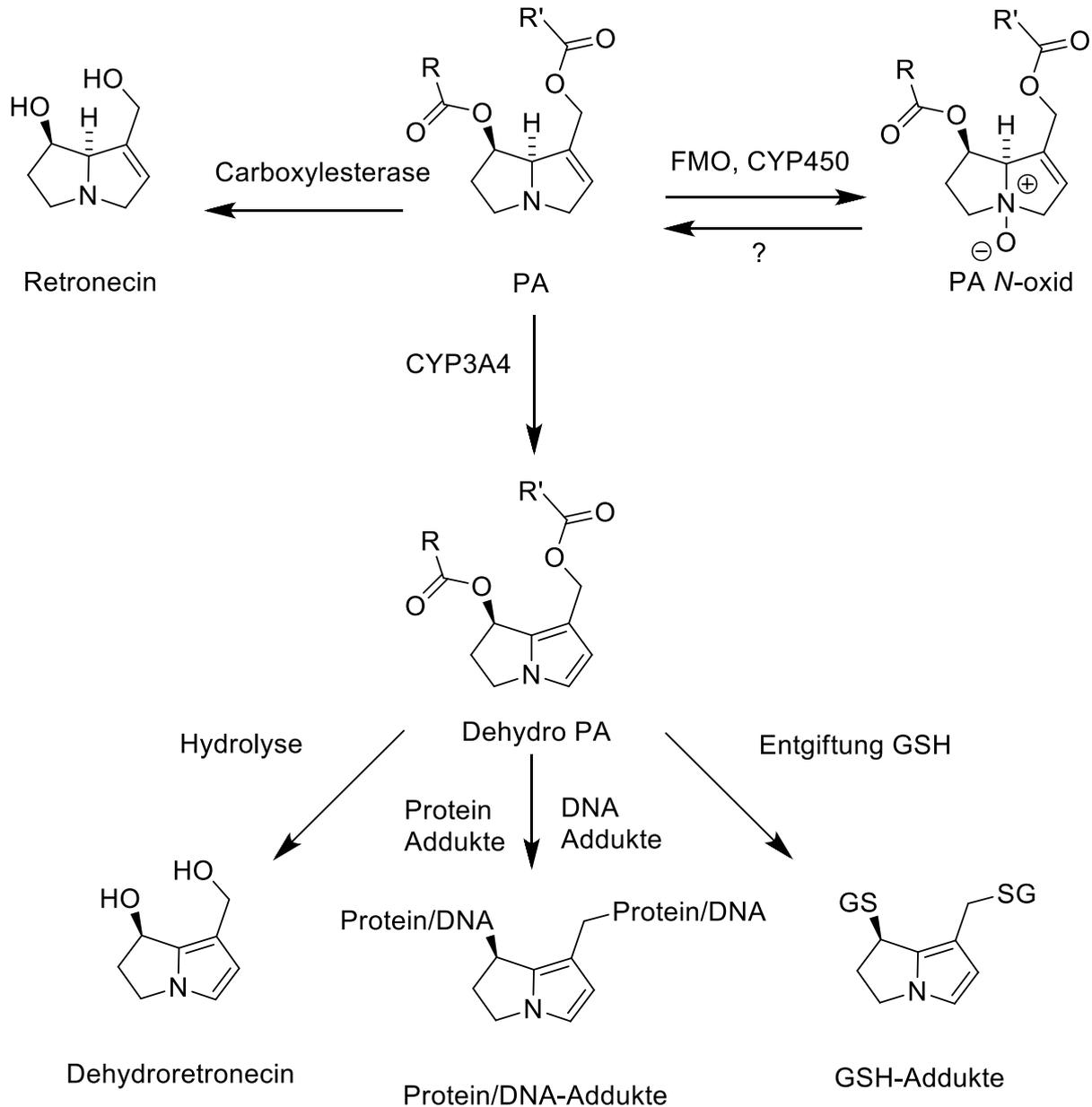


Abbildung 4.10: Die vier Hauptgruppen der Necinbasen von Pyrrolizidinalkaloiden.

PAs liegen in der Pflanze in der Speicherform als *N*-Oxid vor und werden nach oraler Aufnahme schnell im Gastrointestinaltrakt reduziert und dann resorbiert. Zur Entgiftung können die PAs von CYP-Enzymen und FMOs wieder zum *N*-Oxid oxidiert werden und somit ausgeschieden werden [90]. Einige Insektenarten wie die Heuschreckenart *Zonocerus Variegatus* besitzen evolutionsbedingt spezialisierte FMOs, welche es ermöglichen PAs rasch zu oxidieren und selbst als Speicherform gegen eigene Fressfeinde als *N*-Oxid zu akkumulieren [91].

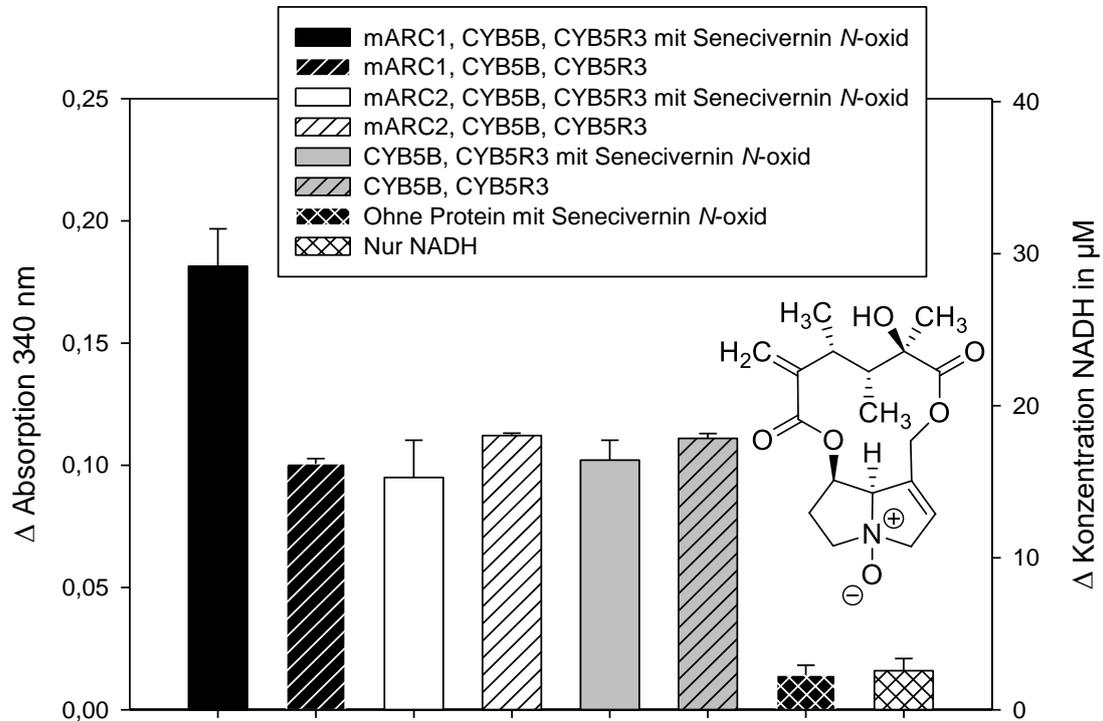
Im Menschen folgt die Toxifizierung vornehmlich, wenn auch nicht ausschließen, durch CYP3A4. Dieser oxidiert das PA zum Dehydro-PA, welches bedingt durch eine hohe Reaktivität, Addukte mit Proteinen oder DNA bilden kann (Abbildung 4.11). Eine Entgiftung der Dehydro-PAs erfolgt durch GSH [92]. Es konnte in diversen Studien der Metabolismus von dem Ausgangs-PA zum *N*-Oxid *in vivo* bewiesen werden [93]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Reduktion zum PA *in vivo* in Leber und Darm [94, 95] sowie *in vitro* mithilfe von mikrosomalen humanen Leberfraktionen stattfindet [96]. Dies wird allgemein als

Aktivierungsweg für die Giftung anerkannt [92, 97]. Jedoch konnten bis dato die verantwortlichen Enzyme für die Reduktion im Menschen nicht identifiziert werden. Da für mARC bereits die Reduktion von diversen *N*-Oxiden verifiziert werden konnte [41] sollte auch eine mögliche Reduktion von PA-*N*-Oxiden durch mARC untersucht werden.



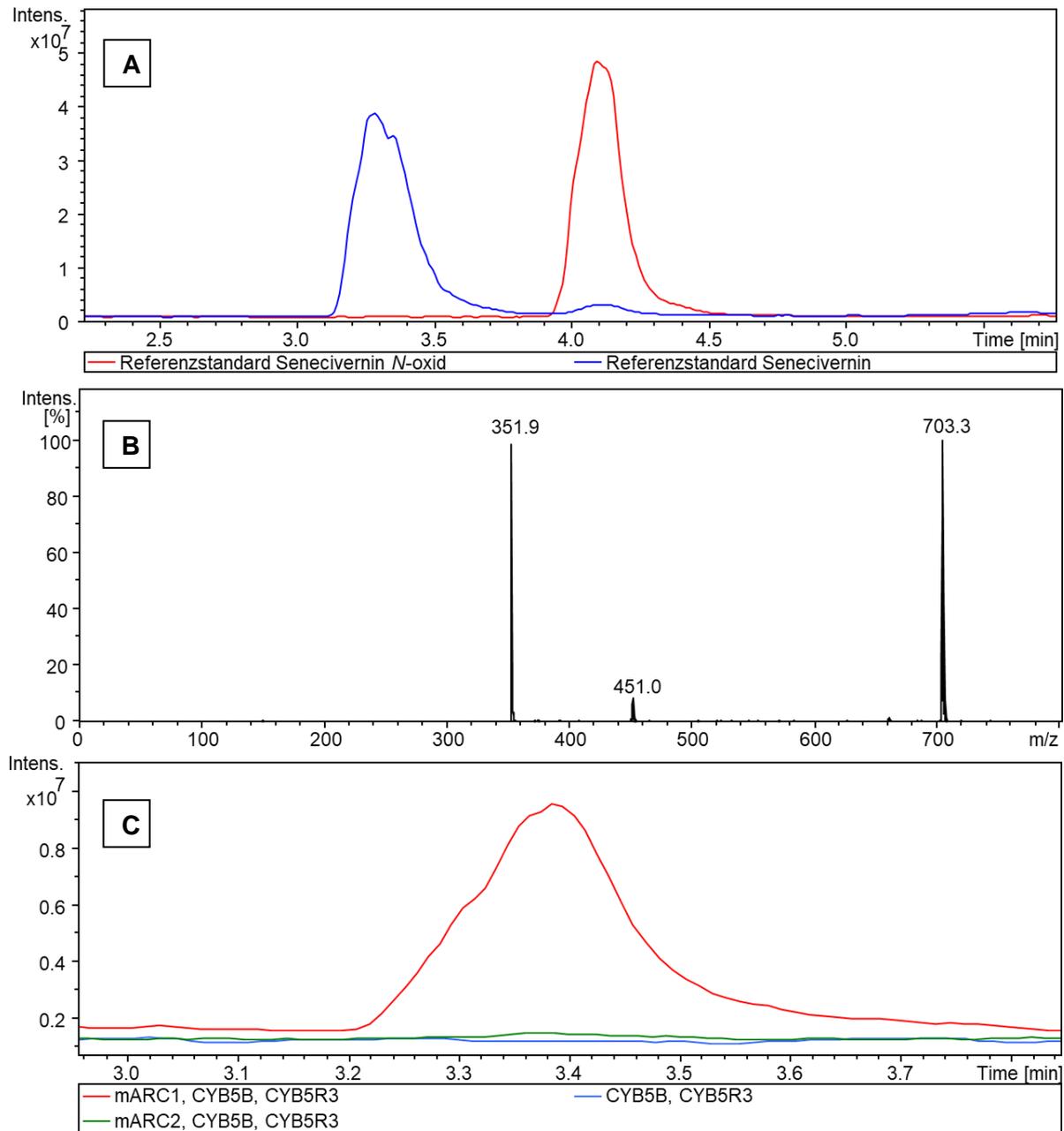
**Abbildung 4.11: Vereinfachte Darstellung des Metabolismus von einem PA des Retronecin-Typs nach Xu et al. [92].** Nicht dargestellt ist jeweils die Necinsäuren (durch R abgekürzt). Zudem ist der Metabolismus über UGT mit einer *N*-Glucuronidierung nicht dargestellt. Die Addukte mit Protein, DNA und GSH können sich jeweils an nur einer oder an beiden der dargestellten Positionen bilden.

Stellvertretend für die Gruppe der PA (genauer Retronecin-Typ) wurde Senecivernin-*N*-oxid nach den Methoden 3.1.1 und 3.2.1 untersucht. Als Ausgangskonzentration wurde 1 mM gewählt.



**Abbildung 4.12: NADH-Assay Ergebnisse von einer Senecivernin-*N*-oxid Inkubationsreihe nach 15 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.

Die erzielten Ergebnisse zeigten, wie erwartet, lediglich eine Umsetzung mit mARC1. Im Vergleich zu bekannten Umsetzungen von *N*-Oxiden ist die Umsetzungsrate eher niedrig. Diese konnte auf  $12,3 \pm 3,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  beziffert werden. Für eine ausführlichere Untersuchung wurde mithilfe der Referenzsubstanz von Senecivernin und Senecivernin-*N*-oxid eine LC-MS-Methode auf Basis von Abschnitt 3.2.1. etabliert.



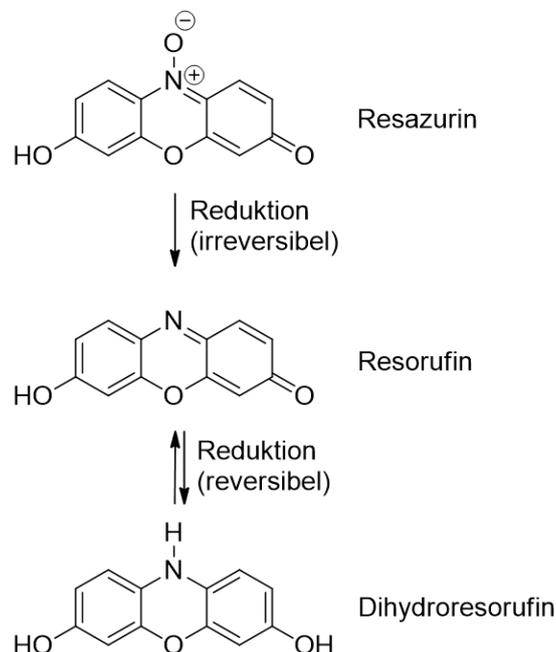
**Abbildung 4.13: LC-MS-Untersuchung von Senecivernin und Senecivernin-N-oxid.** Grafik A zeigt, die Spektren von den beiden Referenzsubstanzen, welche bei einem Gradienten über 30 min basisliniengetreunt vorliegen. Grafik B zeigt das Massenspektrum von der Referenzsubstanz Senecivernin-N-oxid mit dem 351,9 [M+H]<sup>+</sup>-Peak und dem 703,3 [2M+H]<sup>+</sup>-Peak sowie einer Verunreinigung bei 451 m/z. Deutlich zu sehen ist, dass keinerlei Verunreinigung mit der reduzierten Form (336 m/z) vorliegt. Grafik C zeigt die Gegenüberstellung der Inkubationen in dem Zeitraum, indem Senecivernin eluiert.

Auch mit der LC-MS-Methode konnte eindeutig bewiesen werden, dass nur mARC1 Senecivernin-N-oxid reduzieren kann. Dies ist sehr gut an der Grafik C der Abbildung 4.13 zu sehen. Hierbei zeigt lediglich die mARC1-Inkubation (in rot) einen deutlichen Peak bei Minute 3,4, welcher dem reduzierten Senecivernin entspricht. Die Umsetzungsrate konnte hierbei auf  $17,6 \pm 0,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  beziffert werden.

Im Vergleich mit anderen Substanzen ist die gefundene Umsetzungsrate eher niedrig (Abbildung 5.1), trotzdem ist es eindeutig, dass es bei Senecivernin-*N*-oxid um ein mARC1-Substrat handelt. Hier zeigt sich die erste dokumentierte Giftung durch mARC, welches sonst eine detoxifizierende Funktion innehat. Es kann damit die Entgiftung durch FMOs und CYP-Enzyme rückgängig machen, sodass mehr freies PA vorliegt. Es ist zudem die erste nachgewiesene Umwandlung eines PA-*N*-oxids durch ein humanes Enzym. Weitere Untersuchungen zu der Umsetzung der anderen drei Haupttypen von PAs wären in diesem Zusammenhang eine wichtige Erweiterung zu diesen hier gewonnenen Erkenntnissen.

#### 4.2.3.3 Resazurin

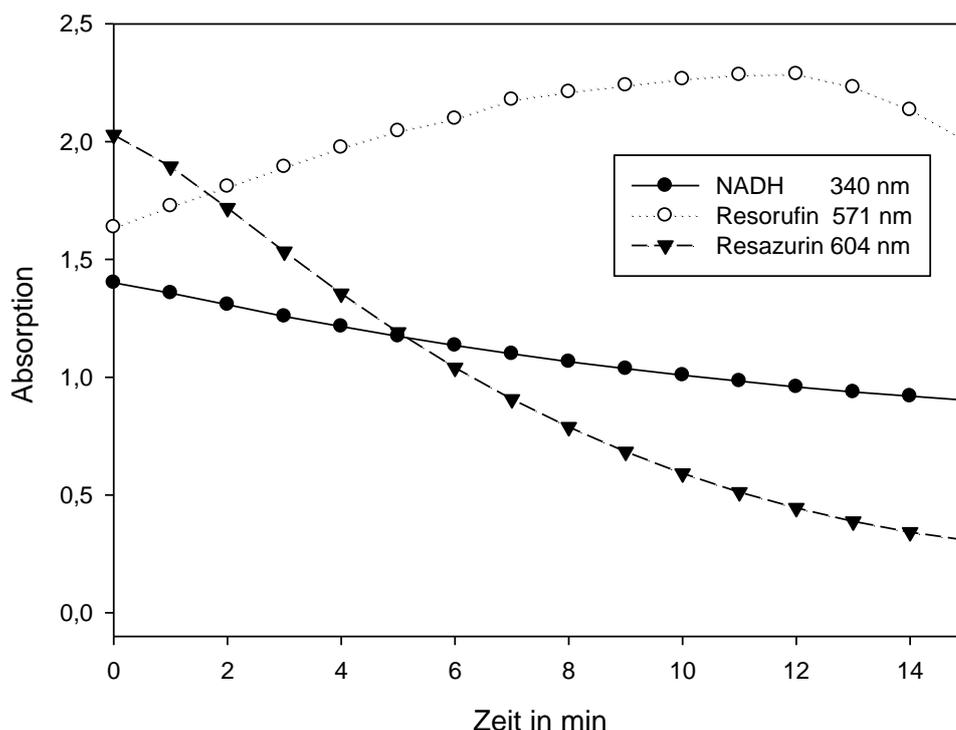
Resazurin wird zur Testung der Zellviabilität eingesetzt [98]. Lebendige Zellen können das Resazurin zum Resorufin reduzieren, welches durch eine Farbänderung sichtbar wird. Resazurin weist durch seine Struktur ein Absorptionsmaximum von 604 nm auf. Durch die Reduktion zum Resorufin gibt es einen hypsochromen Shift zu einer Wellenlänge von 571 nm. Während die Reduktion von Resazurin zu Resorufin irreversibel verläuft, kann Resorufin reversibel zu Dihydroresorufin reduziert werden, welches keinerlei Absorption im sichtbaren Licht aufweist (Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14:** Reduktion von blauem Resazurin zu pinkem Resorufin und reversibler Reduktion von pinkem Resorufin zum farblosen Dihydroresorufin.

Durch die unterschiedlichen Absorptionsmaxima der einzelnen Substanzen, wurde die Reduktion von Resazurin durch mARC nicht allein über den Bereich von 300 nm bis 400 nm evaluiert, sondern es wurde die Reduktion anhand eines Spektrums zwischen 300 nm und

800 nm nachgewiesen. Der grundsätzliche Ablauf folgte der Methode aus 3.1.1. Die eingesetzte Enzymmenge wurde auf 10 % reduziert, da ein Einsatz der üblichen Enzymkonzentrationen eine genaue Beobachtung anhand der hohen Reaktionsgeschwindigkeit nicht erlaubte (sofortige Reduktion zum farblosen Dihydroresorufin).



**Abbildung 4.15:** Zeitlicher Verlauf der Absorption bei den Wellenlängen 340 nm, 571 nm und 604 nm, welche die Absorptionsmaxima von Resazurin, Resorufin und NADH darstellen, bei einer 15 min Inkubation von Resazurin mit mARC1.

Stellvertretend für die Substanzen wurden deren Absorptionsmaxima 340 nm, 571 nm und 604 nm betrachtet. Es zeigte sich, wie erwartet, im Fall von NADH eine stetige Oxidation. Die Absorption bei 340 nm nahm über die kompletten 15 min ab. Die Ausgangssubstanz Resazurin, scheint in einem leicht sigmoidalen Verlauf abzunehmen. Da die Absorption mit der Konzentration korreliert, kann anhand der Änderung nachvollzogen werden, dass innerhalb der 15 min der Großteil vom Resazurin reduziert wurde. Eine exakte Korrelation ist nicht möglich, da Resazurin und Resorufin ebenfalls bei dem jeweiligen anderen Absorptionsmaximum eine Eigenabsorption aufweisen [99]. Die Absorption im Bereich von 571 nm nimmt innerhalb der ersten 11 min zu, jedoch im Folgenden wieder ab. Dies deutet auf die weitere Reduktion zum Dihydroresorufin hin. Eine exakte Erfassung der Kinetik war anhand der ähnlichen Absorptionsmaxima und dem simultanen Auftreten mehrerer

reduzierbarer Substrate nicht möglich. Überraschend ist, dass die hier dargestellten Ergebnisse in einer ähnlichen Umsatzrate auch für mARC2 zu sehen waren. Da bislang nur mARC1 in der Lage war *N*-Oxide zu reduzieren, stellt dies eine Ausnahme dar. Die Kontrolluntersuchungen ohne mARC resultierten darin, dass auch hier eine Umsetzung von Resazurin zu finden war, jedoch die Geschwindigkeit der Reaktion mit mARC deutlich höher war. Die gemessenen Effekte konnten auch rein visuell nachvollzogen werden. Während bei den Reaktionsansätzen mit mARC1 und mARC2 relativ schnell der Farbwechsel von blau auf pink zu erkennen war, konnte dies bei dem Ansatz mit nur CYB5B und CYB5R3 lediglich zeitverzögert und unvollständig gesehen werden.

#### 4.2.3.4 Amitriptylin-*N*-oxid und Nicotinamid-*N*-oxid

Amitriptylin-*N*-oxid und Nicotinamid-*N*-oxid wurden bereits in der Vergangenheit durch *Jakobs et al.* auf eine Reduktion durch mARC getestet [41]. Aufgrund dieser Vorarbeiten wurde von einer ausführlichen Charakterisierung abgesehen. Der Vollständigkeit halber sollen hier der Vergleich der Umsatzraten im NADH-Assay und der LC-MS-Analytik dargestellt werden. Da bei diesen Substraten nur mARC1 in der Lage ist, diese zu reduzieren, ist auch nur der Vergleich für mARC1 aufgeführt.

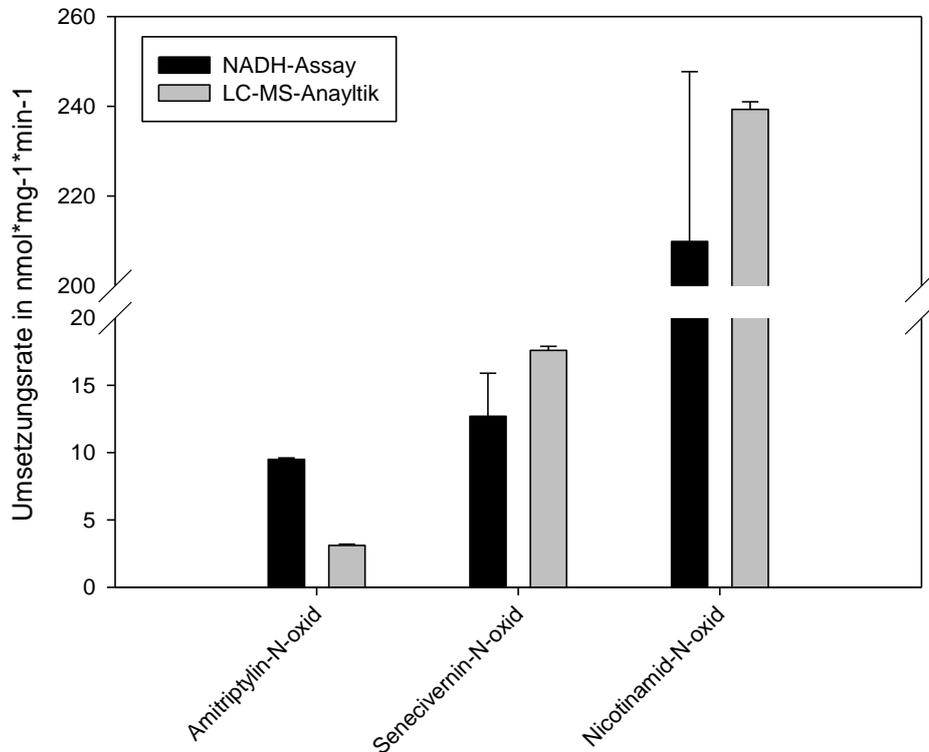


Abbildung 4.16: Vergleich der Umsatzrate von bekannten und neu getesteten *N*-oxiden für mARC1.

Die Resultate bestätigen die vorherigen Untersuchungen von *Jakobs et al.* [41]. Nicotinamid-*N*-oxid weist wesentlich höhere Umsetzungsrate für mARC1 als Amitriptylin-*N*-oxid auf. Dies konnte in beiden Verfahren bestätigt werden. Die höheren Umsetzungsrate von Nicotinamid-*N*-oxid sind jedoch nur über einen kurzen Zeitraum von 3 min in diesem Maße zu beobachten. Danach fällt die Umsetzungsrate auf das Niveau von den Kontrollen, sodass die Gesamtumsetzung von Nicotinamid-*N*-oxid nicht um den Faktor 20 (im Vergleich zu Amitriptylin-*N*-oxid) höher sind, wenn ein längerer Zeitraum betrachtet wird. Senecivernin-*N*-oxid ist in Hinblick auf die Umsetzungsrate eher vergleichbar mit Amitriptylin-*N*-oxid. Der große Unterschied zwischen den gemessenen Umsetzungsrate der beiden Verfahren im Fall von Amitriptylin-*N*-oxid liegt an dem LC-MS-Verfahren, welches bei sehr niedrigen Umsetzungsrate falsch niedrige Werte liefert. Dies ist damit zu begründen, dass die jeweiligen Isotopenpeaks sich nicht mehr signifikant von dem Rauschen abheben. Dementsprechend kann die Umsetzungsrate nicht vollständig quantifiziert werden. Daher liefert der NADH-Assay in diesem Fall genauere Daten. Die einzelnen Umsetzungsrate waren für Amitriptylin-*N*-oxid  $9,5 \pm 0,1 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  via NADH-Assay und  $3,1 \pm 0,1 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  via LC-MS, für Nicotinamid-*N*-oxid  $209,9 \pm 37,8 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  via NADH-Assay und  $239,3 \pm 1,7 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  via LC-MS (Senecivernin-*N*-oxid vorher bereits gezeigt).

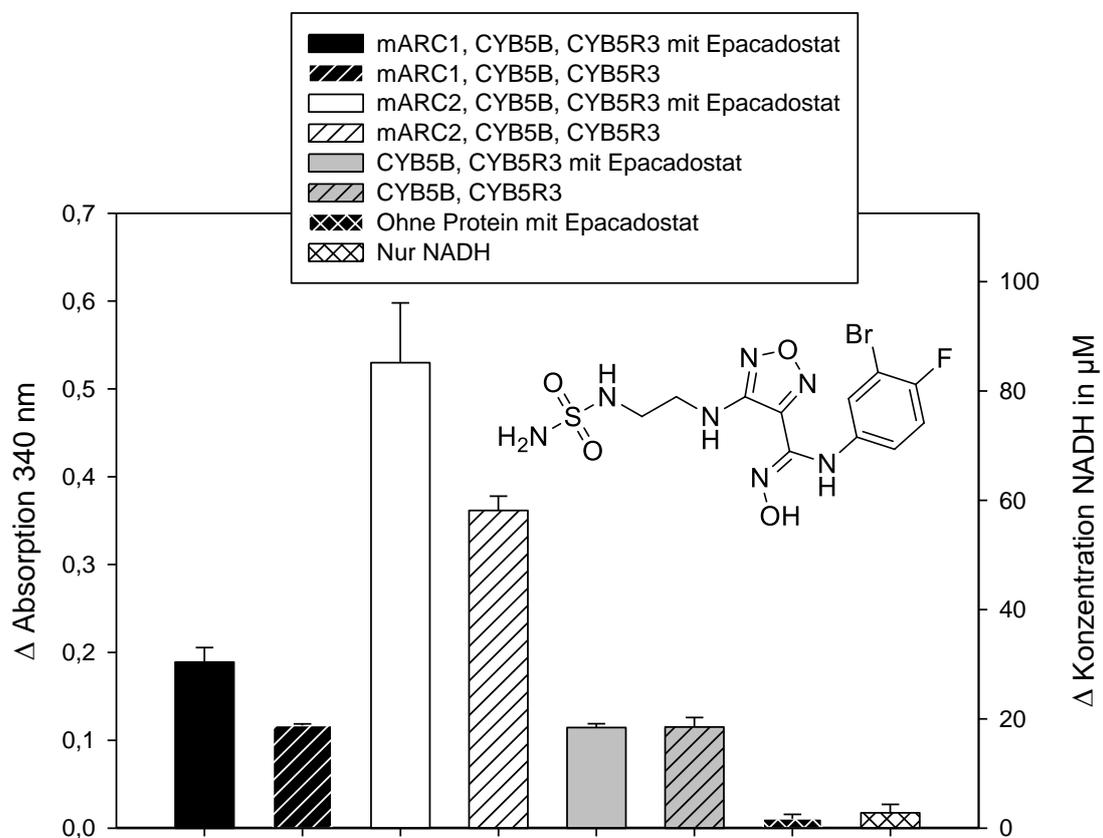
#### **4.2.4 Amidoxime/Oxime**

##### **4.2.4.1 Einführung**

Die Gruppe der Oxime gehört zu den bestuntersuchten funktionellen Gruppen für den Metabolismus durch mARC. Oxime, im speziellen Amidoxime, gelten dabei als gute Strategie zur Etablierung von Prodrugs. Amidine haben aufgrund ihrer hohen Basizität eine niedrige Bioverfügbarkeit, da diese positiv geladen im Gastrointestinaltrakt vorliegen [100]. Die Modifikation zum Amidoxim umgeht dieses Problem. Das Prodrug kann die biologischen Membranen überwinden. An der Zielstruktur kann durch eine mARC-abhängige Reduktion wieder das freie Amidin entstehen, welches zur Wirkung benötigt wird. In diesen Fällen ist daher eine hohe Umsetzungsrate von Vorteil. Im Fall von Arzneistoffen, bei denen das Oxim die pharmazeutisch wirksame Struktur darstellt, ist hingegen die Umsetzung eine Inaktivierung. Da bislang alle untersuchten Oxime auch von mARC reduziert werden konnten [37, 101], sollten diese Oxime ein Substitutionsmuster aufweisen, welches die Umsetzung durch mARC verringert.

#### 4.2.4.2 Epacadostat

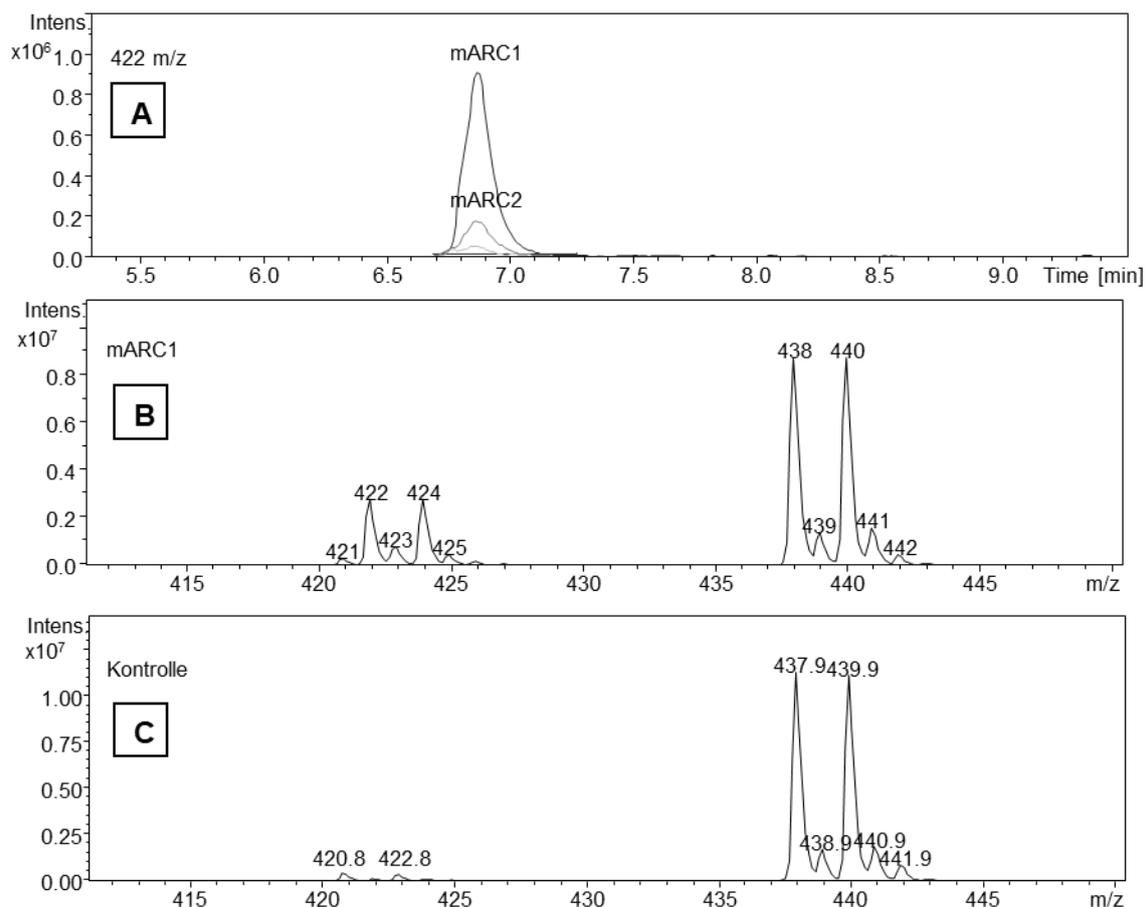
Epacadostat ist ein Arzneistoff, welcher in klinischen Studien der Phase III gegen Krebs untersucht wurde. Durch seinen neuartigen Wirkmechanismus als Inhibitor der Indolamin-2,3-Dioxygenase [102] und gleichzeitiger Amidoximstruktur, war die Substanz ein interessanter Kandidat für Testungen der enzymatischen Reduktion. Das Team von *Boer et al.* hatte Epacadostat bereits mithilfe von subzellulären Leberfraktionen auf eine Reduktion durch mARC getestet [103]. Diese hatten anhand von Vergleichsmessungen mit BAO keine Reduktion feststellen können. Um dieses Ergebnis mithilfe der rekombinanten Enzyme zu überprüfen wurde Epacadostat in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  anhand der Methoden 3.1.1 und 3.2.1 untersucht.



**Abbildung 4.17: NADH-Assay Ergebnisse von einer Epacadostat Inkubationsreihe über 15 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.

Im Gegensatz zu der Publikation von *Boer et al.*, konnte im NADH-Assay (Abbildung 4.17) eindeutig eine Reduktion festgestellt werden. Die Kontrollen ohne mARC und die Kontrolle mit mARC1 ohne Substrat zeigten eine identische Änderung der Absorption über die Zeit. Die mARC2 Probe zeigt, wie alle Untersuchungen bei denen DMSO zur Verbesserung der Löslichkeit enthalten waren, auch in der Kontrolle eine starke Änderung der Absorption und

damit verbunden einen hohen NADH Verbrauch (Erläuterung in Kapitel 4.4.2). Jedoch zeigt sich auch hier eine höhere Umsetzungsgeschwindigkeit bei dem mARC2-Ansatz mit Epacadostat. Als Umsetzungsrate konnte für mARC1  $10,4 \pm 2,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  und für mARC2  $24,3 \pm 9,8 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ermittelt werden. Das enthaltene Bromatom in der Struktur von Epacadostat erlaubt eine einfache Untersuchung mithilfe der LC-MS. Das spezifische Isotopenverhältnis von  $^{79}\text{Br}$  und  $^{81}\text{Br}$ , welches ca. im Verhältnis 50 % zu 50 % auftritt [104], liefert ein eindeutig zu erkennendes Isotopenmuster im Massenspektrum (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18: LC-MS-Analytik von verschiedenen Epacadostat-Inkubationen.** Grafik A zeigt die Peaks von reduziertem Epacadostat (422 m/z) der unterschiedlichen Inkubationen. Grafik B zeigt das Massenspektrum einer mARC1-Inkubation zwischen 6 min und 7 min. Grafik C zeigt das Massenspektrum einer Kontrollinkubation ohne Protein zwischen 6 min und 7 min.

Auch hier zeigte sich, eine mARC-abhängige Reduktion von Epacadostat. Der Vergleich von Grafik B zu Grafik C (Abbildung 4.18) legt nahe, dass Epacadostat zu einem geringen Teil mit der reduzierten Form verunreinigt ist oder dieses als Fragment in der LC-MS auftritt. Die hieraus ermittelnden Umsetzungsdaten zeigen, analog zu dem NADH-Assay, eine höhere Umsetzung für mARC2 auf. Sie liegen bei mARC1 bei  $4,1 \pm 1,7 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  und bei mARC2 bei  $17,9 \pm 7,1 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (für die LC-MS-Messung).

#### 4.2.4.3 CM433

CM433 wurde von der Arbeitsgruppe um *Maccallini* als Prodrug-Inhibitor für die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase entwickelt [105]. Der Prodrug-Mechanismus sollte dabei analog zu den Arzneistoffen Ximelagatran oder Upamostat die Bioverfügbarkeit verbessern und zudem eine Freisetzung im ZNS (zentrales Nervensystem) ermöglichen. Dazu sollte CM433 möglichst effektiv durch mARC aktiviert werden, damit die aktive Wirkform freigesetzt wird. CM433 wurde daher mithilfe der Methoden 3.1.1 und 3.2.1 in einer Konzentration von 3 mM untersucht. Zudem wurden Vergleichsmessungen mit BAO durchgeführt, um einen Eindruck der *in vivo* Aktivierung zu haben, welche von BAO bekannt ist (die Umsetzung zum korrespondierenden BA wird nach oraler Applikation von BAO bei Schweinen auf 74 % bei einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht beziffert) [82].

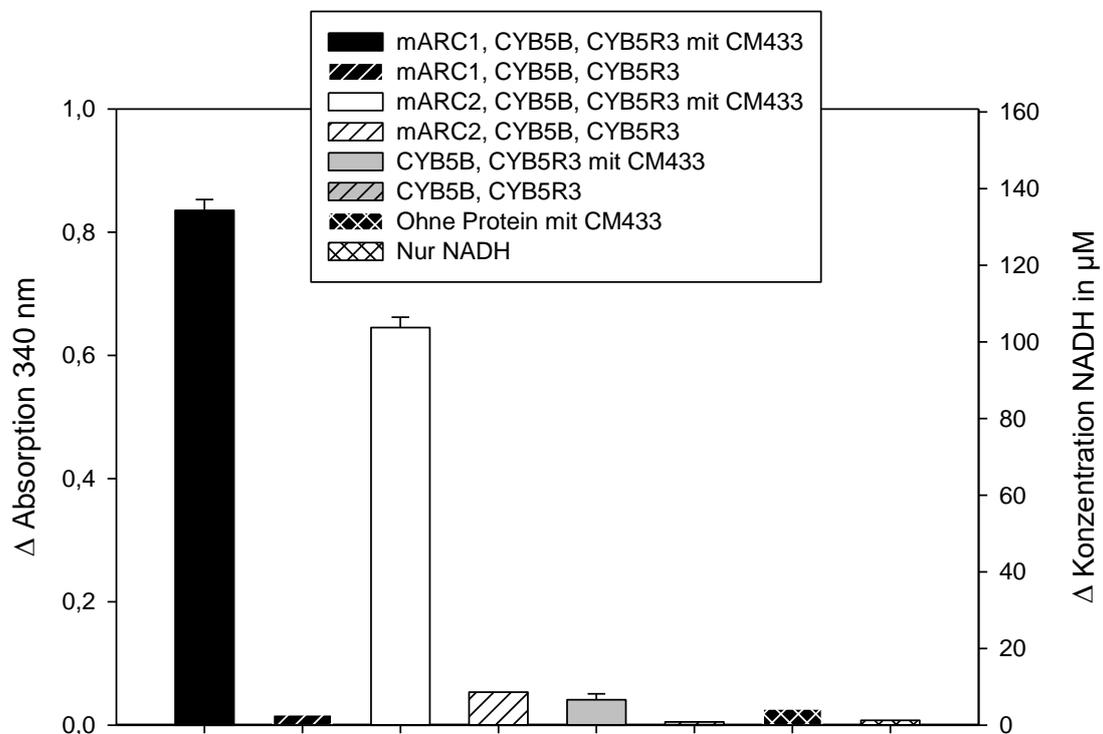


Abbildung 4.19: NADH-Assay Ergebnisse von einer CM433 Inkubationsreihe nach 2 min.

Die Ergebnisse aus dem NADH-Assay (Abbildung 4.19) demonstrierten deutlich eine vollständige Umsetzung vom NADH innerhalb von 2 min. Dabei wies die mARC1-Inkubation leicht höhere Umsetzungsrate im direkten Vergleich zu der mARC2-Inkubation auf.

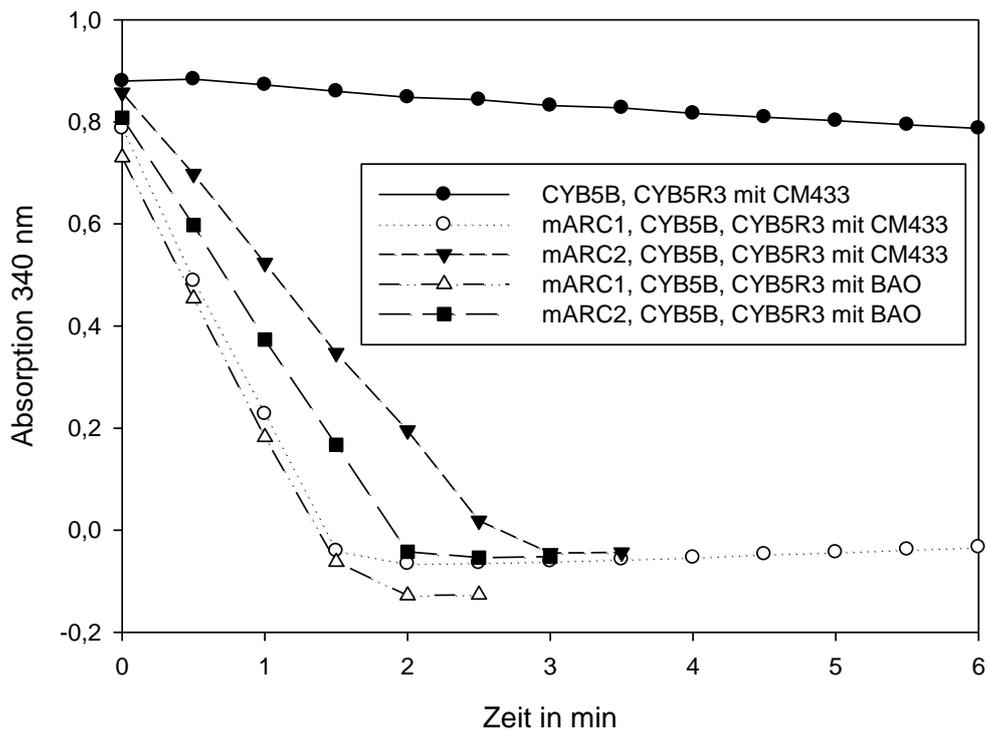


Abbildung 4.20: Vergleich der Umsetzungsrate von unterschiedlichen CM433 und BAO Reduktionen.

Im Vergleich zu BAO (Abbildung 4.20) zeigt CM433 nahezu identische Umsetzungsraten. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann daher eine vollständige Bioaktivierung *in vivo* vermutet werden, wobei dazu weitere Studien (insbesondere klinische Studien) notwendig sind, um dies zu verifizieren.

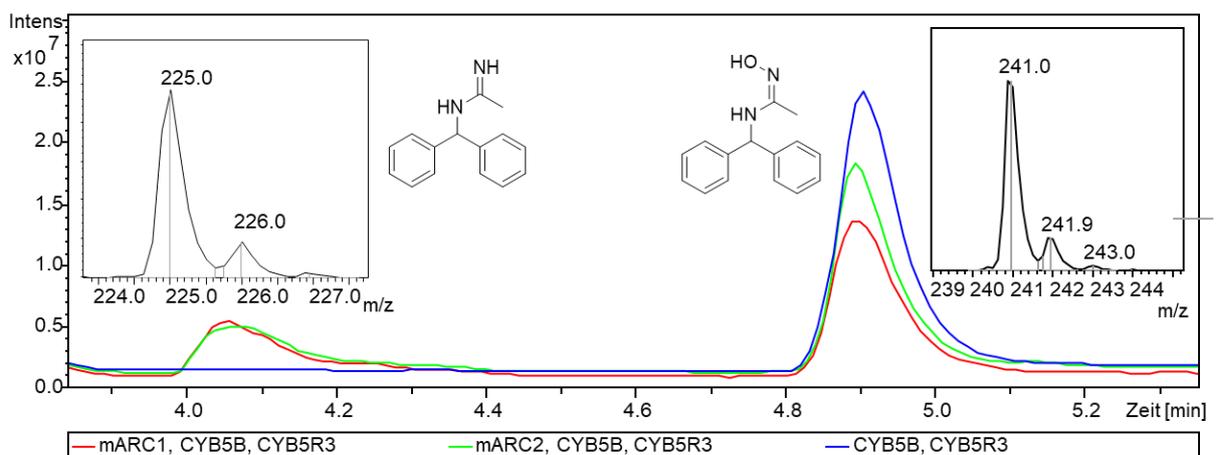
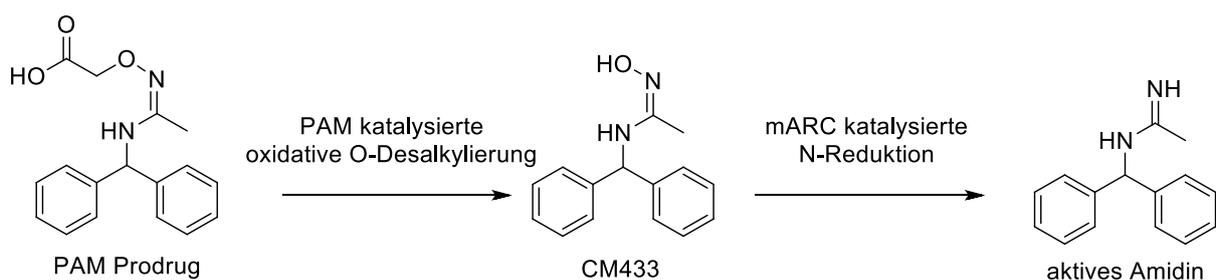


Abbildung 4.21: LC-MS-Ergebnisse von unterschiedlichen CM433 Inkubationen. In den oberen Ecken sind jeweils die Massenspektren der dargestellten Peaks aufgezeigt. Die Inkubation in blau mit CYB55 und CYB5R3 zeigt keinen Peak bei 4,1 min und auch 225 m/z ist nicht detektierbar.

Die Ergebnisse aus dem NADH-Assay konnten auch eindrucksvoll via LC-MS bestätigt werden. Umsetzungsraten von mARC1:  $872,3 \pm 19,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  mit dem NADH-Assay gemessen und  $949,3 \pm 88,9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  mit LC-MS gemessen. Umsetzungsraten von mARC2:  $601,3 \pm 13,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  mit dem NADH-Assay gemessen und  $865,4 \pm 30,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  mit LC-MS gemessen. An Abbildung 4.21 wird deutlich, dass bei der Inkubation ohne mARC (in blau), keinerlei reduziertes Amidin entstanden ist. Währenddessen der Gesamtumsatz bei mARC1 (in rot) und mARC2 (in grün) nach Ablauf der Reduktion relativ identisch erscheint. Die hohe Umsatzrate von CM433 hat positive und negative Aspekte. CM433 eignet sich sehr gut, um als Prodrug von mARC aktiviert werden zu können. Problematisch ist jedoch, dass CM433 seine Wirkung im ZNS entfalten soll. Hierbei ist zu bedenken, dass mARC in nahezu allen humanen Geweben gefunden wurde [37] und somit der überwiegende Anteil in der Peripherie bereits aktiviert werden würde. Das reduzierte CM433 würde zudem aufgrund der Basizität wohl nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Zur Lösung dieses Problems gibt es mehrere Möglichkeiten. Analog zu der Arzneistoffkombination Levodopa mit Benserazid bzw. Carbidopa, könnte eine Boostersubstanz entwickelt werden, welche die mARC-abhängige Reduktion in der Peripherie hemmt, selbst jedoch nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (4.7). Alternativ könnte CM433 selbst derivatisiert werden, um erst im ZNS freigesetzt zu werden. Als ein doppeltes Prodrug wäre es hierbei beispielsweise denkbar eine Modifikation vorzunehmen wodurch CM433 durch die Peptidylglycin- $\alpha$ -amidierende Monooxygenase (PAM), ein Enzym welches die höchste Aktivität im ZNS aufweist [106], aktiviert werden könnte. Durch die Einführung einer Carboxymethylgruppe könnte daher gezielt das ZNS adressiert werden, ohne auf das günstige Bioverfügbarkeitsprofil zu verzichten (Abbildung 4.22).



**Abbildung 4.22: : Doppelte Prodrug Aktivierung bis zum aktiven Amidin im ZNS nach Schade et al. [107].**

Die Carboxymethylgruppe kann durch die katalytische Aktivität von PAM abgespalten werden. Als Nebenprodukt wird Glycolsäure freigesetzt. Die Anwendung dieses Prinzip auf Amidoxime konnte bereits erfolgreich demonstriert werden [107], daher wäre dies ein möglicher Schritt für die Etablierung eines neuen durch mARC-aktivierbaren Arzneistoffes.

#### 4.2.4.4 disc-Substanzen

Die US-amerikanische Firma disc-medicine entwickelt verschiedene Substanzen zur Behandlung der seltenen Erkrankung IRIDA-Syndrom (Eisenrefraktäre Eisenmangelanämie), eine Erbkrankheit des Eisenstoffwechsels, welche nur partiell auf eine Eisensupplementierung anspricht [108]. Als Target wurde hierbei die mutierte Matriptase-2 identifiziert, eine Transmembran-Serinprotease, welche einen Regulator der Eisen-Homöostase, das Hepcidin, runterreguliert und so zu Schwindelgefühl, Müdigkeit und belastungsinduzierte Dyspnoe führen kann [109]. Das Pharmakophor der meisten gefundenen Inhibitoren enthält ein Indolring, welcher durch ein Amidoxim substituiert wurde. Die Amidoximstruktur, welche in allen Substanzen vorhanden ist, dient als Prodrug für das aktive Amidin, welches die Matriptase-2 hemmen kann. Untersucht wurden die Substanzen disc50, disc51, disc77 und disc790. Wobei disc77 als einzige Substanz nicht über ein Indolheterozyklus verfügt und zudem zwei Amidoxime enthält. Die Firma disc-medicine hatte bereits präklinischen Studien zu disc790 durchgeführt, sodass dieser als erfolgsversprechender Kandidat ausgewählt wurde. Mit Ausnahme von disc77 sind alle Substanzen sehr lipophil. Die Substanz disc790 enthält zudem eine Carbonsäurefunktion, welche bei pH 6 zwitterionisch vorliegen könnte. Diese Substanzen mussten daher unter Einsatz von 5 % DMSO in Lösung gebracht werden. Die Substanzen disc50, disc51 und disc77 wurden mithilfe der Methoden 3.1.1 und 3.2.1 untersucht, jeweils in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ . Die Substanz disc790 konnte aufgrund von Interferenzen bei 340 nm nur mithilfe der Methode 3.2.1 untersucht werden.

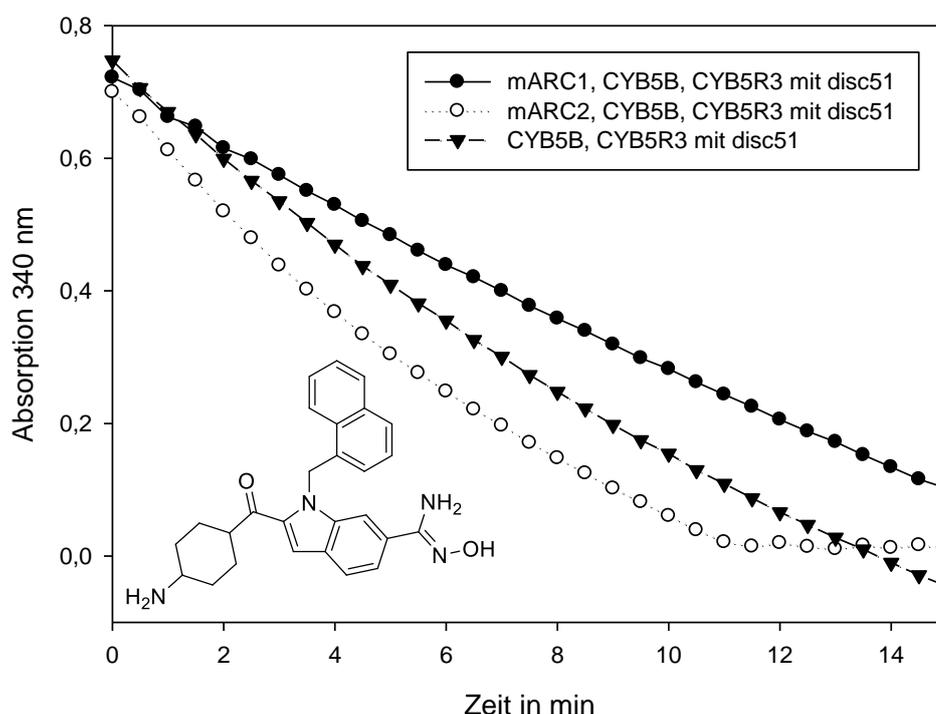
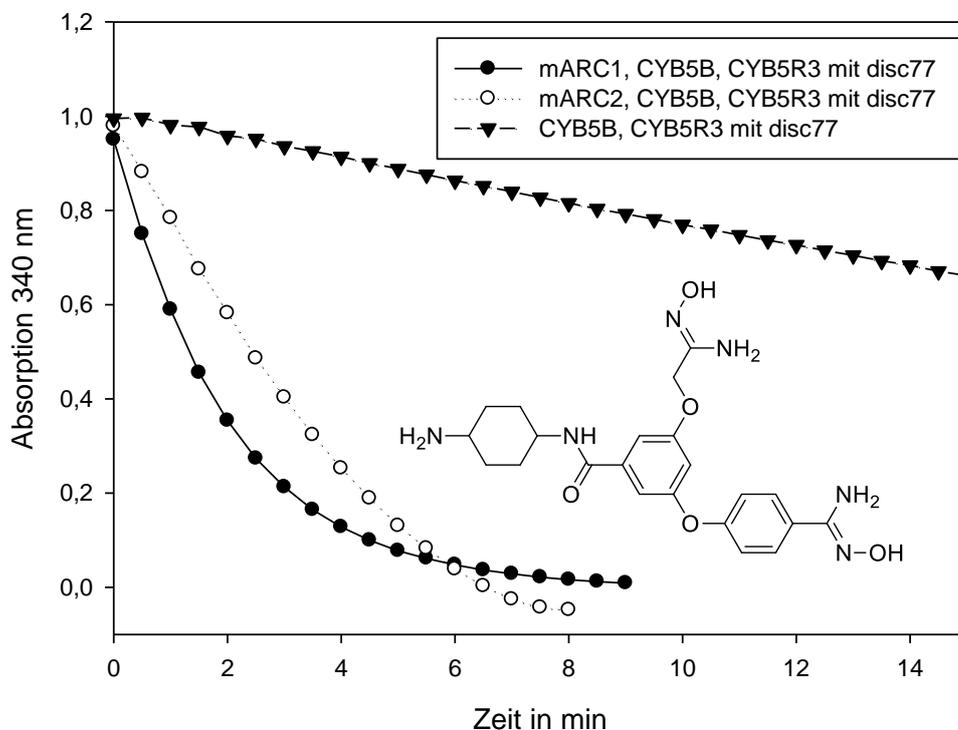


Abbildung 4.23: Beispielhafte Umsetzung von disc51 durch mARC1, mARC2 und der Kontrolle.

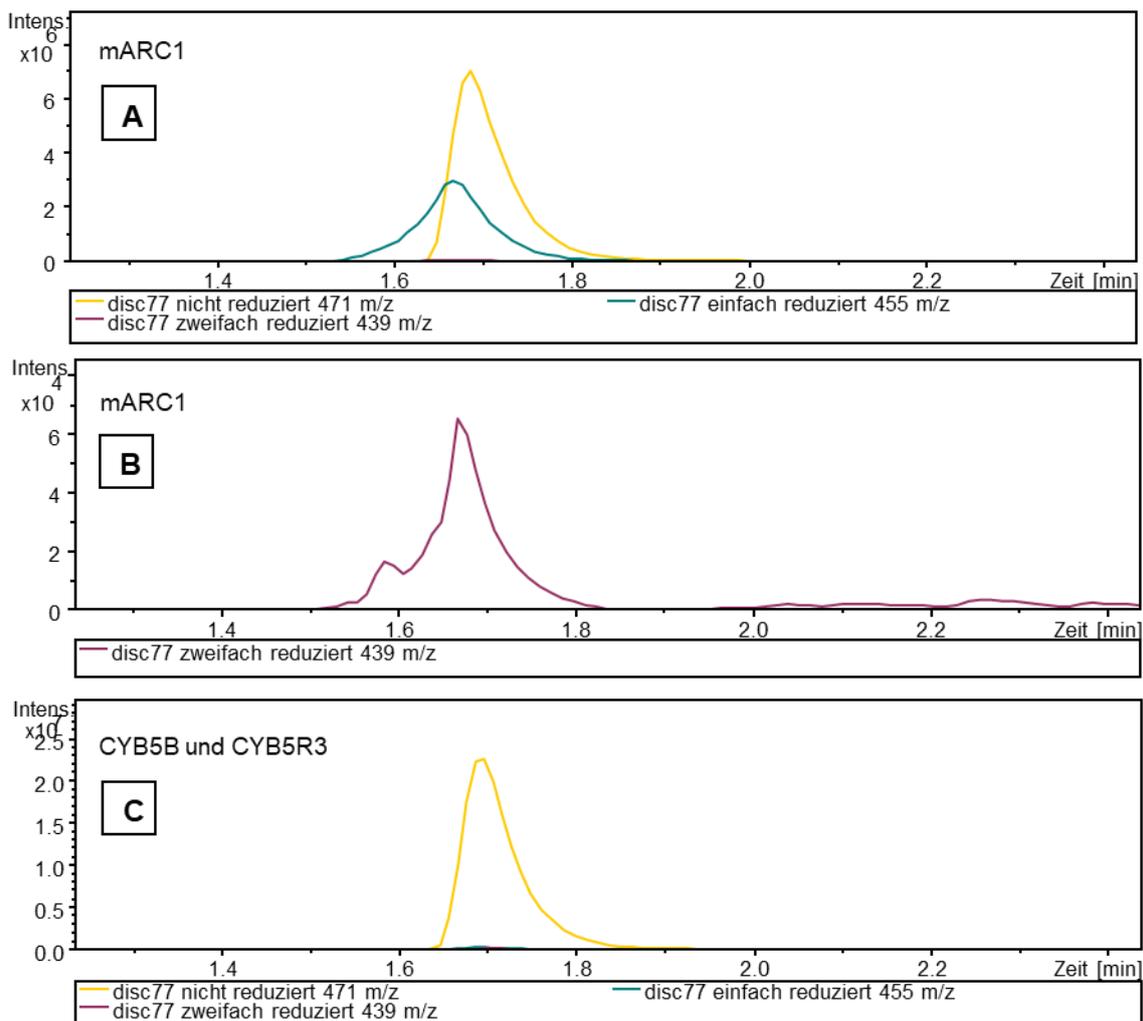
Im NADH-Assay (Abbildung 4.23) zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen disc50 und disc51. Beide Substanzen wurden innerhalb von 15 min zum großen Teil reduziert. Jedoch konnte diese Beobachtung auch bei der Kontrolluntersuchung mit CYB5B und CYB5R3 gemacht werden. Lediglich die mARC2-Inkubation zeigte eine leicht erhöhte Umsetzungsrate. Es konnten hierbei keinerlei Unterschiede zwischen der CYB5B- und CYB5R3-Inkubation und der mARC2-Inkubation in der LC-MS-Analytik gefunden werden. Somit sind disc50 und disc51 als Substrate des CYB5B/CYB5R3-Enzymsystems einzuordnen, wobei auf Grundlage der gezeigten Daten es nicht auszuschließen ist, ob die Zugabe von mARC2 die Umsetzungsgeschwindigkeit leicht erhöht.



**Abbildung 4.24:** Beispielhafte Umsetzung von disc77 durch mARC1, mARC2 und der Kontrolle.

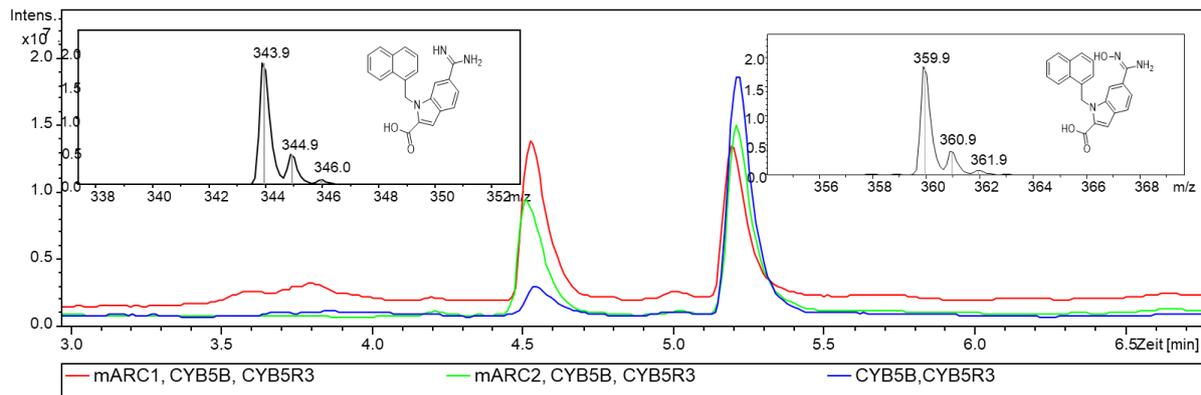
Die Ergebnisse aus dem NADH-Assay bei disc77 zeigten deutlich eine mARC-abhängige Reduktion (Abbildung 4.24). Sowohl mARC1 als auch mARC2 reduzieren disc77. Auffällig ist der Unterschied in der Kinetik. Während mARC2 eher der klassischen Kinetik 0. Ordnung folgt, zeigt mARC1 den Reaktionsverlauf einer Kinetik 1. Ordnung. Grundlage hierfür dürfte sein, dass die Struktur zwei verschiedene Amidoxime enthält, welche unabhängig voneinander reduziert werden können. Ob eine einfach oder doppelte Reduktion von disc77 bei der Inkubation mit mARC1 stattgefunden hatte, wurde anhand der LC-MS-Methode untersucht. Hierbei wurden die Massen der einfach und zweifach reduzierten Form gesucht und

gegenübergestellt. Abbildung 4.25 zeigt hierbei deutlich, dass die einfach reduzierte Form wesentlich häufiger auftritt als die zweifach reduzierte. Aus den Ergebnissen wird nicht ersichtlich, ob und welche Position bevorzugt reduziert wird, da beide Formen die identische Masse besitzen und keine Fragmente erkennbar sind, welche eindeutig zuzuordnen sind. Dabei ist die eingesetzten NADH-Menge nicht ausreichend, um die vollständige Reduzierung beider Amidoximgruppen herbeizuführen. Da diese funktionelle Gruppe normalerweise gut umgesetzt wird, ist es plausibel, dass es physiologisch zu einer vollständigen Reduktion von disc77 kommen könnte.



**Abbildung 4.25: LC-MS-Untersuchungen von disc77.** Grafik A zeigt die Peaks von nicht reduziertem disc77 (471 m/z), einfach reduziertem disc77 (455 m/z) sowie zweifach reduziertem disc77 (439 m/z) von einer mARC1-Inkubation. Grafik B zeigt isoliert den Peak des zweifach reduzierten disc77 (439 m/z) von derselben mARC1-Inkubation. Grafik C zeigt das Massenspektrum von einer CYB5B- und CYB5R3-Inkubation von nicht reduziertem disc77 (471 m/z), die Kurven von einfach reduziertem disc77 (455 m/z) sowie zweifach reduziertem disc77 (439 m/z) befinden sich auf dem Niveau des Grundrauschens.

Eine etwas andere Grundstruktur als disc50 und disc51 besitzt disc790. Die Messung mithilfe des NADH-Assays gestaltete sich bei dieser als problematisch, da neben Problemen mit der Löslichkeit diese Substanz auch ein Chromophor mit einer ausgeprägten Absorption im langwelligen Bereich besitzt und daher die Substanz auch gelblich vorliegt. Eine Bestimmung der Umsetzungsrate mittels NADH-Assay konnte daher nicht durchgeführt werden. Es konnte lediglich erkannt werden, dass eine Umsetzung von disc790 durch mARC stattfindet. Die genauere Betrachtung wurde daher mittels LC-MS durchgeführt (Abbildung 4.26).



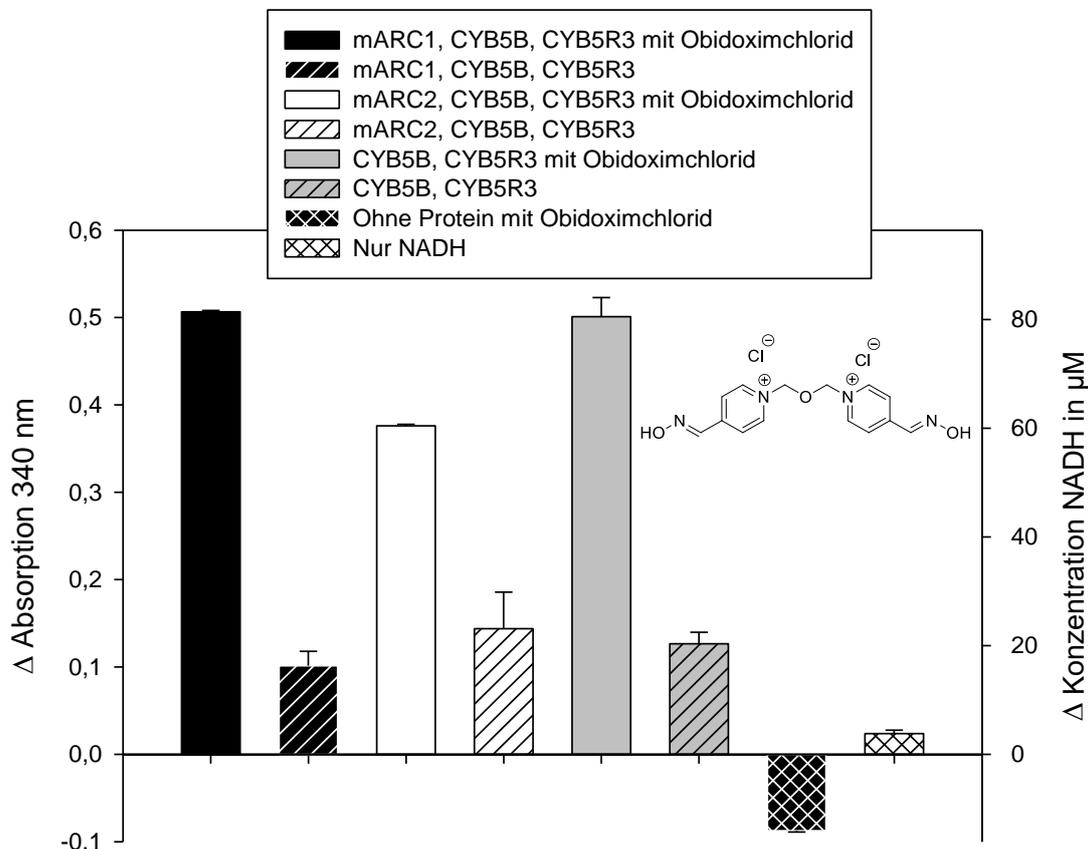
**Abbildung 4.26: LC-MS-Ergebnisse von unterschiedlichen disc790-Inkubationen.** In den oberen Ecken sind jeweils die Massenspektren der dargestellten Peaks aufgezeigt.

Hierbei konnte sehr gut eine mARC-abhängige Reduktion bewiesen werden. Sowohl bei der mARC1- (in rot) als auch bei der mARC2-Inkubation (in grün) ist ein deutlicher Peak bei Minute 4,5 zu sehen, der der Masse des reduzierten disc790 entspricht. Bei der Kontrolle mit CYB5B und CYB5R3 (in blau) ist nur ein geringer Peak bei Minute 4,5 sichtbar. Jedoch ist dieser Peak in der gleichen Intensität auch in den Kontrollen ohne Protein vorhanden, sodass es sich entweder um einen chemischen Zerfall handelt oder um den Fakt, dass die disc790 Probe in einem geringen Ausmaß mit der reduzierten Form verunreinigt ist. Als Umsetzungsrate mittels LC-MS konnte  $112,3 \pm 18,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  für mARC1 und  $84,6 \pm 10,9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  für mARC2 ermittelt werden. Da disc790 als Prodrug analog zu Upamostat entwickelt werden sollte, deuten diese Umsetzungsraten, welche höher sind als bei Upamostat (Kapitel 4.2.4.6), auf eine ausreichend gute *in vivo* Aktivierung hin. Die Aktivierung von disc790 ist damit nach dem Maßstab etablierter Prodrugs gut genug [110], um eine Entwicklung weiter voranzutreiben.

#### 4.2.4.5 Obidoximchlorid und Pralidoximchlorid

Obidoximchlorid und Pralidoximchlorid sind Antidote, welche bei einer Vergiftung mit Organophosphaten und Carbamaten, beispielsweise durch Insektizide oder chemische Kampfstoffe, angewendet werden. Mechanistisch sorgen die beiden Stoffe für eine

Reaktivierung der Acetylcholinesterase. Angewendet werden die Stoffe dabei in Kombination mit Atropin [111]. Da beide Stoffe über die namensgebende Oximstruktur verfügen, sollten sie im Rahmen dieser Arbeit auf eine Reduktion durch mARC getestet werden. Dabei wurden beide Stoffe in einer Konzentration von 3 mM mithilfe der Methoden 3.1.1 und 3.2.1 überprüft.



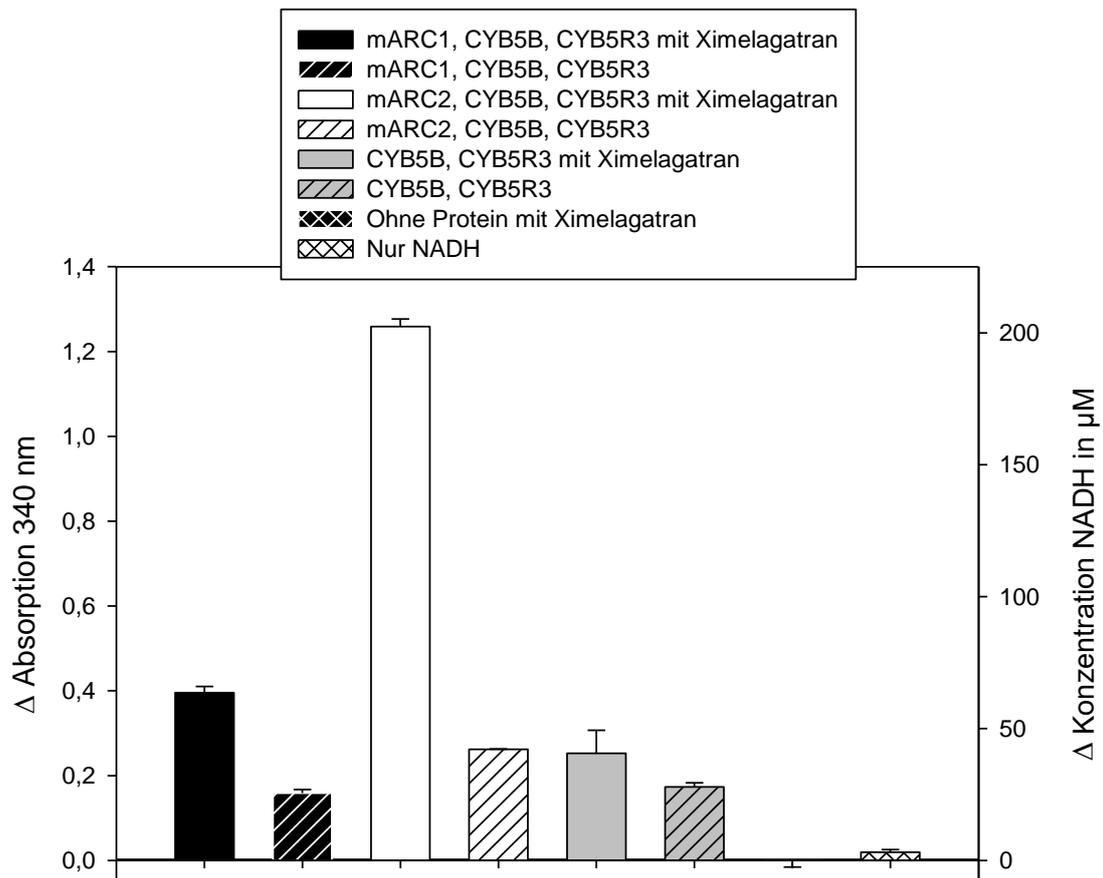
**Abbildung 4.27: NADH-Assay Ergebnisse von einer Obidoximchlorid Inkubationsreihe über 15 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.

Beide Substanzen zeigten im NADH-Assay ein ähnliches Verhalten. Zwar konnten sowohl Obidoximchlorid als auch Pralidoximchlorid reduziert werden, jedoch ist dies, wie in Abbildung 4.27 gezeigt, keine mARC-abhängige Reduktion, sondern eine Reduktion, welche auch nur mithilfe von CYB5B und CYB5R3 möglich ist. Eine erhöhte Umsetzung durch Zugabe von mARC ist nicht erkennbar.

#### 4.2.4.6 Upamostat und Ximelagatran

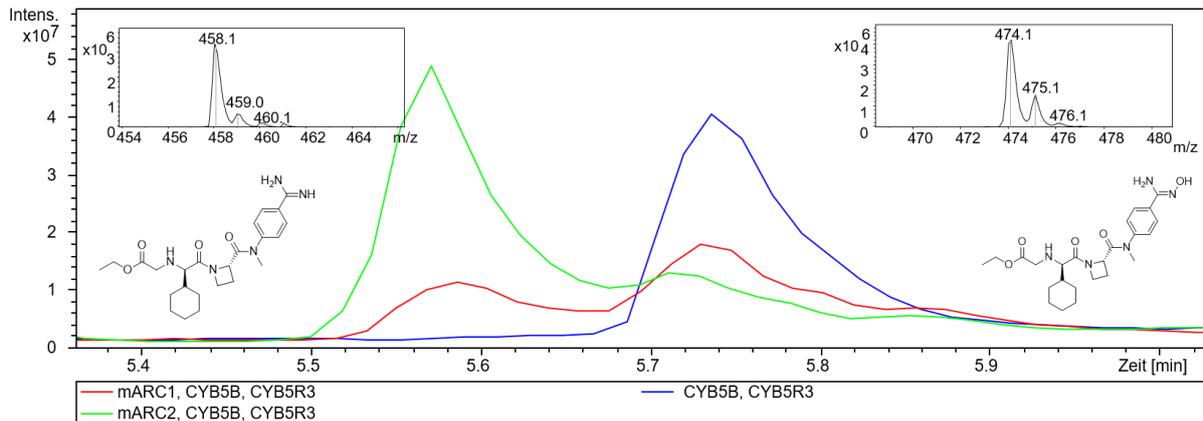
Für die Relevanz in dem mARC-abhängigen Metabolismus von Xenobiotika bilden Upamostat und Ximelagatran wichtige Beispiele. Das doppelte Prodrug Ximelagatran wurde als Antikoagulant zugelassen und befand sich bis 2006 auf dem Markt. In diesem Zusammenhang ist die Reduktion durch mARC eine Aktivierung zum aktiven Melagatran [112]. Upamostat hingegen, erlangte im Jahr 2017 eine *Orphan Drug Designation* bei der FDA. Als Matriptase-1-Inhibitor wurde dieser zur Behandlung des Pankreaskarzinoms zugelassen.

Zudem wird eine Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit Upamostat diskutiert. Die weitere Entwicklung wurde durch die Firma RedHill Biopharma unter dem Kürzel RHB-107 vorangetrieben [113]. Hierbei handelt es sich bei der mARC-abhängigen Reduktion ebenfalls um eine Aktivierung des Prodrugs. Beide Substanzen wurden in der Vergangenheit bereits durch *Froriep et al.* [42] und *Grünwald et al.* [112] charakterisiert. Jedoch wurden diese Substanzen im Rahmen dieser Arbeit nochmals genauer betrachtet, da bei den Untersuchungen von *Grünwald et al.* lediglich die Umsetzung von *N*-Hydroxymelagatran mit rekombinanten mARC1 betrachtet wurde [112] und die Ergebnisse aus der Analyse von Upamostat angesichts der schlechten Löslichkeit und damit verbundenen Einsatz von höheren Konzentrationen von DMSO, unter Betrachtung der neuen Erkenntnisse über den Einsatz von DMSO (4.4.2) sich als überprüfungswürdig dargestellt haben. Upamostat und Ximelagatran wurden mit den Methoden 3.1.1 und 3.2.1 in einer Konzentration von 160  $\mu\text{M}$  im Fall von Upamostat und 200  $\mu\text{M}$  im Fall von Ximelagatran untersucht.



**Abbildung 4.28: NADH-Assay Ergebnisse einer Ximelagatran Inkubationsreihe nach 8 min.** Die Kontrolle: mARC2, CYB5B, CYB5R3 (in weiß gestreift) enthält keinen Fehlerbalken, da die beiden Resultate aus der Doppelbestimmung ein nahezu identischen Wert aufweisen. Der Wert für die Inkubationen: Ohne Protein mit Ximelagatran (in schwarz kariert) ist nahezu 0 und ist daher nicht als Balken dargestellt.

Die Untersuchung von Ximelagatran zeigte, dass die gute *in vivo* Umsetzung wahrscheinlich mehrheitlich auf die Aktivierung über mARC2 zurückzuführen ist. Diese ist im Vergleich zu der Aktivität von mARC1 fast um den Faktor 10 höher (Umsetzungsrate mARC1:  $18,2 \pm 7,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , mARC2:  $270,1 \pm 9,0 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.29: LC-MS-Ergebnisse von unterschiedlichen Ximelagatran-Inkubationen.** In den oberen Ecken sind jeweils die Massenspektren der dargestellten Peaks aufgezeigt. Die Inkubation in blau mit CYB55 und CYB5R3 zeigt keinen Peak bei 5,6 min und auch 458 m/z ist nicht detektierbar.

Die gleiche Beobachtung lässt sich auch mithilfe der LC-MS-Analytik nachvollziehen (Abbildung 4.29). Eindrucksvoll ist hier zu sehen, dass die mARC2-Inkubation (in grün) fast vollständig nur reduzierten Melagatranethylester enthält, während das Gegenteil bei der Kontrolle mit CYB5B und CYB5R3 (in blau) der Fall ist (enthält lediglich die Ausgangssubstanz Ximelagatran). Die mARC1-Inkubation (in rot) bildet das Zwischenstück, welche sowohl nicht reduziertes Ximelagatran als auch Melagatranethylester enthält. Die durch die LC-MS enthaltenen Umsetzungsraten unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Erhebungsmethode von dem des NADH-Assay und belaufen sich auf  $58,6 \pm 5,8 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  für mARC1 und  $247,9 \pm 12,7 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  für mARC2. Auch mit diesen Ergebnissen bleibt eine um den Faktor 4-5 höhere Umsetzungsrate für mARC2.

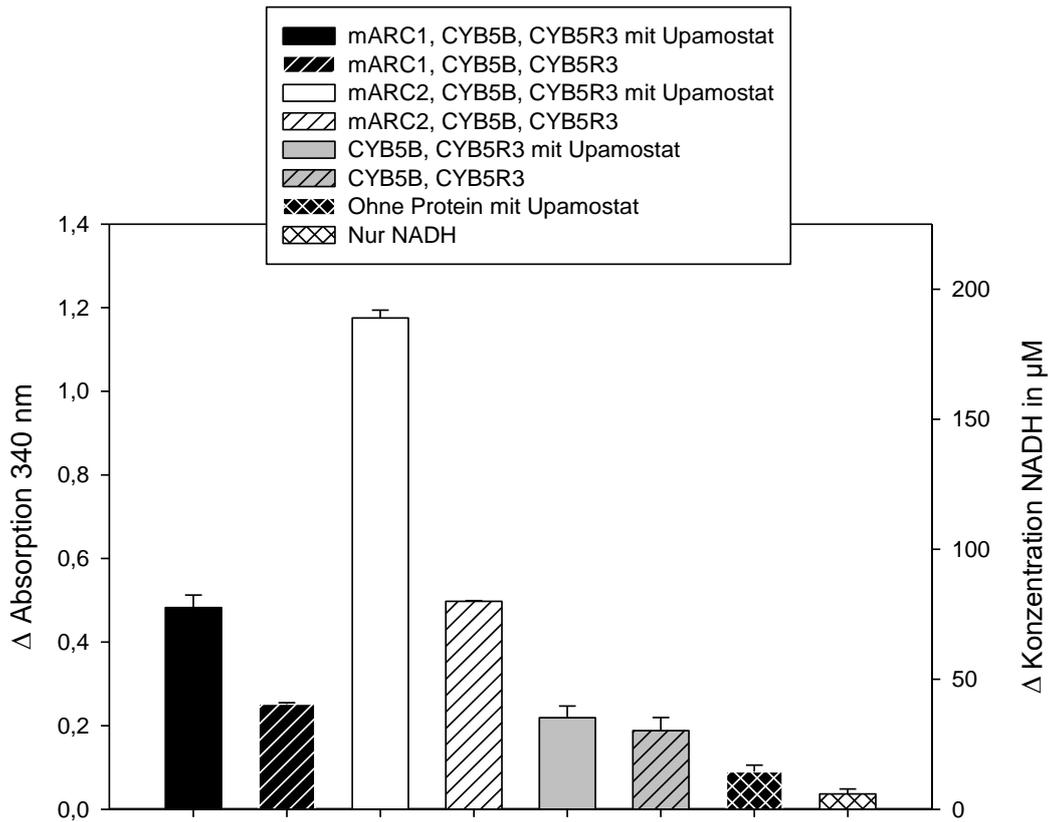


Abbildung 4.30: NADH-Assay Ergebnisse einer Upamostat Inkubationsreihe nach 15 min.

Ähnlich zu den Ergebnissen von Ximelagatran verhalten sich die Resultate der Inkubation von Upamostat. Auch hier ergaben die Untersuchungen eine deutlich präferenzielle Umsetzung bei mARC2. Die ermittelten Umsetzungsraten sind für mARC1:  $33,4 \pm 4,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  und mARC2  $98,0 \pm 2,7 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Dies entspricht etwa den Faktor 3. Analog zu Ximelagatran finden sich bei der LC-MS-Untersuchung auch deutliche Unterschiede zwischen den beiden paralogen mARC-Enzymen (Abbildung 4.31).

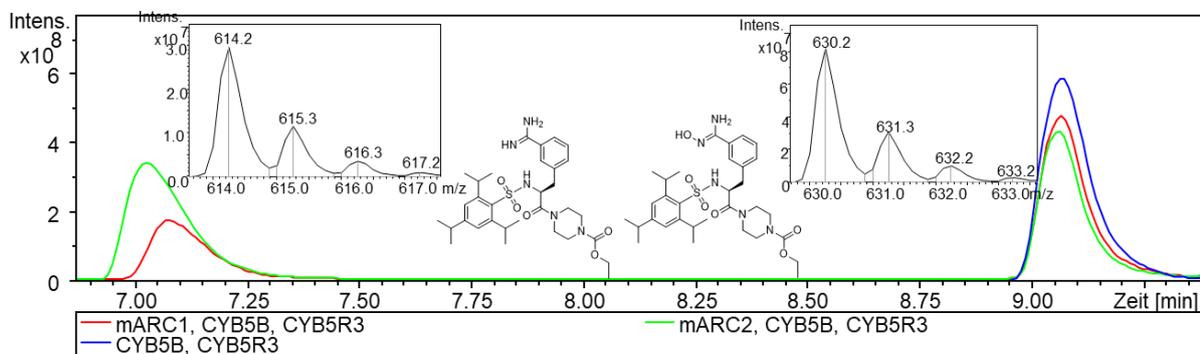


Abbildung 4.31: LC-MS-Ergebnisse von unterschiedlichen Upamostat-Inkubationen. In den oberen Ecken sind jeweils die Massenspektren der dargestellten Peaks aufgezeigt. Die Inkubation in blau mit CYB55 und CYB5R3 zeigt keinen Peak bei 7,1 min und auch 614 m/z ist nicht detektierbar.

So ist der Peak, welcher dem reduzierten Upamostat zuzuordnen ist, für mARC2 (in grün) wesentlich ausgeprägter als der von mARC1 (in rot). Quantifiziert man dies über die Umsetzungsrate kommt als Resultat eine etwa doppelt so hohe Umsetzungsrate als Ergebnis heraus. In Zahlen liegt die Umsetzungsrate für mARC1 bei  $38,2 \pm 10,1 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  und bei mARC2  $66,2 \pm 10,4 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Diese eindeutigen Ergebnisse aus zwei analytischen Methoden decken sich nicht mit den zuvor publizierten Daten von *Froriep et al.* Dieser stellte in der Publikation eine klare Präferenz für die Umwandlung zur aktiven Form mit rekombinanten mARC1 heraus. Die durch die HPLC ermittelten Umsetzungsdaten lagen hier bei  $56,1 \pm 1,3 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  für mARC1 und  $24,3 \pm 0,4 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  für mARC2 [42]. Damit widersprechen sich die Zahlen deutlich von den hier gezeigten Daten. Grundlage dafür könnte der Einsatz von DMSO sein, welcher eine Substratkonkurrenz (Kapitel 4.4.2) bei mARC2 bedingt und somit falsch niedrige Umsetzungsdaten hervorruft. Auch eine unterschiedliche Aktivität der verwendeten Enzymchargen ist eine denkbare Erklärung. Zur Lösung dieser Problematik müssten weitere Untersuchungen erfolgen.

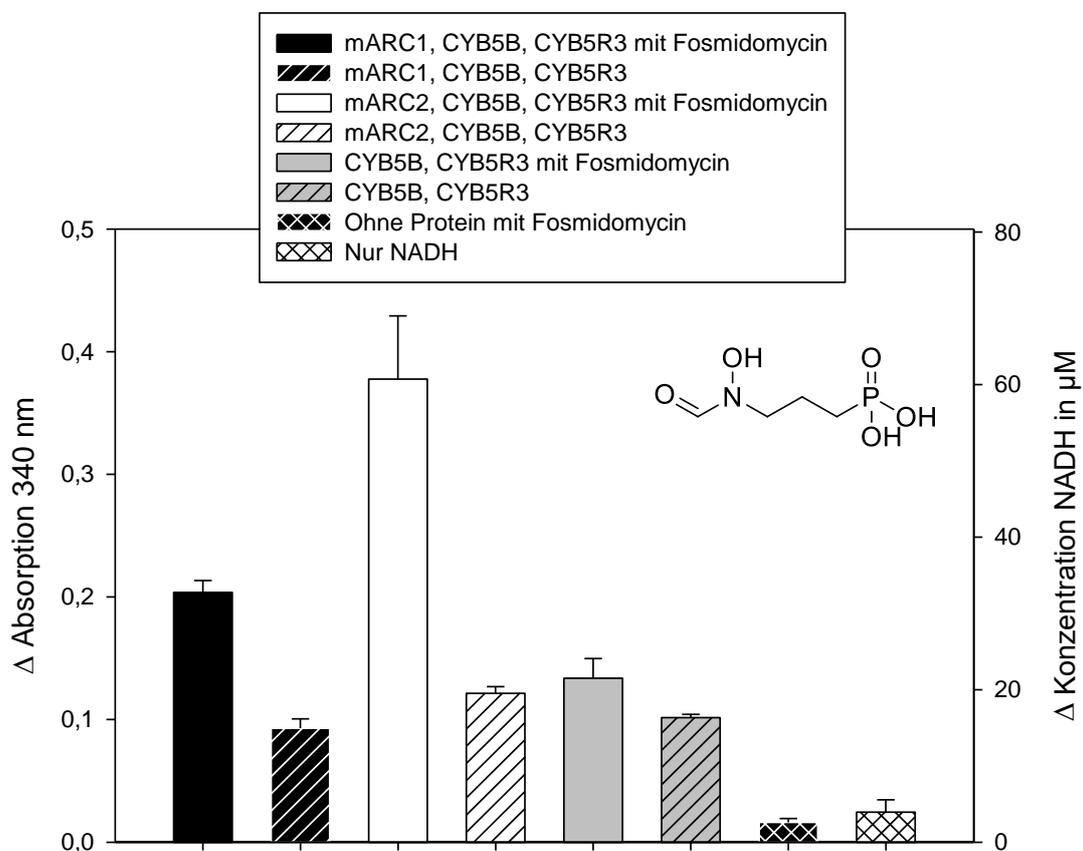
## 4.2.5 Hydroxamsäuren

### 4.2.5.1 Einführung

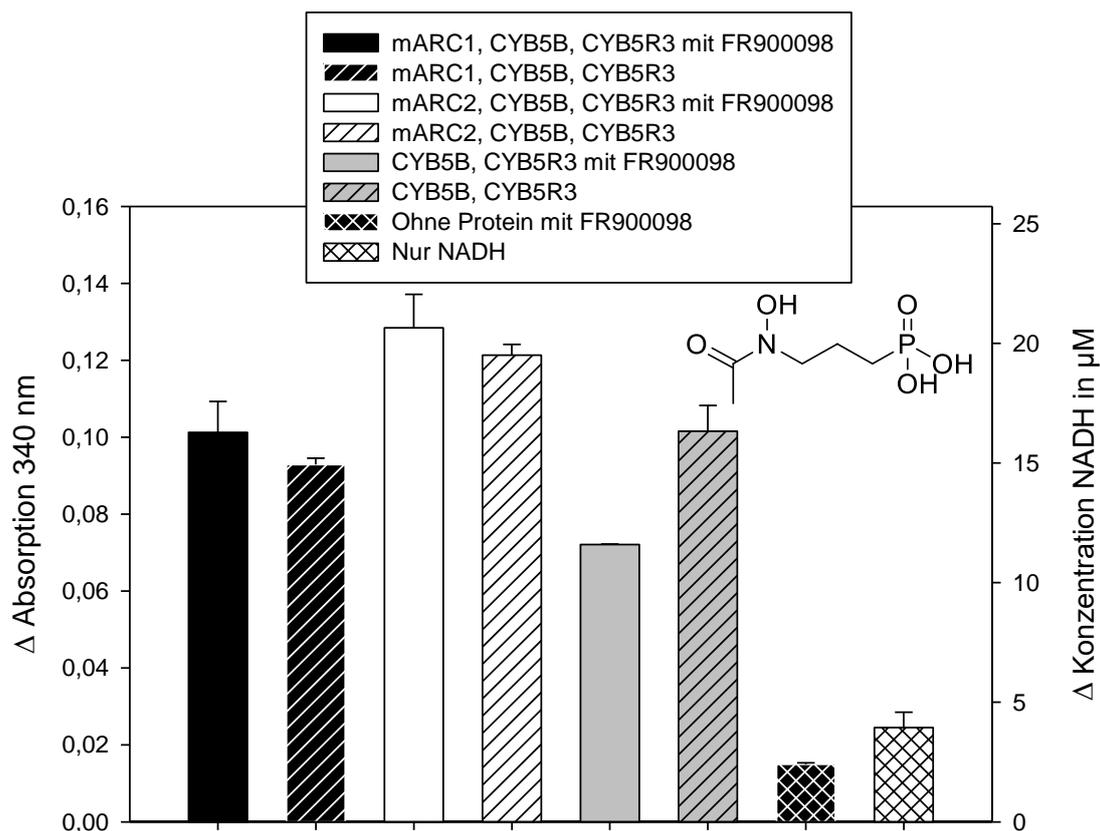
Hydroxamsäuren stellen eine wichtige funktionelle Gruppe für die Entwicklung von Arzneistoffen dar. Analog zu den Hydroxyharnstoffderivaten können Hydroxamsäuren über die freien Elektronenpaare gut Chelatkomplexe bilden und somit mehrwertige Kationen in beispielsweise Enzymen komplexieren und inhibieren [114]. Eine Reduktion zum korrespondierenden Amid ist daher unerwünscht. Die Reduktion von Hydroxamsäuren in Arzneistoffen durch mARC wurde bereits nachgewiesen (z.B. für Bufexamac oder Vorinostat) [40]. Die mARC-abhängige Reduktion von Hydroxamsäuren wird stark von dem Substitutionsmuster der Hydroxamsäuren beeinflusst. Während unsubstituierte Hydroxamsäuren in der Regel gut von mARC umgesetzt werden können, führt die Einführung eines kleinen Restes, wie einer Methylgruppe, bereits zu einer deutlichen Verringerung der Umsetzungsdaten. Im Vergleich zu den einfachen Resten sorgt die Einführung eines sterisch anspruchsvollen Restes, wie einer Benzylgruppe, dafür, dass keine messbare Umsetzung der Hydroxamsäure mehr stattfindet [115].

#### 4.2.5.2 Fosmidomycin und FR900098

Fosmidomycin ist ein Antibiotikum, welches auch bei der Malaria angewendet werden kann. Es gibt derzeit kein Präparat mit Fosmidomycin als Arzneistoff auf dem Markt. Diese Substanz wurde getestet, da sie aufgrund des fehlenden Chromophors schlecht durch eine HPLC-Methode zu vermessen ist. Zudem sollte das Derivat FR900098 untersucht werden, welches sich nur durch eine Methylgruppe vom Fosmidomycin unterscheidet [116]. Der Unterschied zwischen substituierter und unsubstituierter Hydroxamsäure bei der Umsetzung durch mARC konnte bereits anhand anderer Substanzen als signifikant herausgestellt werden [115]. Die beiden Substanzen wurden nach der Methode 3.1.1 getestet. Die beiden Substanzen wurden jeweils in einer Konzentration von 3 mM in den Inkubationen eingesetzt.



**Abbildung 4.32: NADH-Assay Ergebnisse einer Fosmidomycin Inkubationsreihe nach 15 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.



**Abbildung 4.33: NADH-Assay Ergebnisse einer FR900098 Inkubationsreihe nach 15 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert. Die Kontrolle: CYB5B, CYB5R3 mit FR900098 (in grau) enthält keinen Fehlerbalken, da die beiden Resultate aus der Doppelbestimmung ein nahezu identischer Wert aufweisen.

Bei dem Vergleich der Resultate der beiden Substanzen wird der Einfluss der Methylgruppe auf die Reduzierbarkeit durch das mARC-Enzymsystem klar deutlich. Fosmidomycin ist ein mARC1- und ein mARC2-Substrat, wobei die erzielten Umsetzungsraten für mARC2 mit  $27,8 \pm 7,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  fast viermal so hoch sind wie die gemessenen Umsetzungsraten für mARC1 mit  $7,2 \pm 1,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . FR900098 hingegen ist weder ein mARC1- noch ein mARC2-Substrat bzw. hat eine so geringe Umsetzungsrate, dass diese unterhalb des Detektionslimits der Methode liegt.

Die Analyse per LC-MS dieser Substanzen gestaltete sich aus mehreren Gründen problematisch, sodass hierbei keine weiteren Informationen erhalten wurden. Zum einen war die Ausgangssubstanz von FR900098 bereits mit der reduzierten Hydroxamsäure verunreinigt, sodass es nicht möglich ist per LC-MS festzustellen, ob es eine Reduktion durch die rekombinanten Enzyme gab. Zum anderen besitzen sowohl Fosmidomycin als auch FR900098 ein sehr ähnliches Elutionsverhalten wie der MES-Puffer, sodass sich in dem Diagramm Dimere und Trimere unterschiedlicher Zusammensetzung zeigen, welche die Bestimmung einer Umsetzungsrate mithilfe der LC-MS nicht möglich machen. Auf eine

Modifizierung der Methode für eine bessere Trennung wurde aus Zeitgründen verzichtet. Die NADH-Assay-Ergebnisse zeigen hinreichend genau den Sachverhalt für Fosmidomycin und FR900098 auf. Der Themenkomplex um die Spezifität von Hydroxamsäuren wurde zudem durch *Ginsel* bereits ausführlich erforscht [115].

#### 4.2.5.3 Deferoxamin

Deferoxamin wurde als Antidot für eine Eisenvergiftung entwickelt. Es kann zudem prophylaktisch zur Vorbeugung von Krankheiten, die mit einer Eisenüberladung, wie beispielsweise bei der Hämochromatose, einhergehen, genutzt werden. Dabei wirkt Deferoxamin als Chelator von Eisenionen. Dafür wurde Deferoxamin als eine langkettige Alkylkette, welche insgesamt drei Hydroxamsäuren besitzt, für diesen Zweck konzipiert [3]. Deferoxamin besitzt analog zu Fosmidomycin und FR900098 kein Chromophor und wurde daher in dieser Arbeit mithilfe des NADH-Assays (3.1.1) und der LC-MS-Methode (3.2.1) anstelle einer HPLC-Methode mit UV-Detektion getestet. Deferoxamin wurde dabei als Mesilatsalz in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt.

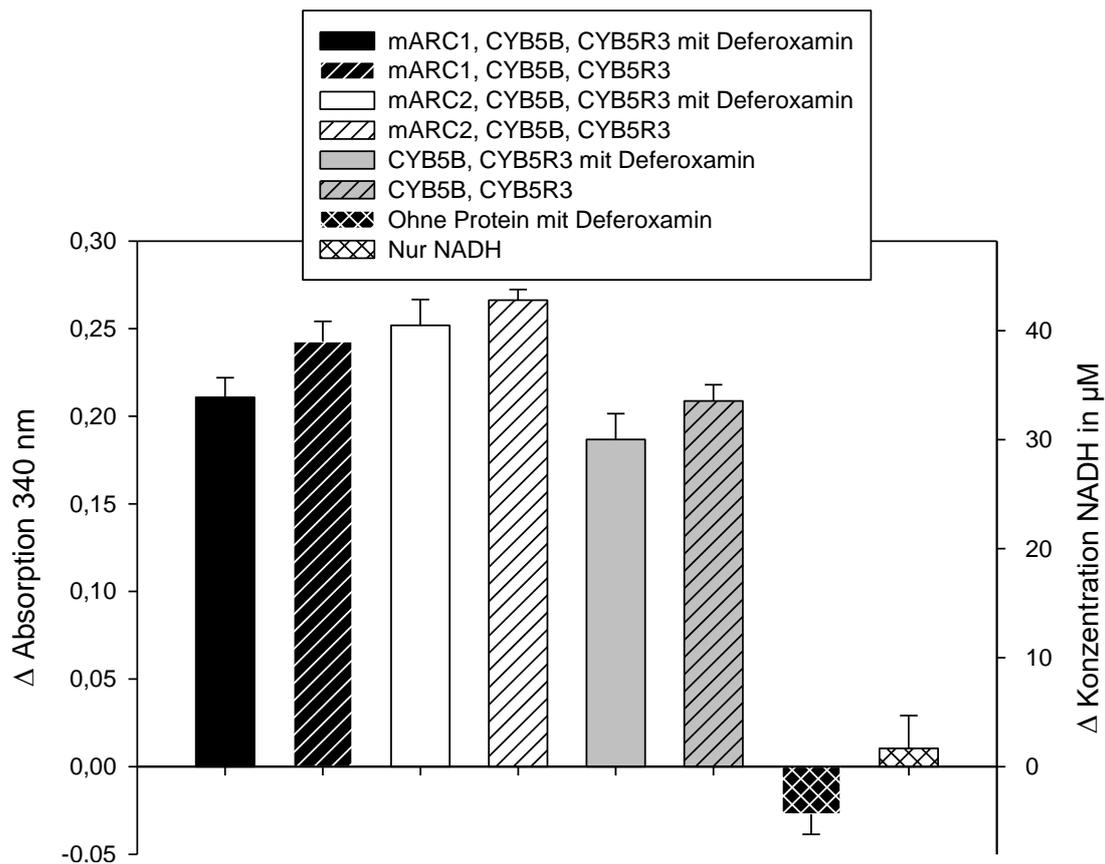


Abbildung 4.34: NADH-Assay Ergebnisse einer Deferoxamin Inkubationsreihe nach 15 min.

Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass Deferoxamin trotz der drei möglichen funktionellen Gruppen, welche theoretisch von mARC reduziert werden können (Abbildung 4.34), kein mARC-Substrat darstellt. Die Absorptionsänderungen für mARC1 und mARC2 befinden sich unterhalb der Kontrollen ohne Substrat. Diese Tatsache war aufgrund der vorherigen Ergebnisse, welche zeigen, dass Hydroxamsäuren nur reduziert werden, wenn diese nicht stark substituiert sind, zu erwarten. Die Hydroxamsäuren im Deferoxamin sind in den langen Alkylketten eingebettet und daher schwer zugänglich. Auch die Ergebnisse aus der LC-MS-Analytik zeigen keinerlei Hinweise auf eine Reduktion durch mARC.

#### **4.2.6 Nitrosamine**

##### **4.2.6.1 Einführung**

Die Gruppe der Nitrosamine umfasst eine Reihe von zumeist karzinogenen Verbindungen. Für den Menschen sind Nitrosamine aufgrund ihres Vorkommen in Lebensmittel und Genussmittel von besonderem Interesse. So bilden sich beispielsweise nach der Aufnahme von gepökelten Fleischerzeugnissen im Gastrointestinaltrakt Nitrosamine. Pökelsalz besteht zum Teil aus Nitritsalzen, welche als gewünschten Effekt die Haltbarkeit der Fleischwaren erhöhen. Im sauren Milieu des Magens können sich durch Protonierung reaktive Nitrosylkationen bilden, welche mit endogenen sekundären zu karzinogenen Nitrosamine reagieren [117]. Aus diesem Grund ist der Nitritgehalt in den Fleischerzeugnissen in Deutschland auf 0,5 % des Pökelsalzes begrenzt. Es ist zu berücksichtigen, dass auch Nitrat bakteriell zu Nitrit reduziert werden kann und somit dies eine weitere Quelle für Nitrit darstellt. Auch in der Arzneimittelherstellung haben Nitrosamine zu einer erhöhten Aufmerksamkeit geführt. So wurde im Jahr 2018 bekannt, dass bei der Produktion von Valsartan das Nitrosamin NDMA (*N*-Nitrosodimethylamin) als Verunreinigung im Prozess entstanden ist und auch im Fertigarzneimittel nachweisbar war. Nur ein Jahr später wurde bei einem Fertigarzneimittel mit Metformin als Wirkstoff abermals NDMA gefunden. Beide Ereignisse führten zur zahlreichen Rückrufen und einer öffentlichen Diskussion über die Arzneimittelsicherheit [118, 119].

Eine andere wichtige Aufnahmequelle für Nitrosamine stellt der Konsum von Tabakwaren dar. Tabakrauch enthält über 70 unterschiedliche karzinogene Stoffe. Nitrosamine, wie das vom Nikotin abgeleitete NNK, stellen dabei eine sehr potente karzinogene Gruppe dar [120]. Die Nitrosogruppe fungiert dabei als Präkarzinogen und wird erst durch den Metabolismus, genauer durch CYP450, zum Karzinogen umgewandelt [121]. In dem Prozess können unterschiedliche DNA-Addukte entstehen (Abbildung 4.35).

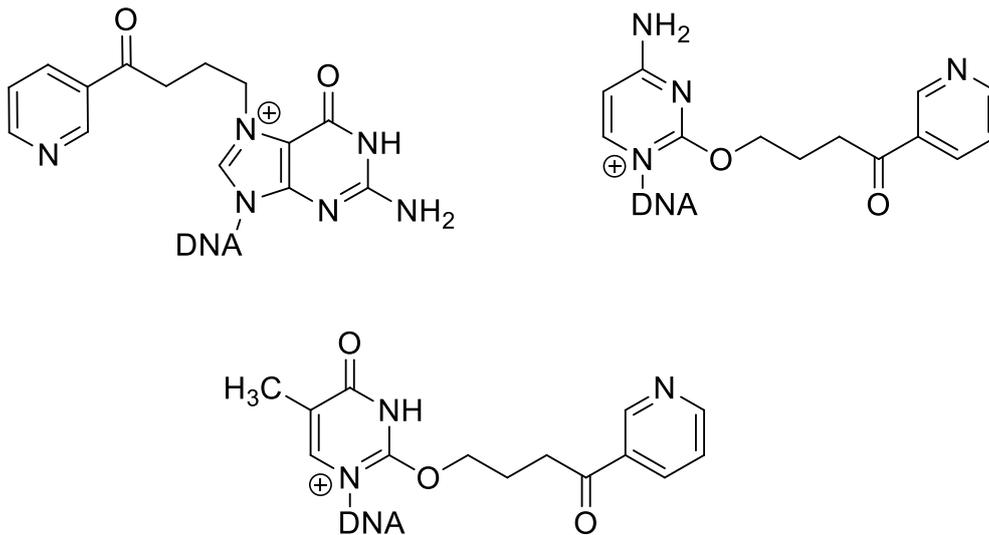


Abbildung 4.35: Nachgewiesene DNA-Addukte von NNK mit Guanin, Cytosin und Thymin nach Hecht [121].

Als ein Hauptkarzinogen des Tabakrauchs wurde NNK intensiv untersucht. Reduktive Detoxifizierung wurde dabei hauptsächlich über die enzymatische Modifizierung der Carbonylgruppe gefunden [121–123].

Nitrosamine wurden, auch aufgrund des kritischen Handlings, bislang noch nicht auf eine mARC-abhängige Reduktion getestet. Da zu den bekannten Verbindungen keine passenden durch Reduktion entstandene Metabolite *in vivo* gefunden wurden [121], erschien eine Reduktion durch mARC als unwahrscheinlich. Vielmehr sollte die These untersucht werden, ob diese Substanzen deswegen karzinogen sind, da sie nicht durch das mARC-Enzymsystem detoxifiziert werden können.

#### 4.2.6.2 NNK

Stellvertretend für die Gruppe der Nitrosamine wurden NNK nach den Methoden 3.1.1 und 3.2.1 in einer Konzentration von 3 mM getestet.

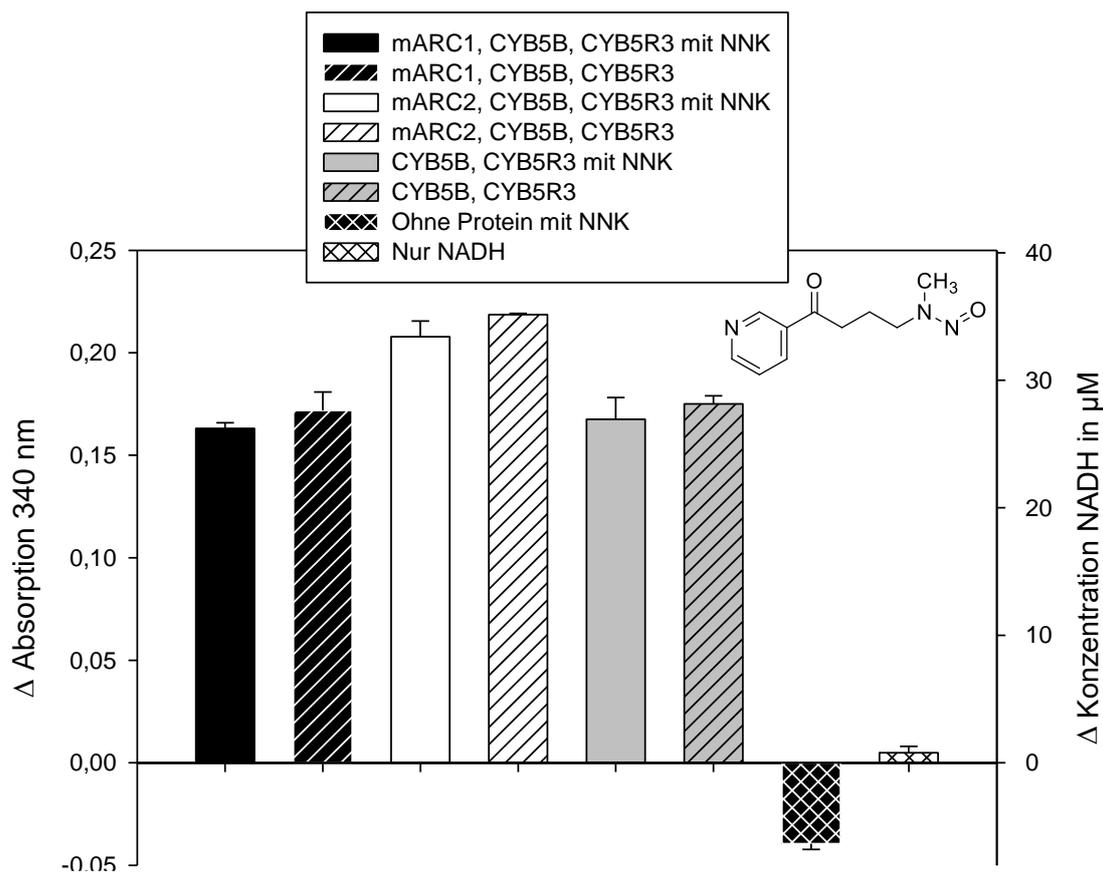


Abbildung 4.36: NADH-Assay Ergebnisse einer NNK Inkubationsreihe nach 15 min.

Abbildung 4.36 zeigt NNK ist kein mARC-Substrat. Keine Inkubation zeigte einen Unterschied zu den jeweiligen Kontrollen. Auch bei der LC-MS-Analytik konnte keinerlei reduziertes NNK gefunden werden (hier nicht gezeigt). Ausgehend von den Ergebnissen von NNK scheint mARC nicht in der Lage zu sein, Nitrosamine zu reduzieren. Hierfür müssten noch weitere unterschiedliche Nitrosamine untersucht werden, um dies zu verifizieren. Jedoch passen diese Resultate zu der Hypothese, dass gerade diejenigen Verbindungen mit reaktiver *N*-O-Bindung mutagen sind, die nicht durch das mARC-Enzymsystem detoxifiziert werden können.

#### 4.2.7 Hydroxylamin und *N*-hydroxylierte Nucleoside

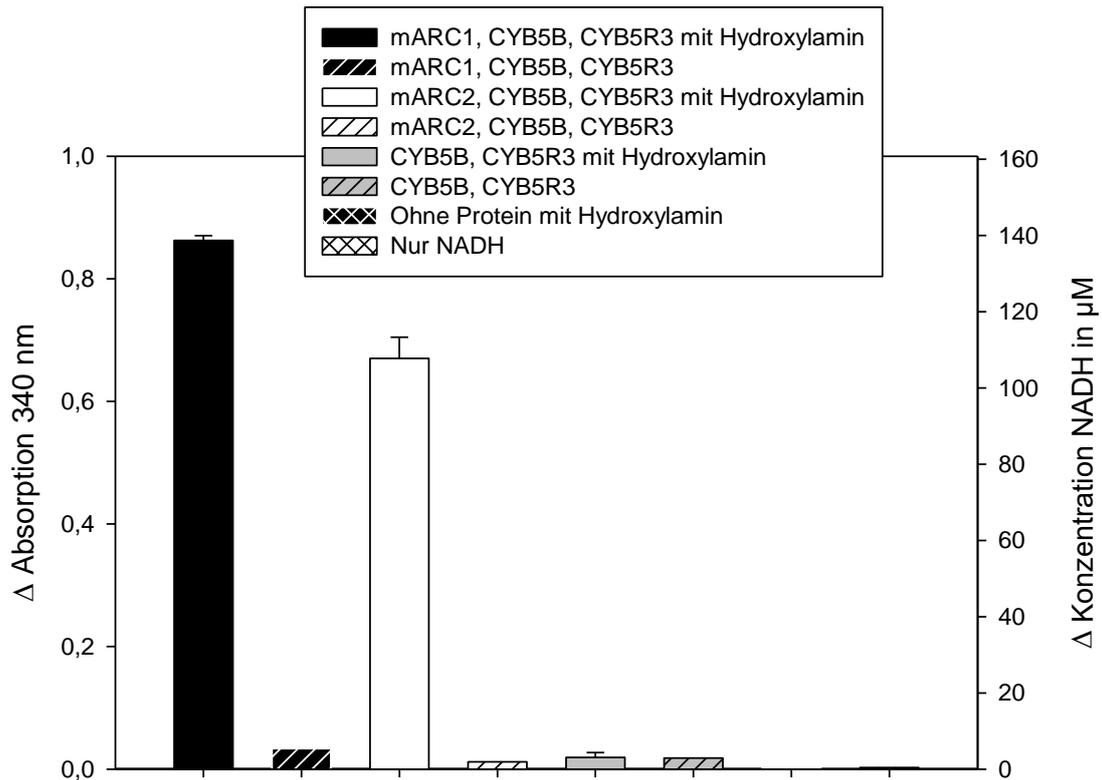
##### 4.2.7.1 Einführung

Die physiologische Rolle von Hydroxylamin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt durch seine vielseitige Anwendung in der Synthese, ist Hydroxylamin ein starkes nucleophil, welches mit diversen Verbindungen wie beispielsweise Nucleinbasen reagieren kann und somit potenziell mutagen ist [124]. Die hohe Aktivität macht einen direkten *in vivo* Nachweis von Hydroxylamin schwierig. Durch radioaktiv markierten Ammoniak konnte im Tiermodell jedoch Hydroxylamin physiologisch als Zwischenstufe identifiziert werden [125]. Es ist daher plausibel, dass Hydroxylamin als Zwischenstufe im Metabolismus produziert wird, welches

dann zum weniger reaktiven Ammoniak detoxifiziert werden muss. Aufgrund der physiologischen Funktion von mARC bei der Detoxifizierung von beispielsweise *N*-hydroxylierten Nucleosiden [43] erschien es daher sinnvoll, diese Substanz auf eine mARC-abhängige Reduktion zu testen.

#### 4.2.7.2 Hydroxylamin

Als sehr einfacher Vertreter der Substanzen mit *N*-O-Bindung wurde Hydroxylamin in einer Konzentration von 3 mM mit den Methoden 3.1.1, 3.1.2 und 3.4.2 getestet.



**Abbildung 4.37: NADH-Assay Ergebnisse einer Hydroxylamin Inkubationsreihe nach 1 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.

Der Versuch mit Hydroxylamin zeigte außerordentlich hohe Umsetzungsraten, sowohl für mARC1 als auch für mARC2. Selbst nach Reduzierung der eingesetzten Enzymmenge wurde das enthaltene NADH innerhalb einer Minute verbraucht. Diese Ergebnisse führten zu einer näheren Betrachtung dieser bemerkenswerten Umsetzungsrate mit dem Ammoniak-Assay (Methode 3.4.2). Dieser beruht auf der Umsetzung von Ammonium und 2-Oxoglutarat zur L-Glutaminsäure durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) (Abbildung 4.38).

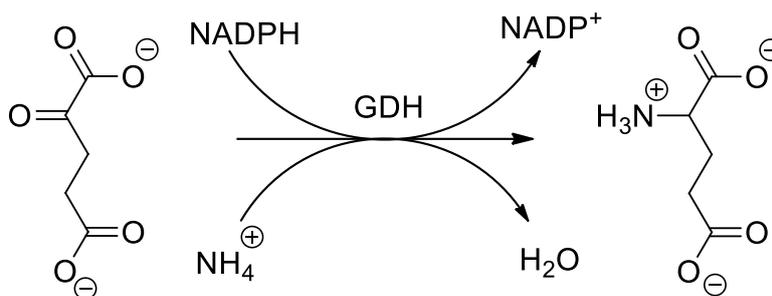


Abbildung 4.38: Enzymatisch katalysierte Umsetzung von 2-Oxoglutarat und Ammonium zur L-Glutaminsäure im sauren pH-Bereich.

Da diese Reaktion unter Verbrauch von NADPH stattfindet, beruht die Detektion der Reaktion, analog zu dem NADH-Assay, auf der Änderung der Absorption bei 340 nm. In der Masterarbeit von Neve konnten die Ergebnisse des NADH-Assays bestätigt werden und mithilfe des Ammoniak-Assays auch die Michaelis-Menten-Kinetik für die Umsetzung von Hydroxylamin ermittelt werden [126].

Tabelle 4.2: Enzymatische Kennziffern der Reduktion von Hydroxylamin durch mARC.

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{kat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$Kat_{\text{eff}}$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
mARC1	4,1	851	70,9	$1,7 \cdot 10^7$
mARC2	57,5	1719,2	145,3	$2,5 \cdot 10^6$

Die Ergebnisse aus Tabelle 4.2 machen deutlich, dass Hydroxylamin die bislang höchste für mARC gemessene Umsatzrate erzielt. Die Umsatzrate von Hydroxylamin ist dabei um mehr als den Faktor 3 größer als die von BAO, welches zuvor aufgrund der hohen Umsetzungsgeschwindigkeit als Modells substrat galt. Zwar verfügt mARC2 über einen deutlich höheren  $V_{\max}$ -Wert, jedoch ist die Affinität, erkennbar an dem  $K_m$ -Wert, von mARC1 um mehr als den Faktor 10 höher. Im physiologischen Kontext erscheint daher trotz der wesentlich höheren maximalen Umsatzrate von mARC2, mARC1 eine gleichermaßen wichtige Rolle im Hydroxylaminmetabolismus einzunehmen. Hierbei werden eher Konzentrationen im nM Bereich erwartet, sodass aufgrund des niedrigen  $K_m$ -Wertes mARC1 effizienter ist in der Detoxifizierung von Hydroxylamin bei diesen physiologischen Konzentrationen.

#### 4.2.7.3 N-hydroxylierte Nucleoside

Die N-hydroxylierten Nucleoside N-Hydroxycytidin und N-Hydroxyadenosin wurden bereits zuvor ausführlich auf eine mARC-abhängige Reduktion untersucht [43]. Da diese Substanzen der Gruppe der Hydroxylamine zuzuordnen ist, sollen diese hier kurz im Vergleich zum Hydroxylamin aufgeführt werden. Zusätzlich diente die Untersuchung dieser Substanz zur Überprüfung der etablierten Methoden mit den in der Literatur publizierten enzymatischen Kennziffern. N-Hydroxycytidin wurde in einer Konzentration von 3 mM und N-Hydroxyadenosin in einer Konzentration von 1 mM nach den Methoden 3.1.1 und 3.2.1 untersucht.

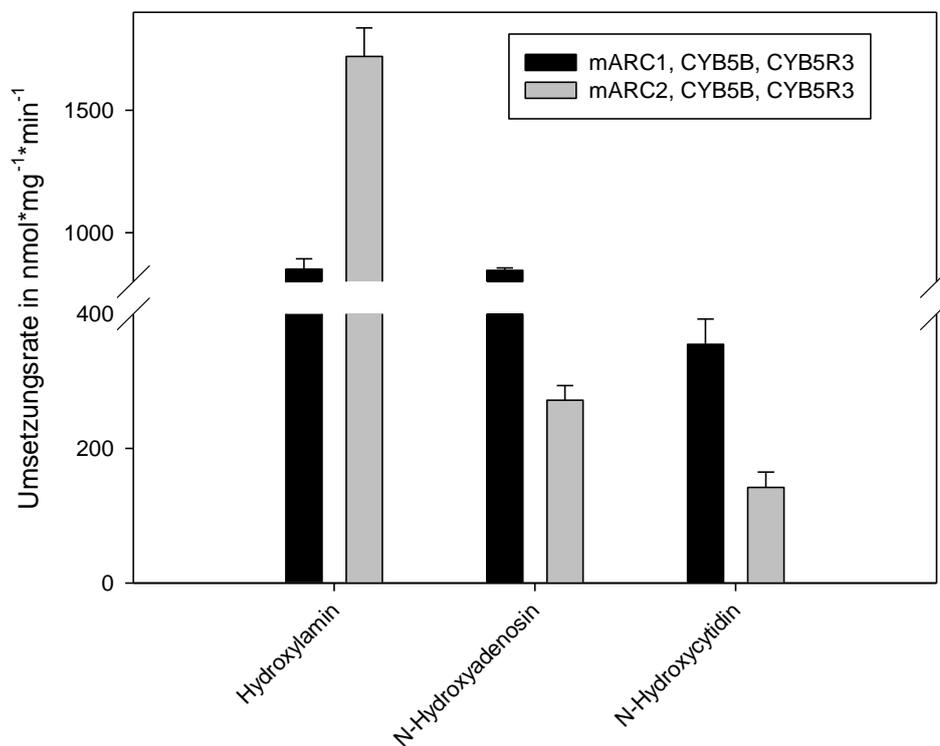


Abbildung 4.39: Vergleich der Umsetzungsrate von bekannten und neu getesteten Hydroxylaminen für mARC1 und mARC2.

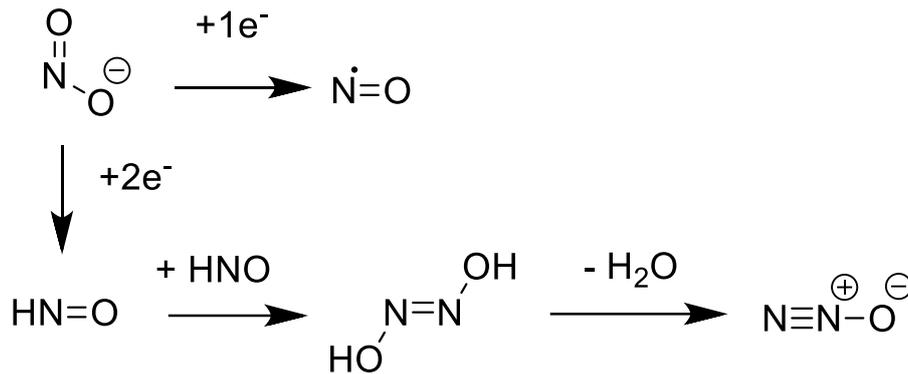
Die Ergebnisse aus dem NADH-Assay, dargestellt in Abbildung 4.39, korrelieren gut mit den bereits publizierten Daten von *Krompholz et al.* [43]. Sowohl bei den hier gezeigten Daten als auch bei den zuvor publizierten, besaß N-Hydroxyadenosin eine etwa doppelt so hohe Umsetzungsrate wie N-Hydroxycytidin. Ebenfalls konnte bei beiden Nucleosiden gezeigt werden, dass mARC1 eine etwa doppelt so hohe Umsetzungsrate besitzt wie mARC2. Diese Daten konnten genauso von der LC-MS-Analytik bestätigt werden, in der mARC1 eine Umsetzungsrate von  $954,5 \pm 118,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  und mARC2 eine Umsetzungsrate von

$291 \pm 70,8 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  für *N*-Hydroxyadenosin aufwies. Bei *N*-Hydroxycytidin ergab die LC-MS-Analytik eine Umsetzungsrate von  $354,8 \pm 96,1 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  für mARC1 und für mARC2 eine solche von  $184,2 \pm 16,8 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der direkte Vergleich mit Hydroxylamin. Zwar haben Hydroxylamin und *N*-Hydroxyadenosin eine sehr vergleichbare Umsetzungsrate für die Reduktion durch mARC1, jedoch erzielt das einfach aufgebaute Hydroxylamin eine wesentlich höhere Umsetzungsrate für mARC2. Da es sich prinzipiell über dieselbe funktionelle Gruppe handelt, die von mARC reduziert wird, zeigt dies wiederholt den Einfluss von Substituenten auf die mARC-abhängige Reduktion. Ausgehend von diesen Beobachtungen kann postuliert werden, dass mARC2 in Hinblick auf Struktur-Aktivitätsbeziehungen weniger substituierte Hydroxylamine präferiert.

## 4.2.8 Nitrit

### 4.2.8.1 Einführung

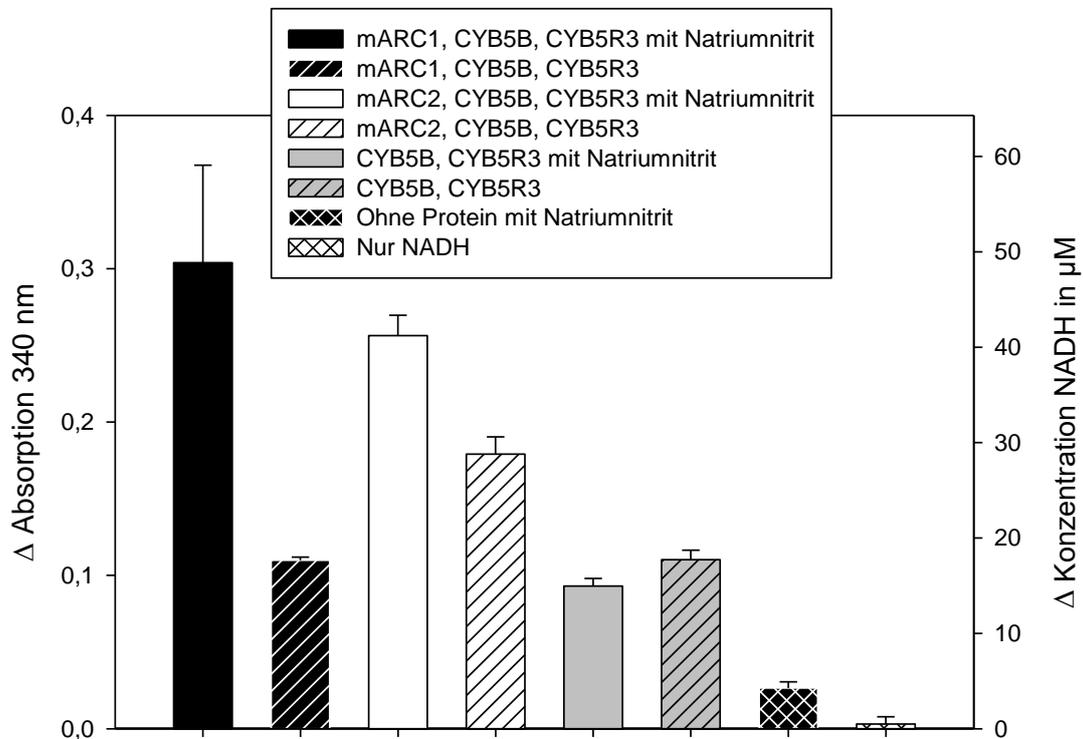
Nitrit ist eine wichtige Substanz aus dem Stickstoffkreislauf. Es entsteht durch Nitrifizierung aus Ammonium [127] und kann wiederum selbst weiter zu Nitrat oxidiert werden. Beide Reaktionen werden von Bodenbakterien unter Energiegewinn durchgeführt. Nitrat wiederum kann unter hypoxischen Bedingungen als Oxidationsmittel genutzt werden, selbst wird es dann wieder zum Nitrit reduziert. Das dafür verantwortliche Enzym, die Nitratreduktase, kommt in vielen Bakterien und einigen Pflanzen vor [128]. Wie in der Einleitung ausgeführt, ist die Nitratreduktase ebenfalls ein Molybdoenzym und eng mit mARC verwandt. Diese kommt jedoch nicht im Menschen vor. Aufgrund des ähnlichen Aufbaus untersuchte bereits die Arbeitsgruppe um *Sparacino-Watkins*, ob mARC in der Lage ist, Nitrit als Teil des Stickstoffkreislaufs zu reduzieren [46]. Unter anaeroben Bedingungen konnte dabei die Entstehung von Stickstoffmonoxid gemessen werden. In der Dissertation von *Schneider* wurde versucht, diese Ergebnisse zu reproduzieren, jedoch konnte keine Reduktion zum Stickstoffmonoxid gefunden werden [129]. Mechanistisch ist die Entstehung von Stickstoffmonoxid durch mARC interessant. Wie in Abbildung 4.40 dargestellt, ist dies eine Reduktion, bei der ein Elektron übertragen wird. Jedoch sind die mARC-katalysierten Reduktionen, die bislang dokumentiert wurden, gekennzeichnet durch die Übertragung von zwei Elektronen [16]. Auch eine solche Reduktion von Nitrit ist prinzipiell denkbar. Hierbei würde als Produkt Nitroxyl (HNO) entstehen, welches jedoch aufgrund der hohen Reaktivität zu anderen Produkten weiterreagieren würde. Ein mögliches Endprodukt stellt dabei  $\text{N}_2\text{O}$  dar. Auf Grundlage bisheriger mechanistischer Gesichtspunkte erscheint eine solche Reduktion plausibel. Da dieser Sachverhalt noch nicht endgültig aufgeklärt ist, wurde Nitrit in diesen Untersuchungen einbezogen.



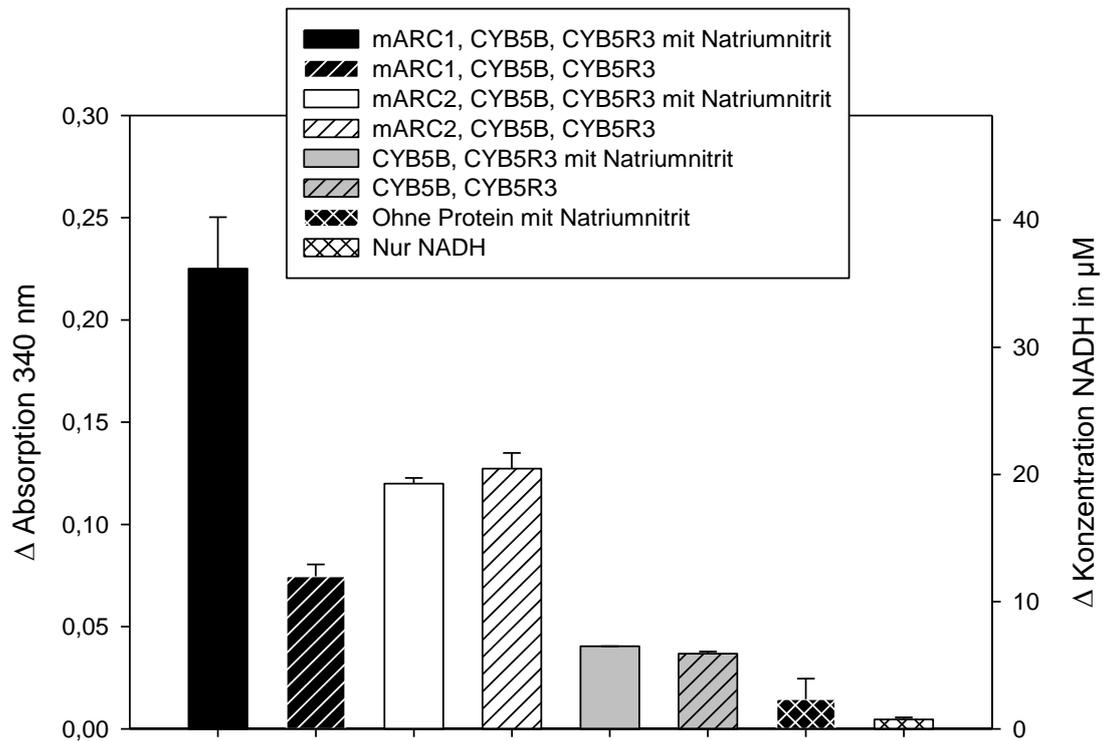
**Abbildung 4.40: Vereinfachte Darstellung des theoretischen Nitritmetabolismus mit der Übertragung eines Elektrons und der Übertragung von zwei Elektronen.** Die jeweiligen Reduktionsäquivalente sowie Teile der jeweils entstehenden Produkte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Neben der Dimerisierung von HNO sind weitere Reaktionen, welche abhängig sind von dem jeweiligen Milieu indem das HNO entsteht, denkbar.

#### 4.2.8.2 Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob es eine aerobe Reduktion von Nitrit durch mARC möglich ist, wurde Nitrit nach Methode 3.1.1 überprüft. Zudem wurden unterschiedliche Puffer (mit unterschiedlichen pH-Werten) benutzt, um die Beobachtungen von *Sparacino-Watkins* zu berücksichtigen.

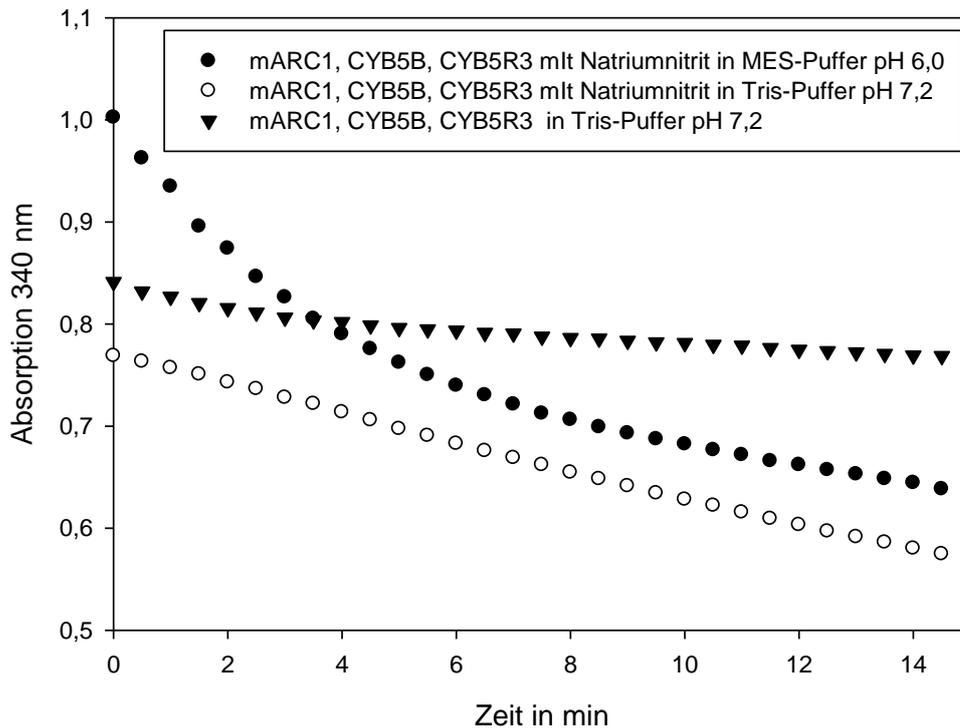


**Abbildung 4.41: NADH-Assay Ergebnisse einer Natriumnitrit Inkubationsreihe nach 15 min in MES-Puffer pH 6,0.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.



**Abbildung 4.42: NADH-Assay Ergebnisse einer Natriumnitrit Inkubationsreihe nach 15 min in Tris-Puffer pH 7,2.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert. Die Messung: CYB5B, CYB5R3 mit Natriumnitrit (in grau) enthält keinen Fehlerbalken, da die beiden Resultate aus der Doppelbestimmung ein nahezu identischen Wert aufweisen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Auswahl der Puffersubstanz einen Einfluss auf die Reduktionsraten aufweist. So sind bei Verwendung des Tris-Puffers für mARC2 keinerlei Unterschiede zu der Kontrolle ersichtlich, während die Abbildung 4.41 mit dem MES-Puffer auf eine, wenn auch sehr geringe, Aktivität von mARC2 hinweist. Auch der Reaktionsverlauf in MES-Puffer und in Tris-Puffer weist Unterschiede auf (Abbildung 4.43).



**Abbildung 4.43: Natriumnitrit-Inkubationen mit mARC1 in unterschiedlichen Puffern mit Kontrolle.**

An Abbildung 4.43 wird ersichtlich, dass bei unterschiedlichen Puffern neben dem Ergebnis, ob mARC2 dazu in der Lage ist Nitrit zu reduzieren, sich für die Reduktion durch mARC1 die Reaktionskinetik ändert. Während bei der Inkubation im Tris-Puffer, die für den NADH-Assay unter den Standardbedingungen übliche Kinetik 0. Ordnung zu sehen ist, folgt die Reaktion im MES-Puffer eher einer Kinetik der 1. Ordnung. Durch die Kontrolle wird ersichtlich, dass auch im Tris-Puffer ein stärkerer Verbrauch von NADH zu sehen ist als ohne Zusatz von Natriumnitrit. Der Reaktionsverlauf im MES-Puffer ist in dieser ausgeprägten Form nur bei mARC1 messbar, wobei auch bei mARC2 in den ersten Minuten die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu dem Ende der Messzeit leicht erhöht ist. Bei den Kontrollen von CYB5B und CYB5R3 mit Natriumnitrit ist eine Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit während des Versuchs nicht erkennbar. Die Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei mARC1 im MES-Puffer ist im Vergleich zu den Messungen mit anderen Substraten ungewöhnlich. Im Mittelwert von zwei Versuchen lag der Unterschied in der Absorption bei 340 nm zwischen Minute 0 und Minute 5 bei 0,195 (entspricht etwa einem Verbrauch von 31,35  $\mu\text{mol}$  NADH) im Vergleich dazu lag der Unterschied zwischen Minute 10 und Minute 15 bei denselben Inkubationen bei 0,04 (entspricht etwa einen Verbrauch von 6,43  $\mu\text{mol}$  NADH). Die Kontrolle ohne Natriumnitrit hatte durchgehend eine Absorptionsdifferenz von 0,037 pro 5 Minuten

(entspricht etwa einen Verbrauch von 5,94  $\mu\text{mol}$  NADH). Daraus wird deutlich, dass nach der anfänglichen Umsetzung von Natriumnitrit die Reaktionsgeschwindigkeit auf das Niveau der Kontrollen ohne Substrat fällt. Diese Beobachtung konnte bei den Versuchen mit Tris-Puffer, wie auch in Abbildung 4.43 ersichtlich, nicht gemacht werden. Da jedoch, dieser Reaktionsverlauf nur bei mARC1 in dieser Form ausgeprägt ist, erscheinen Erklärungsversuche einer rein chemischen Umsetzung, die pH-Wert-abhängig ist, als unwahrscheinlich. Die Daten deuten eher auf eine Giftung durch das entstehende Produkt hin (analog zu den Beobachtungen aus Kapitel 4.6.2). Da das Edukt (Natriumnitrit) im starken Überschuss vorliegt und auch das NADH noch in ausreichender Konzentration vorlag, muss es auf der Seite der Enzyme während der Umsetzung zu einer Veränderung kommen. Hierbei deuten die Daten daraufhin, dass dies wiederum pH-Wert-abhängig ist, da bei höheren pH-Werten die Reaktionsgeschwindigkeit unverändert bleibt. Eine mögliche Erklärung hierfür würde die Reduktion zu dem sehr reaktiven HNO geben. Diese Reaktion stellt die für mARC übliche zwei-Elektronenreaktion dar. HNO reagiert dabei nicht nur mit sich selbst, sondern kann auch leicht mit anderen nucleophilen Bestandteilen reagieren. Dabei sind Cysteine mögliche Ziele [130], welche dann wiederum zu einer Beeinträchtigung der Aktivität führen und somit den Versuchsverlauf erklären würden. Dies wäre im Fall von mARC1 insbesondere kritisch, wenn das Moco-koordinierende Cystein 273 mit HNO reagieren würde. Da dieses Teil des katalytischen Zentrums ist und somit wichtig für die Reduktion ist, wäre eine Reaktion von Cystein 273 denkbar (auch nachzuvollziehen anhand von Abbildung 4.65). Bei einer Mutation von Cystein 273 beobachtete die Arbeitsgruppe von *Sparacino-Watkins* keine Nitritreduktion mehr [46].

Als weiteres Produkt der Reaktion fällt (nach der Abspaltung von Wasser) aus der zuvor durch Dimerisierung entstandenen hyposalpetrigen Säure, das  $\text{N}_2\text{O}$  an (Abbildung 4.40). Eine genauere Untersuchung dieser Ergebnisse erfolgte durch die Vermessung von  $\text{N}_2\text{O}$  via GC. Die erhaltenen Daten waren jedoch durch zu große Variabilität unzureichend aussagekräftig und sind daher hier nicht aufgeführt. Weitere Versuche  $\text{N}_2\text{O}$  via GC zu quantifizieren sind in der Masterarbeit von *Neve* zu finden [126]. Der endgültige Nachweis zu welchem Produkt eine Reduktion von Nitrit durch mARC führt, konnte auch hier nicht endgültig erbracht werden. In diesem Zusammenhang ist die geringe Umsetzungsrate auch problematisch, da das jeweilige Produkt sehr wahrscheinlich gasförmig vorliegt und somit eine Methode angewendet werden muss, welche sehr empfindlich ist und ein niedriges Detektionslimit besitzt. Im Falle der Reduktion zum HNO ist es ebenfalls sehr wahrscheinlich, dass als Produkt neben  $\text{N}_2\text{O}$  viele weitere mögliche Produkte entstehen (z.B. nach Reaktion mit den Proteinen), welche nicht detektiert werden können. Hierzu müssten aufwendigere Methoden zur direkten Detektion von HNO benutzt werden. So wurde beispielsweise erfolgreich die Reduktion von Kupfer mit HNO durchgeführt. Das Kupfer ist dabei selber an einem Fluorophor gebunden, welches durch die

Reduktion des Kupfers fluoresziert [131]. Dies ist nur eine von diversen Methoden zum Nachweis von HNO.

#### 4.2.9 *N-O*-haltige Heterozyklen

##### 4.2.9.1 Einführung

Aus den vorherigen Ergebnisse wird deutlich, dass mARC in der Lage ist eine Vielzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen mit *N-O*-Bindung zu reduzieren. Gemeinsam haben alle bisherigen Beispiele jedoch, dass sie sich in einem aliphatischen System befinden oder anorganischer Natur sind. Nicht untersucht wurde bislang die Reduktion von *N-O*-Bindungen im Aromaten. Naheliegend war es daher entsprechende Heterozyklen zu betrachten. Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, wie eine *N-O*-Bindung im Heterozyklus vorliegen kann. So wurde beispielsweise das 1,2,5-Oxadiazol bereits als Teil von Epcadostat mit untersucht. Zwar konnte hier eine Reduktion beobachtet werden, jedoch konnte diese durch die LC-MS-Methode zweifelsfrei auf die Amidoximgruppe zurückgeführt werden. Da der Massenunterschied nicht wie bei den aliphatischen Reduktionen auf -16 m/z zu beziffern ist, sondern bei der Auflösung des Aromaten die Stickstoffe jeweils ein Wasserstoffatom aufnehmen müssten, wäre hier der theoretische Massenunterschied zu der Ausgangsverbindung bei -14 m/z. Die Abbildung 4.18 zeigt jedoch deutlich, dass dies nicht der Fall ist. Allgemein sind Reduktionen von anderen Heterozyklen aber gut dokumentiert. Beispiele hierfür sind die beiden etablierten Arzneistoffe Leflunomid und Zonisamid. Zonisamid ist ein Antikonvulsivum bei dem der reduktive Metabolismus des 1,2-Benzisoxazols *in vivo* festgestellt wurde [132]. Untersuchungen mit subzellulären Leberfraktionen zeigten eine NADPH-abhängige Reduktion im 9000 g Überstand [133]. In der Fachinformation zu Zonisamid wird auf dem reduktiven Abbau zum Hauptmetabolit SMAP (2-Sulfamoylacetylphenol) durch das Enzym CYP3A4 hingewiesen [134]. Mechanistisch soll nach der Spaltung des Benzisoxazols das entstehende Imin durch Wasser hydrolysiert werden und anschließend das Keton entstehen, welches dann als Metabolit nachgewiesen werden kann [133].

Leflunomid, ein Immunsuppressivum, ist ein Prodrug, welches erst durch die Spaltung des Isoxazols in Darmwand und Leber etwa zu 70 % zum aktiven Teriflunomid (A771726) metabolisiert wird [135, 136]. Die Umsetzung konnte mit keinem spezifischen Enzym in ein Zusammenhang gebracht werden [137]. Diese Substanzen stellen jedoch nur ein kleiner Teil der bekannten Arzneistoffe mit Isoxazolen dar. Das Strukturelement ist weit verbreitet und unter anderem in Sulfamethoxazol, Sitaxentan oder Danazosin zu finden.

#### 4.2.9.2 Isoxazole

Für die Untersuchung, ob mARC in der Lage ist aromatische *N*-*O*-Bindungen zu reduzieren wurde eine Reihe von Substanzen getestet. Hierzu wurden zwei nur schwach substituierte Modellverbindungen genutzt (5-Amino-3-methylisoxazol und 3-Bromomethylisoxazol) sowie die beiden Arzneistoffe Leflunomid und Zonisamid von denen der *in vivo* Metabolismus unter Reduktion des Isoxazols bekannt ist (Formeln in Abbildung 4.44). Alle Substanzen wurden nach den Methoden 3.1.1 und 3.2.1 getestet. Leflunomid wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit als gesättigte Lösung in 10 % DMSO bei 10000 rpm über 20 min mittels Vivaspin Ultrafiltrationseinheit als Lösung in einer unbekanntenen Konzentration gewonnen. Mittels LC-MS konnte nachgewiesen werden, dass eine hinreichend hohe Konzentration von Leflunomid im Versuchsansatz vorhanden war.

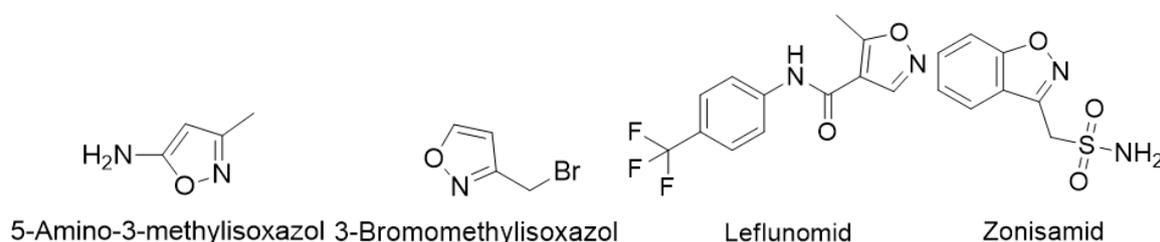


Abbildung 4.44: Strukturformeln der untersuchten Isoxazole.

Bei keinen der untersuchten Substanzen konnte eine Reduktion detektiert werden. Auch bei den LC-MS Untersuchungen konnte kein Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden. Ausgehend von den getesteten Substanzen ist mARC nicht in der Lage die *N*-*O*-Bindung in einem aromatischen System zu reduzieren. Es kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass mARC andere heterozyklische Verbindungen reduzieren kann oder, dass auch bei den Verbindungen eine Reduktion mit sehr niedrigen Umsetzungsraten stattfand, welche unterhalb des Detektionslimits der Methoden liegt.

### 4.3 Substrate/funktionelle Gruppen mit *O*-*O*-Bindung

#### 4.3.1 Theoretische Grundlagen

Die *O*-*O*-Bindung ähnelt in vielerlei Hinsicht der *N*-*O*-Bindung. Sowohl die Bindungslänge (*O*-*O*: 140 pm, *N*-*O*: 148 pm) als auch die Bindungsenergie (*O*-*O*: 142 kJ/mol bei 25°C, *N*-*O*: 201 kJ/mol bei 25°C) sind vergleichbar [138]. Daher erscheint es gut möglich, dass ein Enzym wie mARC, welches Substanzen mit *N*-*O*-Bindungen reduzieren kann, auch in der Lage ist, Substanzen mit einer *O*-*O*-Bindung zu reduzieren. Peroxycarbonsäuren, Peroxide sowie Hydroperoxide stellen relevante funktionelle Gruppen mit *O*-*O*-Bindung dar. Diese Gruppen bilden im Kontext der Arzneimitteltherapie eher eine untergeordnete Rolle. Hohe chemische Reaktivität und Neigung zur Bildung von Radikalen sind Substanzeigenschaften, die bei einer

Verwendung als Arzneimittel unerwünscht sind. Eine Ausnahme bildet das Benzoylperoxid, welches topisch zur Anwendung der Behandlung der *Acne Vulgaris* eingesetzt wird [139]. Dabei werden hierbei die reaktiven Eigenschaften genutzt. Das lipophile Peroxid gelangt in die oberen Hautschichten und bildet dort reaktiven Sauerstoff, welcher antimikrobiell, keratolytische und entzündungshemmende Eigenschaften aufweist [140]. Im physiologischen Kontext hingegen stellen Peroxide und Hydroperoxide eine wichtige Gruppe dar. Peroxide kommen z.B. als Zwischenschritt bei der Bildung von Leukotrienen aus der Arachidonsäure vor [141].

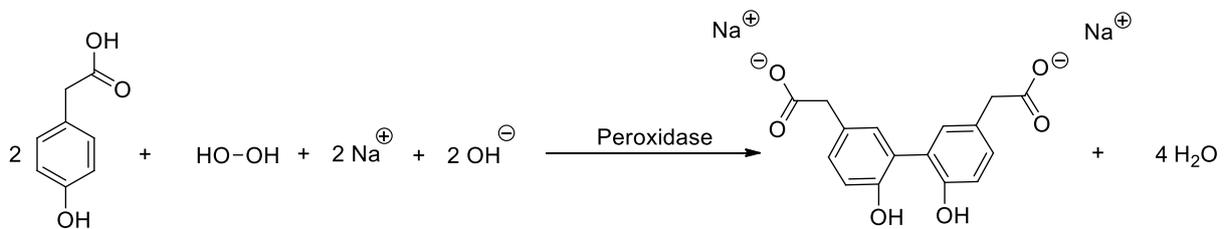
Die zweifellos wichtigste Substanz ist das Wasserstoffperoxid. Die physiologische Relevanz von Wasserstoffperoxid wurde erst in den letzten Jahrzehnten evaluiert. Während im historischen Kontext Wasserstoffperoxid lediglich als Zellgift angesehen wurde, welches detoxifiziert werden muss [142], sind heutzutage die vielfältigen zellulären Funktionen von Wasserstoffperoxid besser untersucht. Als Redoxsignalmolekül kann es, je nach Konzentration, unterschiedliche Zellreaktionen hervorrufen. Wobei die extrazelluläre Konzentration von Wasserstoffperoxid um den Faktor 100 höher ist als die intrazelluläre [143]. Geringere intrazelluläre Konzentrationen (1 nM bis 10 nM) führen zu Zellproliferation [144], Zellformung [145], Zellmigration und Angiogenese [143]. Neben diesen ist Wasserstoffperoxid nachweislich involviert bei der Wundheilung [146], dem Insulinsignalweg [147] sowie dem Altern und dem circadianen Rhythmus [148]. Besonders hohe Wasserstoffperoxidkonzentrationen von bis 100 nM konnten in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [149]. Diese Zellen des angeborenen Immunsystems richten sich vor allem gegen bakterielle Infektionen und können diese unter anderem mithilfe des sogenannten *oxidativen Burst* attackieren. Diese ermöglicht die intrazelluläre Verdauung von phagozytierenden Zellen, indem reaktive Sauerstoffspezies aus Vesikeln freigesetzt werden und so oxidativer Stress auf ein Bakterium ausgeübt werden kann [149]. Zu hohe intrazelluläre Konzentrationen wirken als Zellgift. So werden beispielsweise Entzündungsreaktionen über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ausgelöst [150] oder es kommt zur Apoptose der Zelle [151]. Die nachweislich hohe intrazelluläre Konzentration von Wasserstoffperoxid in Granulozyten lässt den Schluss zu, dass die tolerable Stoffmenge an Wasserstoffperoxid vom spezifischen Zelltypus abhängig ist. Die intrazelluläre Wasserstoffperoxidregulierung unterliegt komplexen Mechanismen unter Beteiligung einer Vielzahl von Enzymen, welche für die Feinregulierung verantwortlich sind. Es sind derzeit insgesamt 31 humane Enzyme bekannt, welche als End- oder Nebenprodukt Wasserstoffperoxid erzeugen können [152]. Als Beispiel für die Bildung von Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt sei die Xanthinoxidoreduktase genannt, welche bei dem Abbau von Hypoxanthin zur Harnsäure Wasserstoffperoxid freisetzt [153].

Die größten Quellen für Wasserstoffperoxid im zellulären Kontext stellen dabei die Peroxisomen und die mitochondriale Atmungskette dar. Ein in diesem Zusammenhang sehr wichtiges Enzym ist die Superoxiddismutase, welches in der Lage ist sehr reaktive Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid umzuwandeln [154]. An dem Abbau von Wasserstoffperoxid sind je nach Zellorganell unterschiedliche Enzyme beteiligt. Einer der bedeutendsten Enzyme in diesem Zusammenhang ist die Katalase. Es gibt sowohl cytosolische Katalase als auch mitochondriale Katalase. Katalasen können durch Disproportionierung Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abbauen [155]. Sie sind dabei höchst effizient und gehören zu den Enzymen mit der größten Wechselzahl und der höchsten katalytischen Effizienz [156]. Knockout-Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass ein Mangel an Katalase zu phänotypischen Veränderungen führt, welche sich durch eine Fettleber, Übergewicht und einer prädiabetischen Insulinresistenz äußern [157].

Neben der Katalase sind vor allem die Enzymfamilien der Peroxiredoxine und Peroxidasen für einen Großteil der Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid verantwortlich [142]. Diese Redundanz an unterschiedlichen Enzymen, welche vermeintlich die gleiche Aufgabe innehaben, lässt sich am besten durch eine Koevolution von antioxidativen und prooxidativen zellulären Prozessen erklären. Je nach Zellorganell und Zellart haben unterschiedliche intrazelluläre Wasserstoffperoxidkonzentrationen unterschiedliche Zellantworten zur Folge [158], welche beispielhaft schon genannt wurden. Der Gradient zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Wasserstoffperoxidkonzentration zeigt, dass Wasserstoffperoxid nicht ohne weiteres in der Lage ist, Zellmembranen durch Diffusion zu überwinden [159]. Zum einen sorgen die unterschiedlichen Wasserstoffperoxid-verbrauchenden Enzyme, welche sich in den Membranen befinden, für einen stark verminderten Austausch. Zum anderen gibt es Kanäle und Transporter, welche einen gezielteren Austausch ermöglichen. Hierbei sind neben den VDAC 1/2/3 vor allem die Peroxiporine zu nennen, welche sich von den Aquaporinen ableiten [160]. Insgesamt gesehen ist die zelluläre Wasserstoffperoxidregulierung ein komplexes Gebilde von unterschiedlichen Akteuren, welche in einem empfindlichen Gleichgewicht dafür sorgen, dass eine physiologische Konzentration aufrechterhalten wird.

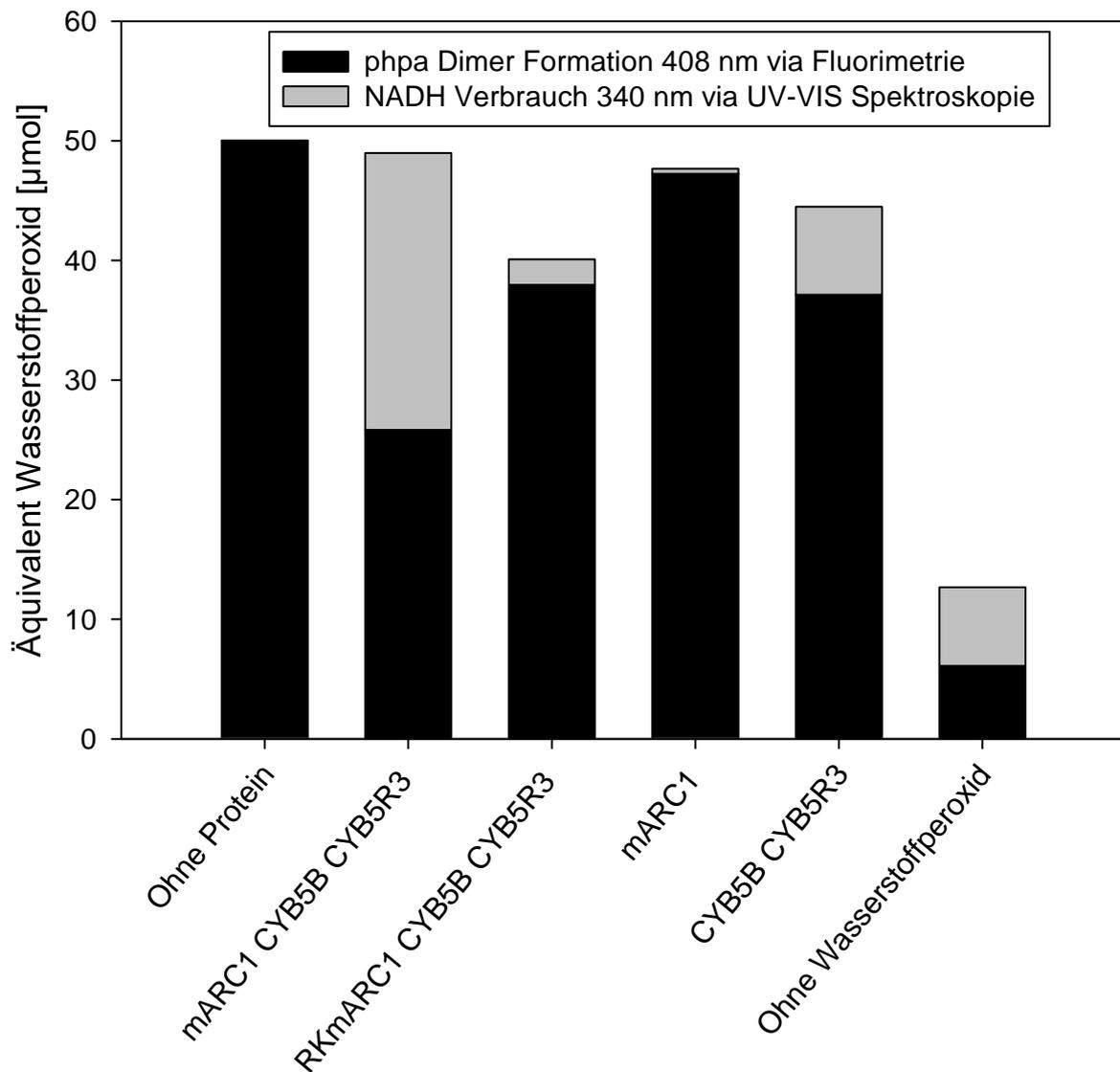
### 4.3.2 Wasserstoffperoxid

Für die Untersuchungen zur Reduktion von O-O-Bindungen wurden umfangreiche Versuche mit Wasserstoffperoxid durchgeführt. Obwohl Wasserstoffperoxid ein starkes Zwei-Elektronen-Oxidationsmittel ist, ist die Reaktivität in biologischen Assays gering. Aufgrund einer hohen Aktivierungsenergie-Barriere reagiert es vergleichsweise schlecht mit den meisten zellulär vorkommenden Molekülen, einschließlich Antioxidantien mit niedrigem Molekulargewicht. Die Reaktionen mit Wasserstoffperoxid sind daher eher kinetisch als thermodynamisch getrieben [142]. Zur Detektion der Umsetzung wurde neben dem Standard NADH-Assay (Methode 3.1.1) zudem ein fluorimetrischer Assay (Methode 3.3.1) entwickelt (auf Basis von *Guilbault et al.* [161]). Dieser basiert darauf mithilfe von Meerrettichperoxidase nach der Reaktion vorhandenes Wasserstoffperoxid in ein fluorimetrisch vermessbares Produkt zu überführen (Abbildung 4.45).

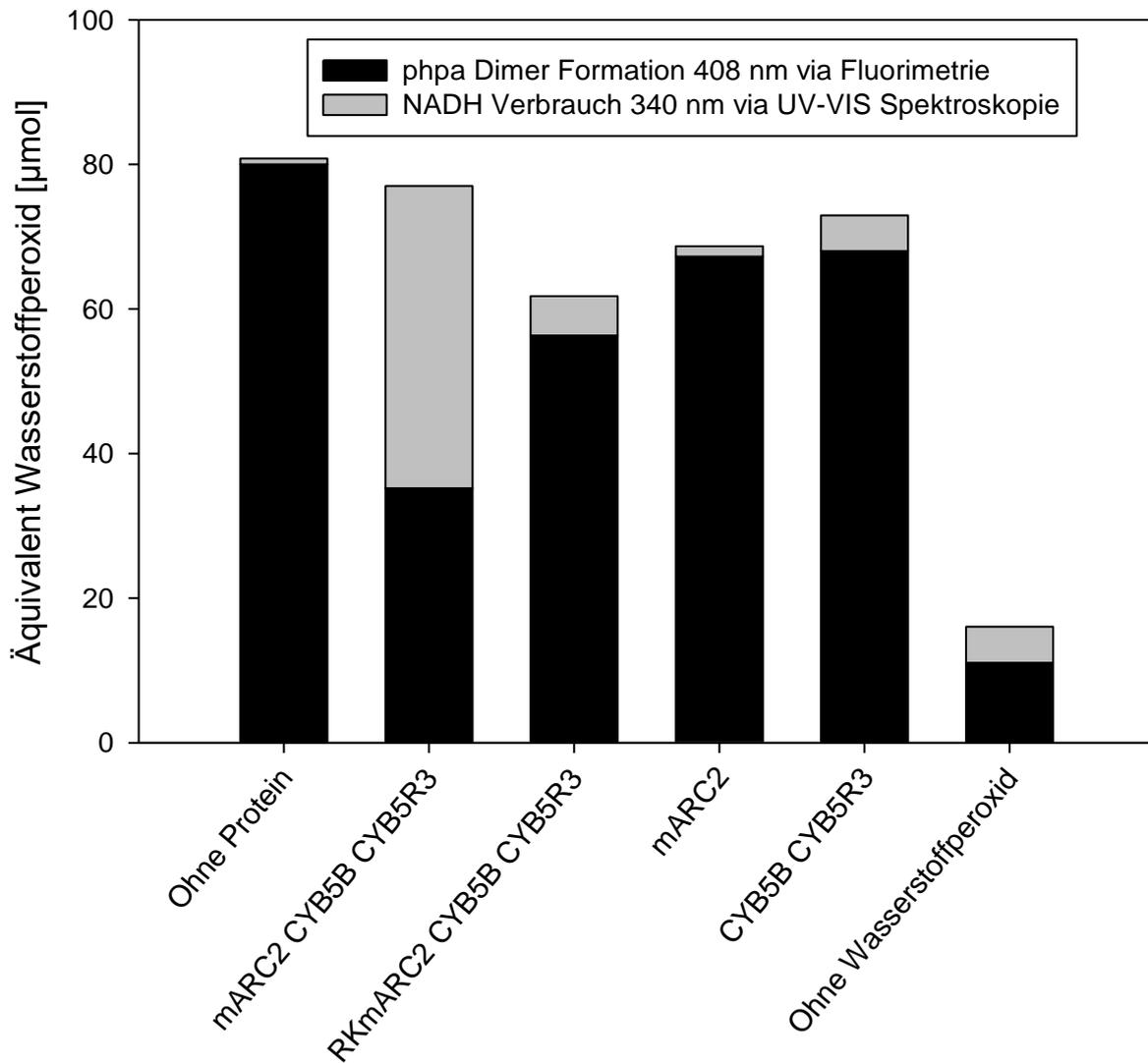


**Abbildung 4.45:** Enzymatisch katalysierte Reaktion von 4-Hydroxyphenylelessigsäure (phpa) mit Wasserstoffperoxid im basischen zu 2-2'-Dihydroxybiphenyl-5,5'-Essigsäure (phpa-Dimer) und Wasser.

Bei dem NADH-Assay wurde auf eine geringere Kontaktzeit zwischen Wasserstoffperoxid und den Enzymen geachtet, da die Gefahr der Inaktivierung von Proteinen durch Wasserstoffperoxid bei hohen Konzentrationen besteht. Deswegen wurde Wasserstoffperoxid nicht koinkubiert sondern erst unmittelbar vor der NADH Zugabe eingesetzt. Des Weiteren wurde die Kinetik der Reaktion nach der Methode 3.1.2 ermittelt.



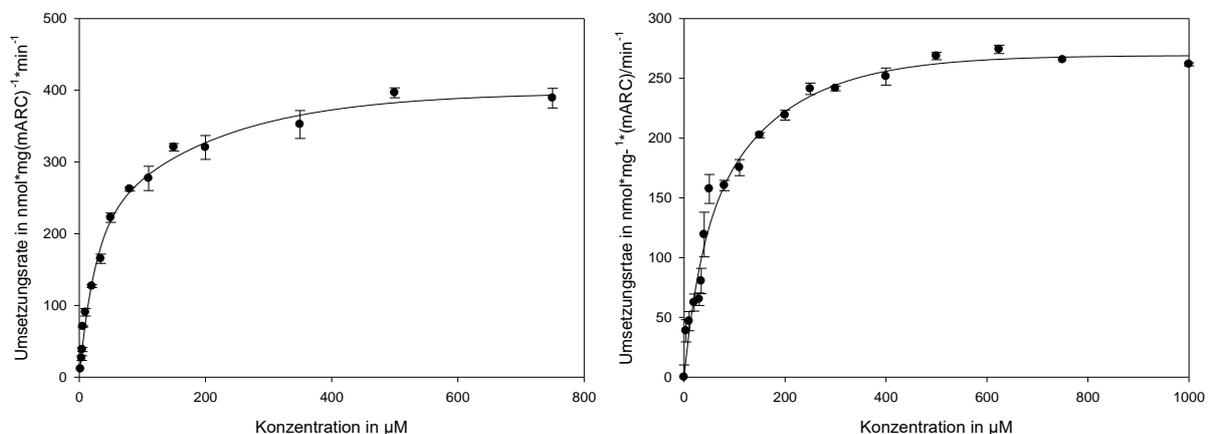
**Abbildung 4.46: Vergleich von mARC1-Inkubationen mit verschiedenen Proteinen.** Dargestellt sind die Mittelwerte einer 5-fachen Bestimmung. Auf die Darstellung der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Mit Ausnahme der Ansätze ohne Wasserstoffperoxid wurden in jeder Inkubation 50 µmol Wasserstoffperoxid eingesetzt. Die Wasserstoffperoxidäquivalenzkonzentration in Form der phpa-Dimerbildung ergibt sich aus der Kalibrierkurve. Der NADH-Verbrauch errechnet sich aus der Absorptionsdifferenz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bei 37 °C. Der Verbrauch von NADH ohne Wasserstoffperoxid, wurde jeweils subtrahiert. RKmARC1 ist eine inaktivierte mARC1-Variante, die den Molybdän-Cofaktor nicht binden kann.



**Abbildung 4.47: Vergleich von mARC2-Inkubationen mit verschiedenen Proteinen.** Dargestellt sind die Mittelwerte einer 5-fachen Bestimmung. Auf die Darstellung der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Mit Ausnahme der Ansätze ohne Wasserstoffperoxid wurden in jeder Inkubation 80 µmol Wasserstoffperoxid eingesetzt. Die Wasserstoffperoxidäquivalenzkonzentration in Form der phpa-Dimerbildung ergibt sich aus der Kalibrierkurve. Der NADH-Verbrauch errechnet sich aus der Absorptionsdifferenz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bei 37 °C. Der Verbrauch von NADH ohne Wasserstoffperoxid, wurde jeweils subtrahiert. RkMARC2 ist eine inaktivierte mARC2-Variante, die den Molybdän-Cofaktor nicht binden kann.

Für mARC1 und mARC2 wurden unterschiedliche Konzentrationen getestet, da mARC1 bei höheren Wasserstoffperoxid-Konzentrationen weniger stabil als mARC2 ist und der Abbau nicht mehr linear nachvollziehbar ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.46 (mARC1 50 µmol pro Assay) und Abbildung 4.47 (mARC2 80 µmol pro Assay) zusammengefasst. In beiden Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass das 3-Komponentensystem im NADH-Assay im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant höhere Änderung der Absorption zeigt. Die

Unterschiede in den Kontrolleexperimenten spiegeln sich auch in den Inkubationen ohne Wasserstoffperoxid wider und weisen auf einen CYB5B- und CYB5R3-abhängigen Abbau von NADH hin, der ebenfalls zuvor beschrieben wurde [44]. Dies zeigt sich auch bei Inkubationen, die nur mARC1 oder mARC2 enthalten und keinen signifikanten Abbau im NADH-Assay zeigen. Die festgestellte Bildung der ppha-Dimere bei den 3-Komponentensystemen stimmt gut mit den verbrauchten NADH-Mengen überein. Sowohl für mARC1 als auch für mARC2, in Kombination mit CYB5B und CYB5R3, ist die Wasserstoffperoxidkonzentration, die im gekoppelten Assay nachgewiesen wurde, mit der Leerwertprobe ohne Protein im fluorimetrischen Assay vergleichbar. Darüber hinaus kann in den Experimenten nur mit mARC1 oder mARC2 sowie in den Ansätzen mit CYB5B und CYB5R3 die verwendete Wasserstoffperoxidkonzentration als Summe von NADH-Assay und Fluorometrie gut reproduziert werden. Die Ansätze mit RkMARC zeigen eine größere Diskrepanz in den detektierten und eingesetzten Wasserstoffperoxidmengen. Bei diesen Ansätzen scheint es zu einer Umsetzung von Wasserstoffperoxid gekommen zu sein, welche nicht in einem der beiden Assays nachvollzogen werden konnte. Aber selbst bei diesen Ansätzen zeigt das 3-Komponentensystem einen deutlich höheren Wasserstoffperoxidverbrauch. Ausgehend von diesem Nachweis über die Reduktion von Wasserstoffperoxid wurde die Enzymkinetik mithilfe des NADH-Assays nach der Methode aus 3.1.2 ermittelt (Abbildung 4.48)



**Abbildung 4.48: Michaelis-Menten-Kinetik der Umsetzung von Wasserstoffperoxid durch mARC1 (links) und mARC2 (rechts).** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer 3-fach-Bestimmung mit Fehlerbalken. Die Umsatzrate wurde über den NADH-Assay mit der mARC-Konzentration als Gesamtproteinkonzentration berechnet. Die Kurven wurden mit der Formel  $y = a(1 - e^{-bx}) + c(1 - e^{-dx})$  gefittet.

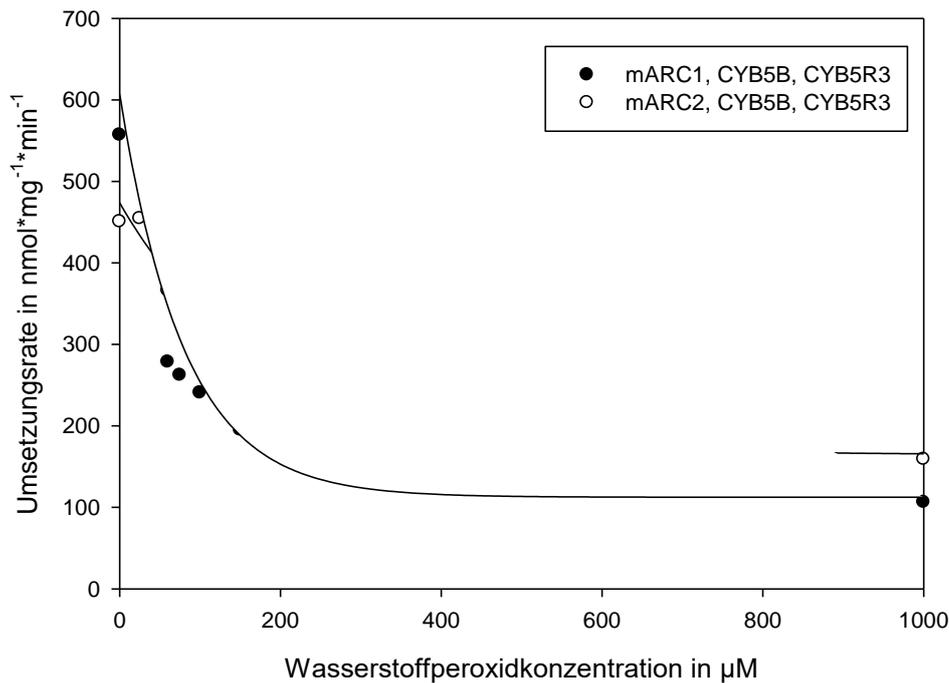
Um die wichtigen enzymatischen Parameter  $K_m$ ,  $V_{\max}$ ,  $K_{\text{cat}}$  und  $K_{\text{eff}}$  zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsabhängigkeit für mARC1 und mARC2 durchgeführt. Aus Gründen der Praktikabilität wurde nur der NADH-Assay für diesen Zweck verwendet, da die fluorimetrische Messung mit einem großen Probenvolumen schwierig zu handhaben und wesentlich weniger robust ist. Darüber hinaus zeigt die beispielhafte Konzentrationsmessung aus den

Ergebnissen in Abbildung 4.45 und Abbildung 4.46, dass die Ergebnisse aus dem NADH-Test die tatsächliche Reduktion von Wasserstoffperoxid gut widerspiegeln (NADH-Assay und fluorimetrischer Assay ergeben zusammen die eingesetzte Konzentration). Für die Messung wurde die Extinktion bei 340 nm für 2 min nach Zugabe von NADH überwacht. Jede Konzentration wurde als 3-fach Bestimmung vermessen. Die Umsatzrate wurde aus den resultierenden Daten durch Auswertung der Steigung der jeweiligen linearen Regression bestimmt. Da Wasserstoffperoxid in höheren Konzentrationen Proteine schädigen kann, wurde die lineare Regression für mARC1 in Konzentrationen von über 80  $\mu\text{M}$  über einen Zeitraum von nur einer Minute ausgewertet. mARC2 erwies sich dagegen als robuster gegenüber höheren Konzentrationen. Die erhaltenen Umsatzraten wurden um den für eine Kontrolle ohne Wasserstoffperoxid berechneten Wert korrigiert. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen geringe Unterschiede zwischen mARC1 und mARC2 (Abbildung 4.47). Beide zeigen eine sehr hohe Affinität für Wasserstoffperoxid. Die enzymatischen Kenngrößen sind in Tabelle 4.3 gezeigt.

**Tabelle 4.3: Enzymatische Kennziffern der Reduktion von Wasserstoffperoxid durch mARC.**

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$K_{kat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$Kat_{eff}$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
mARC1	33,6	361,2	30,1	$8,9 \cdot 10^5$
mARC2	52,1	257,7	21,8	$4,2 \cdot 10^5$

Aufgrund der bekannten Reaktivität von Wasserstoffperoxid gegenüber unterschiedlichen Proteinen wurde zuletzt bestimmt, inwieweit mARC durch die Inkubation mit Wasserstoffperoxid Schaden nimmt. Hierbei wurde analog zu der Methode aus 3.1.3 mit Wasserstoffperoxid vorinkubiert, anschließend simultan BAO und NADH hinzugegeben und dann konzentrationsabhängig die Umsetzungsgeschwindigkeit vermessen.



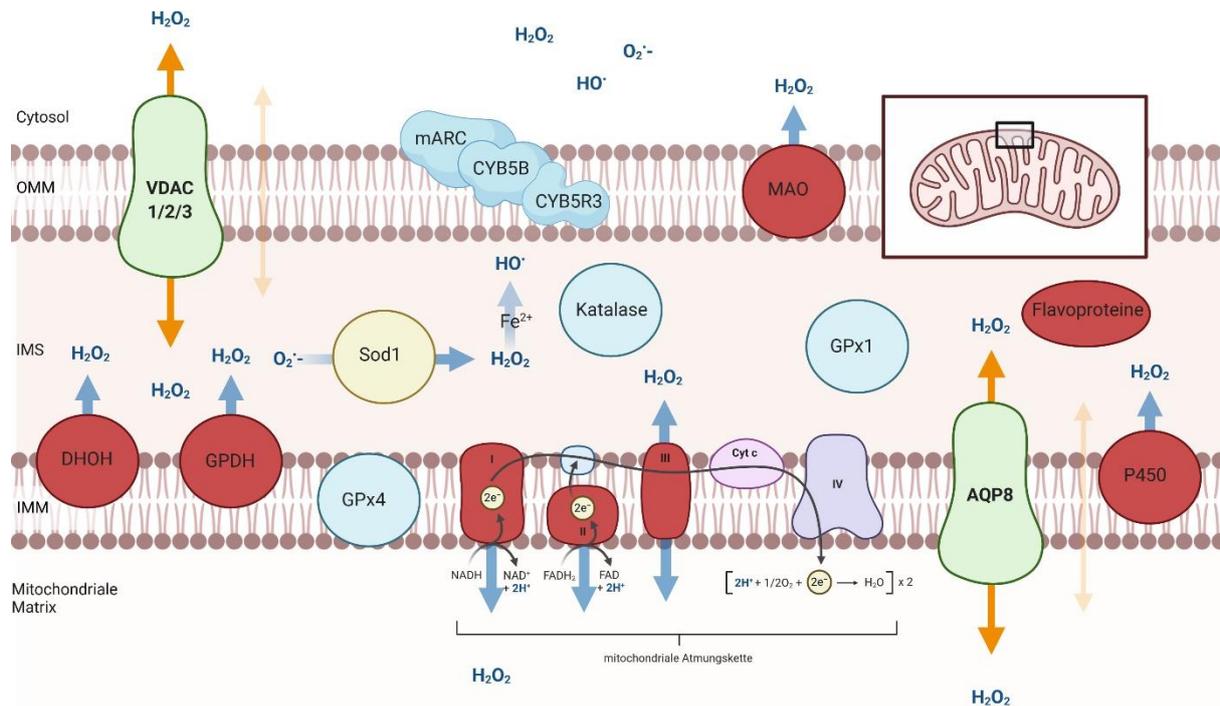
**Abbildung 4.49:** BAO Umsetzungsrate in  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  von mARC1 und mARC2 nach Koinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid.

Die Abbildung 4.49 zeigt, dass sowohl mARC1 als auch mARC2 bei höheren Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (ab  $100\ \mu\text{M}$ ) stark an Aktivität abnehmen. Auch werden die vorherigen Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Stabilität gegenüber geringeren Konzentrationen nochmals bestätigt. Es zeigt sich, dass mARC2 über einen größeren Konzentrationsbereich von Wasserstoffperoxid eine konstante Umsetzungsrate hat (bis die Konzentration ein kritisches Niveau erreicht). Da es hier deutliche Unterschiede zwischen mARC1 und mARC2 gibt, muss die beobachtete Hemmwirkung direkt an mARC stattfinden. Bei Schäden an CYB5B und/oder CYB5R3 wäre hier die Umsetzungsrate in beiden Versuchsansätzen gleichermaßen vermindert gewesen. Es ist weiterführend zu erkennen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Restaktivität beider Enzyme auch noch bei  $1000\ \mu\text{M}$  zu beobachten ist. Im Kontext des physiologischen Zusammenhangs sind die gewählten Konzentrationen als sehr hoch zu bewerten. Schon der erste Wert von  $25\ \mu\text{M}$  ist über den Bereich, welche in der Regel zellulär physiologisch vorkommt. Da sowohl mARC1 als auch mARC2 diese Konzentrationen ohne Einfluss auf die Umsetzungsrate tolerieren können, lässt sich für mARC eine hohe Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid ableiten, was auch in Bezug auf eine peroxisomale Lokalisation sinnvoll ist.

### 4.3.3 Rolle von mARC in der zellulären Wasserstoffperoxidregulation

Aus den in 4.3.2 gezeigten Daten kann eine Rolle von mARC in der Wasserstoffperoxidregulation vermutet werden. Im Gegensatz zu anderen Enzymen wie GPx1 (Gluthationperoxidase1) einem der wichtigsten Enzyme für den Wasserstoffperoxidabbau, welcher mit einem Ping-Pong-Mechanismus zu beschreiben ist [162], folgt die Wasserstoffperoxidreduktion durch mARC einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 4.48). Direkte Vergleiche auf der Grundlage kinetischer Daten sind daher schwierig. Es ist bekannt, dass Katalase eines der Enzyme mit den höchsten Umsatzraten ist [163]. Allerdings werden diese Werte ebenso wie die  $K_m$ -Werte nur bei Konzentrationen erreicht, die weit über den physiologisch relevanten Werten liegen. Ein Vergleich der katalytischen Effizienz von mARC mit anderen Peroxid-abbauenden Enzymen zeigt eine bis zu 100-fach geringere Aktivität von mARC. Für eine vollständige Bewertung müssen jedoch verschiedene Funktionen betrachtet werden. Diese Enzyme befinden sich in einer Umgebung mit hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen. Im Gegensatz dazu könnte mARC eine duale Funktion bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid und *N*-oxygenierten Verbindungen in der OMM innehaben. Eine tatsächliche physiologische Funktion kann im Vergleich zu den Raten der katalytischen Effizienz von Wasserstoffperoxidreaktionen mit üblichen intrazellulären Targets wie Cysteinresten, Thioredoxin oder GSH, die eine Ratenkonstante unter  $10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  haben [142], gesehen werden. Während andere Enzyme wie GPx durch eine Oxidation durch Wasserstoffperoxid inaktiviert werden [164], kann mARC höhere Wasserstoffperoxidkonzentrationen ohne sofortige Inaktivierung tolerieren (Abbildung 4.49).

Die komplexen Mechanismen der Wasserstoffperoxidregulation mit einer großen Anzahl verschiedener Enzyme in verschiedenen Zellorganellen zeigen die Notwendigkeit unterschiedlicher Ansätze zur Kontrolle der intrazellulären Konzentration von Wasserstoffperoxid. Für eine Beurteilung der individuellen Bedeutung der einzelnen regulatorischen Enzyme im Wasserstoffperoxidstoffwechsel ist deren genaue Lokalisation wichtig. So konnte beispielsweise schon sehr früh gezeigt werden, dass GPx4 eine wichtige Funktion in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) hat, um diese vor Lipidperoxidation zu schützen [165]. Aufgrund der Lokalisation an der OMM und der sehr hohen Affinität zu Wasserstoffperoxid scheint es möglich, dass mARC auch eine Schutzfunktion innehat. Ein niedriger  $K_m$ -Wert für kleine Moleküle, wie DMSO oder TMAO, ist für molybdänhaltige Enzyme dabei nicht ungewöhnlich [166, 167]. Während die wichtigsten Wasserstoffperoxid-umwandelnden Enzyme wie Katalase, Gpx oder Peroxiredoxine [168] im IMS, in der IMM und in der Matrix vorhanden sind, ist mARC durch seine Lokalisierung an der OMM einzigartig (Abbildung 4.50).



**Abbildung 4.50: Vereinfachte Darstellung des Wasserstoffperoxid-Stoffwechsels (Säugetierzellen) in Mitochondrien, erstellt mit BioRender.com modifiziert nach Riemer et al. (36).** Wasserstoffperoxid und reaktive Sauerstoffspezies produzierende Enzyme sind rot, Wasserstoffperoxid abbauende Enzyme sind blau, Transporter und Kanäle sind grün und Diffusions- und Transportwege orange markiert. Die Stoffwechselwege in der Matrix sind nicht dargestellt. AQP8, Aquaporin-8; DHOH, Dihydroorotat-Dehydrogenase; GPDH, Glycerin-3P-Dehydrogenase; IMM, innere mitochondriale Membran; IMS, Intermembranraum; MAO, Monoaminoxidase; OMM, äußere mitochondriale Membran; P450, Cytochrom P450, Sod1, Superoxid-Dismutase 1; VDAC, spannungsabhängiger Anionenkanal.

Da reaktive Sauerstoffspezies in hohen Konzentrationen im IMS und im Cytosol durch verschiedene Enzyme gebildet werden, ist ein Schutzmechanismus für eine unerwünschte Oxygenierung der OMM wahrscheinlich. Dies wäre analog zur Funktion von GPx im IMM. mARC ist ebenfalls einzigartig, da es die freie Diffusion von Wasserstoffperoxid zwischen Cytosol und IMS kontrollieren kann und somit aufgrund seiner hohen Affinität eine wichtige Rolle im Redox-Signalweg zwischen Cytosol und Mitochondrien spielen kann. Dies ermöglicht einen kontrollierten Austausch von Wasserstoffperoxid über spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC) und Peroxiporine [165]. Darüber hinaus ist auch bekannt, dass Enzyme in der OMM Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt produzieren, wie die Monoaminoxidase (MAO). Dies trägt ebenfalls zur Funktion der Wasserstoffperoxidregulation in der OMM bei. Kagan und Kollegen heben die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Apoptose hervor, indem sie den Freisetzungsweg proapoptotischer Faktoren aus der OMM identifizierten [169]. Eine cardiolipinspezifische Peroxidaseaktivität von Cytochrom c ist für die Permeabilisierung der OMM erforderlich, was erneut die Bedeutung der Wasserstoffperoxidregulation in der OMM für kritische Zellprozesse demonstriert.

Malik und seine Mitarbeiter zeigten einen Zusammenhang zwischen *CDK7* (*candidate diabetes-associated kidney gene 7*) und oxidativem Stress [170]. *CDK7* erwies sich später als identisch mit dem *mARC2*-Gen. Eine Hochregulation bei der diabetischen Nephropathie konnte sowohl in Tiermodellen als auch in Nierenzellen nachgewiesen werden. Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie, sodass in diesem Zusammenhang *mARC* eine Schutzfunktion besitzt. Die mögliche Lokalisation in Peroxisomen bleibt Gegenstand der Forschung. Die hier im Zusammenhang mit früheren Studien gezeigten Daten legen nahe, dass *mARC* auch in Peroxisomen eine regulatorische Funktion von Wasserstoffperoxid besitzt. Dies erfordert weitere Experimente, wie die Untersuchung der Wasserstoffperoxidregulation in *mARC*-Knockdown-, Knockout-Zelllinien oder Tiermodellen.

#### 4.3.4 Organische Peroxide

Um zu überprüfen, ob neben Wasserstoffperoxid auch die Reduktion von anderen Verbindungen mit *O-O*-Bindung durch *mARC* erfolgt, wurde *tert*-Butylhydroperoxid als Beispielsubstanz für organische Peroxide getestet. Dafür wurde die Methode 3.1.1 gewählt. Zudem wurde Cumolhydroperoxid mit der Methode 3.1.4 getestet.

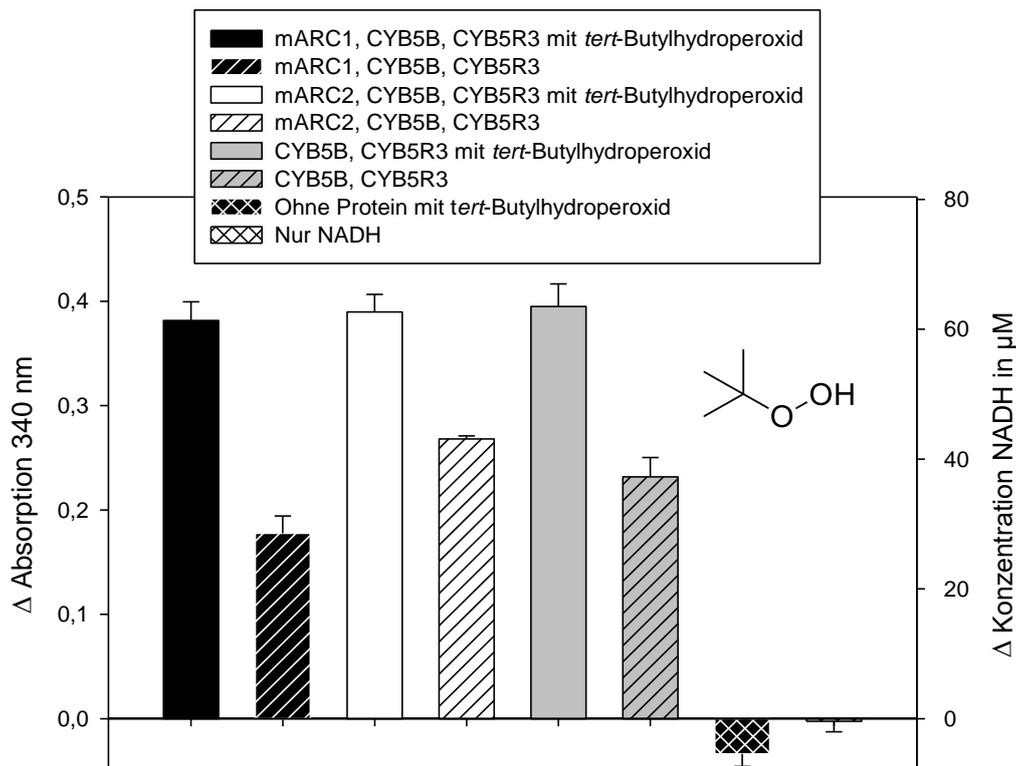


Abbildung 4.51: NADH-Assay Ergebnisse von einer *tert*-Butylhydroperoxid Inkubationsreihe nach 15 min.

Abbildung 4.51 demonstriert, dass *tert*-Butylhydroperoxid ein Substrat von CYB5B und CYB5R3 ist. Es ist deutlich ein Unterschied zu den Kontrollen ohne Substrat zu sehen. Jedoch ist kein Unterschied zu den Inkubationen mit mARC1 oder mARC2 ersichtlich. Somit zeigt sich kein zusätzlicher Effekt durch die Zugabe von mARC. Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Untersuchung via LC-MS verzichtet.

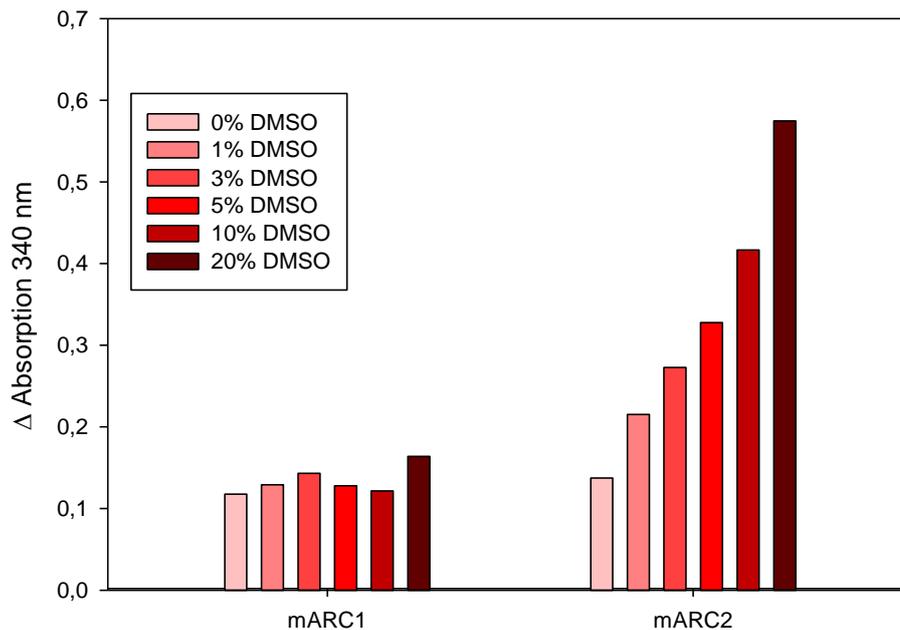
Bei der Untersuchung von Cumolhydroperoxid in dem 96-Well-Platten-Verfahren konnte ebenfalls kein Unterschied hinsichtlich eines Absorptionsunterschiedes zwischen den mARC-Proben und den Kontrollen mit CYB5B und CYB5R3 festgestellt werden. Hier war auch zu den Kontrollen ohne Substrat kein Unterschied feststellbar, sodass Cumolhydroperoxid, im Gegensatz zu *tert*-Butylhydroperoxid, kein Substrat von CYB5B und CYB5R3 zu sein scheint.

Perspektivisch ist die Prüfung von physiologisch vorkommenden organischen Peroxiden, insbesondere im Kontext des Fettstoffwechsels, eine sinnvolle Ergänzung, um die Rolle von mARC bei dem Metabolismus von organischen Peroxiden besser einzuordnen. Aus den hier gezeigten Ergebnissen kann nicht ausgeschlossen werden, dass mARC in der Lage ist, organische Peroxide zu reduzieren. Die entsprechende Detektion stellt aus Gründen der Stabilität und Löslichkeit von Fettsäurenperoxiden jedoch eine Herausforderung dar.

#### **4.4 Substrate/funktionelle Gruppen mit S-O- oder S-N-Bindung**

##### **4.4.1 Sulfoxide**

Während einiger Versuchsreihen mit dem NADH-Assay konnte bei unterschiedlichen Substraten festgestellt werden, dass die mARC2-Kontrolle ohne Substrat im Vergleich zu vorherigen Versuchen ungewöhnlich hohe Absorptionsänderungen aufzeigten (beispielsweise Abbildung 4.17 mit Epacadostat oder Abbildung 4.30 mit Upamostat). Es handelte sich jeweils um schwer lösliche Substrate, bei denen DMSO beigelegt werden musste, um diese Substrate in einer hinreichend hohen Konzentration untersuchen zu können. Dementsprechend wurde die Reduktion von DMSO separat untersucht. Dieses ist auch im Hinblick auf frühere Ergebnisse aus Publikationen und Dissertationen höchst relevant, da hier für Substrate, welche mit DMSO zusammen inkubiert wurden, eine falsch niedrige Umsetzungsrate vermutet werden muss, da DMSO als kompetitives Substrat die durch die HPLC ermittelbare Umsetzungsrate von den jeweiligen Substraten erniedrigt.



**Abbildung 4.52:** NADH-Assay Ergebnisse von mARC1 und mARC2 mit steigenden Konzentrationen an DMSO ohne weiteres Substrat nach 15 min Inkubation.

Die Abbildung 4.52 spiegelt die Ergebnisse aus vorherigen Untersuchungen wider. Bei mARC1 kann selbst bei sehr hohen Konzentrationen DMSO kein Unterschied zu der Inkubation ohne DMSO festgestellt werden. Bei mARC2 hingegen ist gut zu erkennen, dass bei steigender DMSO Konzentration auch die Absorptionsänderung stärker ausfällt. Da die mARC1- und mARC2-Inkubationen unter identischen Umständen durchgeführt wurden, handelt es sich hierbei nicht um eine chemische Umsetzung oder enzymatische Reduktion von CYB5B und CYB5R3 alleine, sondern um eine enzymatische Reduktion durch mARC2. Das Entstehen von reduzierten DMS konnte in der Arbeitsgruppe via GC-MS verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Auffällig hierbei ist, dass auch bei sehr hohen Konzentrationen noch ein Unterschied erkennbar ist. So ist eine höhere Umsatzrate bei 20 % DMSO als bei 10 % DMSO sichtbar, obwohl 10 % DMSO weit über der Sättigung im Vergleich mit anderen Substraten liegt. Typischerweise wird eine Enzymsättigung im Bereich von  $V_{max}$  im niedrigen mM Bereich erzielt (10 % DMSO ist bereits M Bereich). Dieses Phänomen konnte bereits bei TMAO in der Dissertation von *Schneider* beobachtet werden. Hierbei zeigte TMAO, analog zu DMSO, bei einer Konzentrationsabhängigkeit auch bei sehr hohen Konzentrationen einen linearen Anstieg der Umsatzrate. Es konnte keinerlei Sättigungseffekt festgestellt werden [129]. Sowohl DMSO als auch TMAO stellen hierbei Substrate dar, welche auch in sehr hohen Konzentrationen eine niedrige Umsatzrate besitzen. Aufgrund der vergleichswaren

geringen Größe der Moleküle und gleichzeitig gut zugänglichen Bindetasche von mARC ist es recht wahrscheinlich, dass diese Substanzen keine Wechselwirkung in der Bindetasche eingehen. Eine Beobachtung welche auch bei anderen bakteriellen molybdänhaltigen Enzymen mit DMSO als Substrat gemacht wurden [167]. Um zu untersuchen, ob mARC in der Lage ist generell Sulfoxide umzusetzen, wurden Methylphenylsulfoxid und Methioninsulfoxid mit dem NADH-Assay und durch LC-MS getestet. Jedoch konnte bei beiden Substanzen innerhalb der Nachweisgrenzen der Methoden keine Umsetzung festgestellt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass das sehr viel kleinere Molekül DMSO bereits niedrige Umsetzungsraten hat. Sollte ein analoges Verhalten zu kleinen *N*-O-haltigen Molekülen wie Hydroxylamin und sterisch anspruchsvolleren Verbindungen mit *N*-O-Bindung auch bei der *S*-O-Bindung vorliegen, sollte die Umsetzungsrate von größeren Sulfoxiden nochmals wesentlich geringer ausfallen als die von DMSO. Umsetzungsrate in einem Bereich von  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  sind daher möglich und würden mit den Methoden nicht detektiert werden.

#### 4.4.2 Isothiazole

Die Überprüfung von Isothiazolen, analog zu der Überprüfung von Isoxazolen (Kapitel 4.2.9.2) folgte aufgrund von *in vivo* Daten von etablierten Arzneistoffen. So wurde nachgewiesen, dass die Aldehydoxidase in der Lage ist die *S*-*N*-Bindung im Heterozyklus von dem atypischen Neuroleptikum Ziprasidon zu spalten [171]. Dabei spielt die Reduktion durch die Aldehydoxidase laut der Studie von *Beedham et al.* eine prädominante Rolle. Da die Aldehydoxidase ein mit mARC verwandtes Enzym darstellt und einige Substanzen sowohl durch die Aldehydoxidase als auch durch mARC umgesetzt werden können, sollten Isothiazole als mögliche mARC-Substrate analysiert werden. Dabei wurde neben den schon genannten Ziprasidon (Abbildung 4.53) zudem Methylisothiazolinon als ein häufig verwendetes Konservierungsmittel, welches mit Kontaktdermatitis in Verbindung gebracht wird [172], getestet. Als Methodik wurde die Kombination aus 3.1.1 und 3.2.1 gewählt. Ziprasidon wurde in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  und Methylisothiazolinon in einer Konzentration von 3 mM getestet.

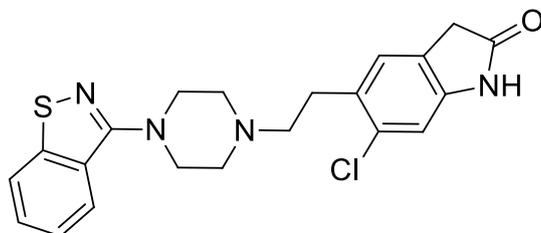
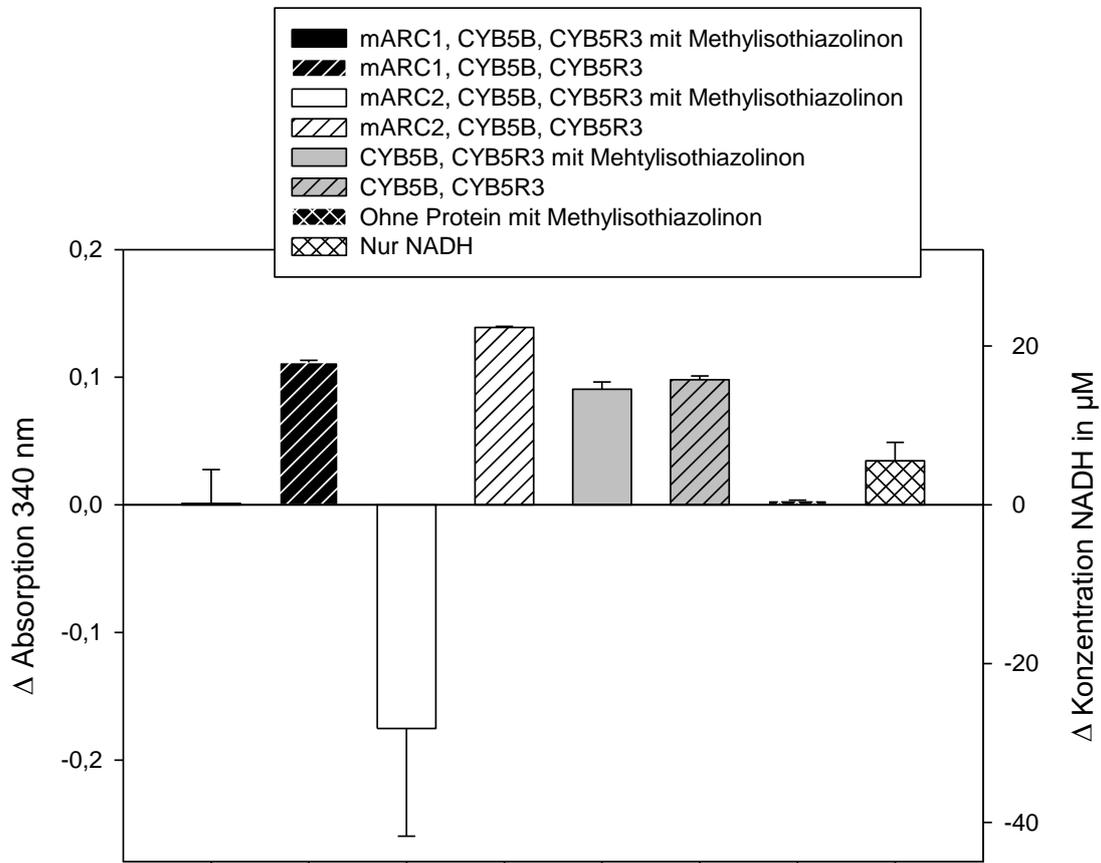


Abbildung 4.53: Strukturformel von Ziprasidon.

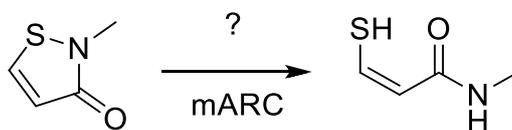
Weder bei dem NADH-Assay noch bei der LC-MS-Untersuchung konnten Hinweise auf eine mARC-abhängige Reduktion von Ziprasidon gefunden werden. Es gab keinerlei Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen. Methylisothiazolinon hingegen zeigte im NADH-Assay ein vergleichsweises einzigartiges Ergebnis.



**Abbildung 4.54: NADH-Assay Ergebnisse einer Methylisothiazolinon Inkubationsreihe nach 15 min.** Die eingesetzte Enzymmenge ist im Vergleich zum Protokoll aus 3.1.1 bei allen Ansätzen halbiert.

Hierbei ist zu beobachten, dass bei mARC1 innerhalb von 15 min praktisch keine Veränderung der Absorption bei 340 nm erkennbar ist, obwohl die Kontrolle ohne Methylisothiazolinon den typischen CYB5B und CYB5R3 abhängigen Grundverbrauch von NADH zeigt. Noch stärker ist dieser Effekt bei mARC2 zu beobachten. Hier kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Absorption über den Messzeitraum. Da bei der Kontrolle mit CYB5B und CYB5R3 und Methylisothiazolinon nicht zu einer Zunahme der Absorption kommt, ist dies eine mARC-abhängige Beobachtung. Dabei ist es am wahrscheinlichsten, dass es durch mARC zu der Bildung einer Substanz kommt, welche, im Gegensatz zu den nicht reduzierten Methylisothiazolinon, eine Eigenabsorption bei 340 nm besitzt und so trotz des Verbrauches von NADH in Summe die Absorption steigt. Eine Reduktion zu der vinylogen

Monothiocarbonsäure wäre daher eine Möglichkeit, welche das Chromophor erweitert. Dies würde besonders bei Abspaltung eines Protons durch das delokalisiertes  $\pi$ -Elektronensystem eine höhere Absorption besitzen.



**Abbildung 4.55:** Theoretische Reduktion von Methylisothiazolinon durch mARC zur vinylogenen Monothiocarbonsäure.

Eine Findung des postulierten Produkts gestaltet sich via LC-MS jedoch als schwierig. Der theoretische Massenunterschied bei der Spaltung der S-N-Bindung im Methylisothiazolinon beträgt nur 2 Dalton. Somit erscheint das reduzierte Produkt bei 118 m/z und liegt damit noch im Bereich der Isotopenpeaks von dem nicht reduzierten Methylisothiazolinon mit 116 m/z. Bedingt durch die eher niedrige Umsetzungsrate bei hohen Startkonzentrationen von Methylisothiazolinon, kann die Findung von reduziertem Methylisothiazolinon nicht zweifelsohne nachgewiesen werden. Bei der Standardmethode eluieren beide Substanzen aufgrund ihrer Polarität relativ zeitgleich. Eine Anpassung der Methode könnte daher schlussendlich den Beweis für diese Theorie liefern. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiterverfolgt.

## 4.5 Substrate/funktionelle Gruppen mit N-N-Bindung

### 4.5.1 Azide und Hydrazine

Auch die N-N-Bindung wurde als mögliches Target für eine mARC-abhängige Reduktion identifiziert. Um zu überprüfen, ob mARC in der Lage ist auch N-N-Bindungen zu reduzieren wurden exemplarisch vier Substanzen getestet. Als Vertreter der einfachen N-N-Bindung wurden hierzu der Arzneistoff Hydralazin nach Methode 3.1.1 und 3.2.1 sowie der einfachste Vertreter dieser Gruppe das Hydrazin nach Methode 3.1.1 und Methode 3.4.2 überprüft. Analog dazu wurde die Gruppe der Azide mit dem Arzneistoff Zidovudin, welcher *in vivo* reduziert wird [173], nach Methode 3.1.1 und 3.2.1 sowie der einfachste Vertreter dieser Gruppe das Natriumazid nach Methode 3.1.1 getestet (Formeln in Abbildung 4.55).

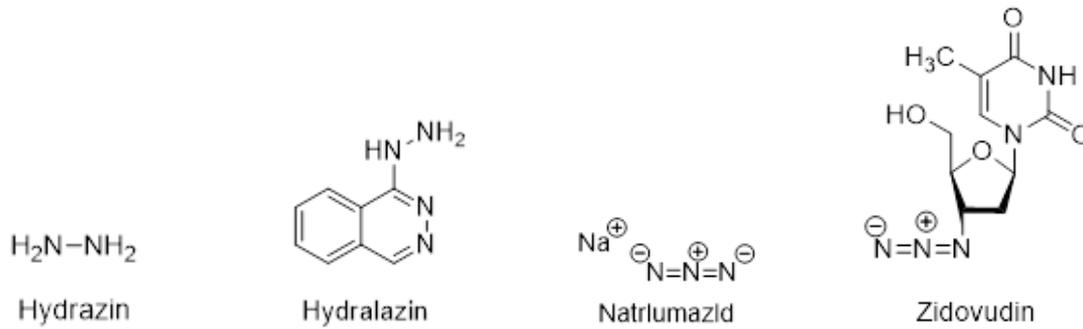


Abbildung 4.56: Strukturformeln der untersuchten Hydrazine und Azide.

Von den genannten Substanzen zeigte lediglich Hydralazin im NADH-Assay ein positives Ergebnis. Alle anderen Substanzen zeigten keinerlei Unterschied zu den durchgeführten Kontrollen. Auch konnte kein Ammoniak mithilfe des Ammoniak-Assays im Fall von Hydrazin gefunden werden. Im Fall von Zidovudin konnten keinerlei reduzierte Produkte via LC-MS identifiziert werden. Daher wird hier im Folgenden intensiver auf Hydralazin eingegangen.

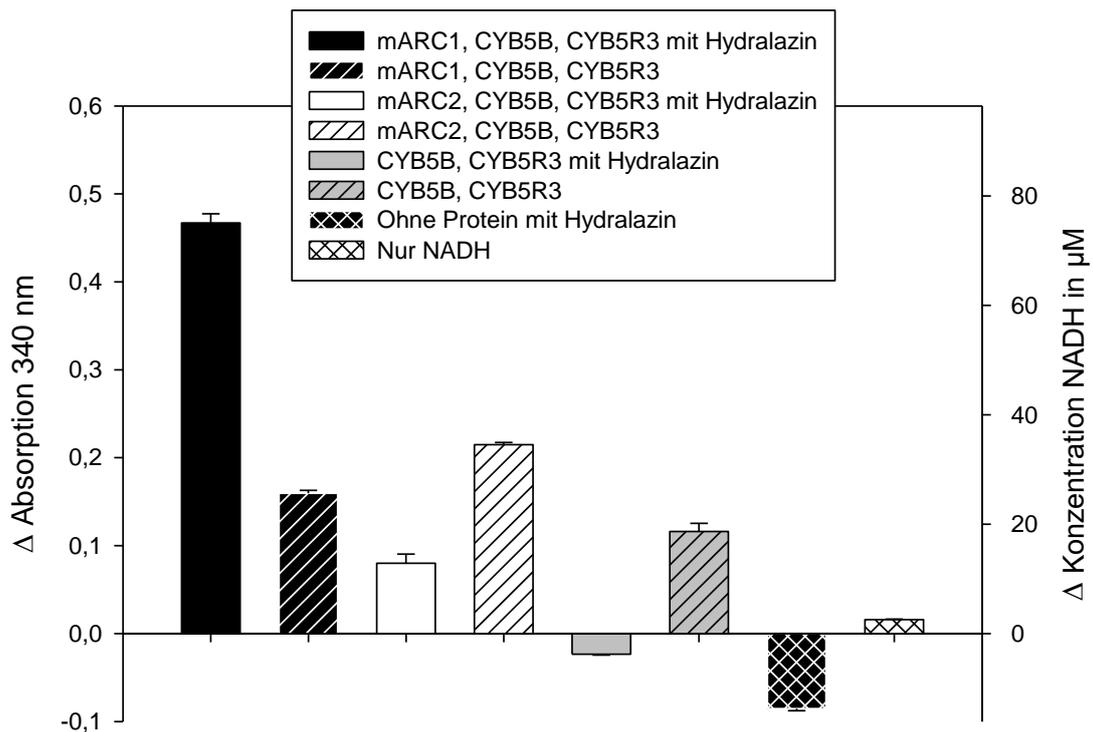


Abbildung 4.57: NADH-Assay Inkubationsreihe mit Hydralazin nach 15 min.

Die Überprüfung von Hydralazin mittels NADH-Assay lieferte einige interessante Ergebnisse. So ist bei den Kontrollen ohne Protein und bei den Inkubationen von Hydralazin mit CYB5B und CYB5R3 zu sehen, dass die Absorption bei 340 nm zunimmt. Dies stellt eine plausible Erklärung für die Differenz aus der Inkubation von Hydralazin mit mARC2 und der zugehörigen Kontrolle ohne Substrat dar, welche normalerweise ohne enzymatische Reaktion auf demselben Niveau sein müssten. Hierbei gibt es Indizien dafür, dass chemisch oder enzymatisch das Hydralazin sich verändert und es so zu einer Zunahme der Absorption kommt. Ganz anders verhält sich das Ergebnis von mARC1. Hier ist eine deutliche Abnahme der Absorption im Gegensatz zu der Kontrolle ohne Substrat erkennbar. Dies spricht für eine Reduktion, welche nur von mARC1 katalysiert wird. Eine genaue Betrachtung des Reaktionsverlaufs der einzelnen Inkubationen deutet ebenfalls sehr stark daraufhin, dass zunächst eine mARC-unabhängige chemische Veränderung von Hydralazin stattfindet.

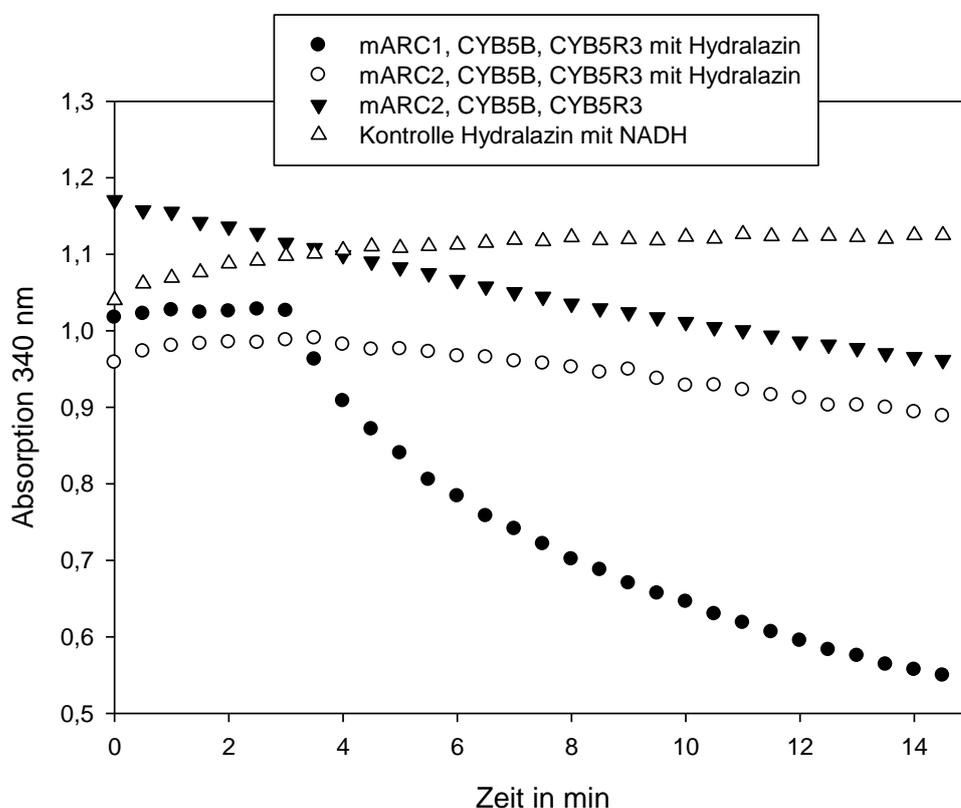


Abbildung 4.58: Ausgewählte Inkubationen von Hydralazin über einen Zeitraum von 15 min.

Hierbei ist gerade für mARC1 ein sehr spezielles Muster in der Änderung der Absorption sichtbar. So kommt es in den ersten 3 Minuten zu einer leichten Erhöhung der Gesamtaborption und dann folgend zu einer rapiden Abnahme von selbiger. Auch die anderen Inkubationsansätze zeigen die Steigerung der Absorption zum Anfang des Versuchs (Vergleich mARC2-Inkubation mit und ohne Hydralazin). Es kommt jedoch nicht zu einem

derart starken Abfall. Es muss dabei bedacht werden, dass es aufgrund des Grundverbrauchs von NADH durch CYB5B und CYB5R3 immer mit einer gewissen Abnahme der Absorption zu rechnen ist. Hier ist somit die Summe aus der Abnahme vom NADH und der Zunahme durch die Veränderung des Hydralazins zu sehen. Da diese gerade anfangs sehr stark ausgeprägt ist, ist dies ein Indiz für eine sauerstoffabhängige Oxidation von Hydralazin. Dies würde erklären, warum es irgendwann zu einem Stillstand kommt, da in diesem Fall der gelöste Sauerstoff aufgebracht ist und somit die mARC1-abhängige Reduktion stärker ins Gewicht fällt als während der ersten 3 Minuten, in denen beide Reaktionen parallel abgelaufen sind. Diese Theorie wäre auch eine Erklärung für den nicht linearen Reaktionsverlauf bei mARC1. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei mARC1 (bei allen getesteten mARC1-Inkubationen mit Hydralazin vorhanden) ist zwischen Minute 3 und Minute 5 deutlich größer als zwischen Minute 10 und Minute 12, da anfangs noch relativ gesehen mehr oxidiertes Hydralazin vorliegt, welches im Folgenden nur langsam durch sich neu lösender Sauerstoff nachbildet. Dieser Effekt ist jedoch nur schwer nachzuvollziehen, da bei der gewählten Wellenlänge von 340 nm die mögliche Oxidation von Hydralazin und die folgende Reduktion durch mARC sich überlagern.

Die Fragestellung, welche sich aus dem Gesamtbild ergab, war nun, ob mARC1 in der Lage ist die *N-N*-Bindung vom Hydralazin zu reduzieren oder ob die chemische Veränderung am Molekül, welche die Kontrollen andeuten, das eigentliche mARC1-Substrat darstellt. Hierzu wurde zunächst der Einfluss von Sauerstoff überprüft. Dabei wurde der gleiche Versuchsaufbau gewählt wobei nach jeweils 3 Minuten kurz über einen Zugang Sauerstoff in die Lösung eingeleitet wurde.

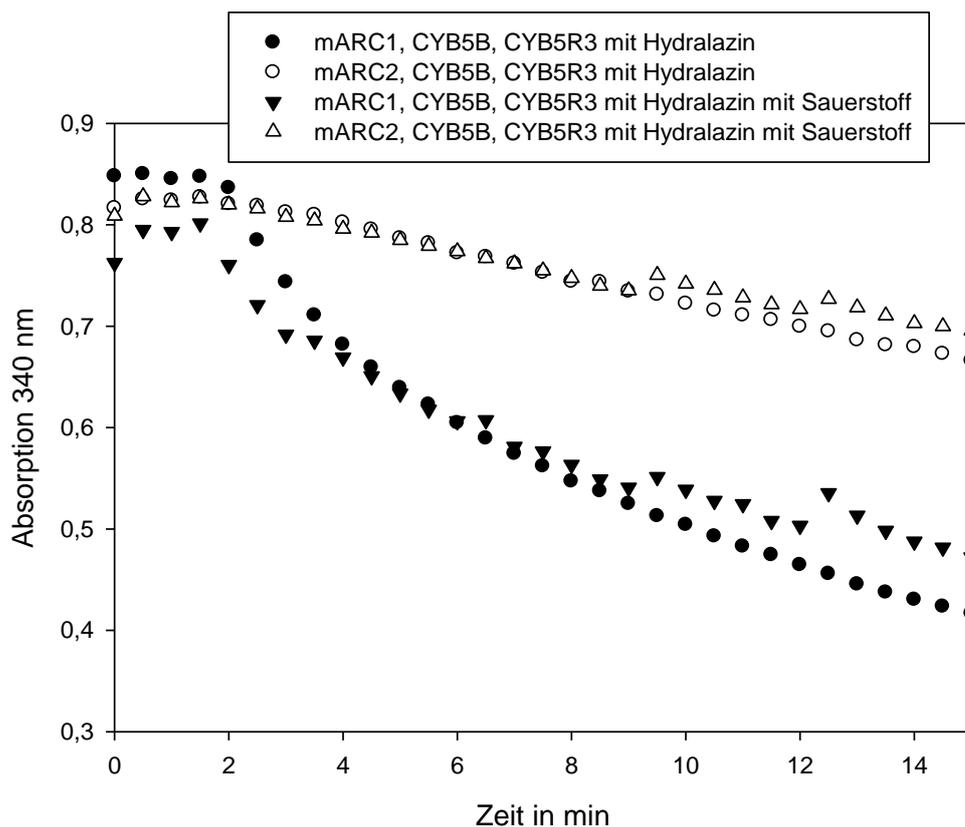


Abbildung 4.59: Inkubation von mARC1 und mARC2 mit Hydralazin über 15 min jeweils mit und ohne Zugabe von Sauerstoff in einem Zeitintervall von 3 min.

Der grundsätzliche Reaktionsverlauf ist hierbei identisch zu den zuvor gezeigten Daten. Die Zugabe von Sauerstoff ist bei mARC1 und bei mARC2 explizit bei Minute 9 und Minute 12 gut zu erkennen anhand einer signifikanten Erhöhung der Absorption. Es ist hierbei nicht gänzlich auszuschließen, dass eine Erhöhung der Absorption durch Streulicht an Luftblasen zustande kommt. Die gleichmäßige Erhöhung über die Zeit, welche auch kurz vor der nächsten Sauerstoffzugabe (z.B. Minute 11) erkennbar ist, deutet jedoch eher auf eine chemische Veränderung des Hydralazins hin. Insgesamt beziffert sich die Differenz der Absorptionen zwischen Minute 0 und Minute 15 von der Inkubation bei mARC1 auf 0,43 ohne Sauerstoff und 0,29 mit Sauerstoff und bei mARC2 auf 0,15 ohne Sauerstoff und 0,11 mit Sauerstoff. Es ist also sowohl bei mARC1 als auch bei mARC2 deutlich zu erkennen, dass der Absorptionsunterschied durch die Zugabe von Sauerstoff deutlich geringer ausfällt. Dies spricht für eine Oxidation von Hydralazin.

Darüber hinaus wurde eine weitere Analytik aller Versuchsansätze via LC-MS durchgeführt. Eine Spaltung der *N-N*-Bindung wäre durch die LC-MS eindeutig nachvollziehbar, da als Produkt Ammoniak und 1-Aminophthalazin auftreten würden bzw. bei einer Spaltung der *N-N*-Bindung im Phthalazin entsprechend die korrespondierenden Imine entstehen würden,

welche wiederum, genau wie etwaige Reaktionsprodukte von selbigen, einem dem Edukt unterscheidbares Produkt liefern.

Die LC-MS-Analytik der unterschiedlichen Inkubationen zeigte keinen erkennbaren Unterschied. Es konnte kein freies Phthalazin in den Inkubationsansätzen auch mit direkten Vergleich von Phthalazin als Referenzstandard gefunden werden. In der Dissertation von *Nehlsen* [174] konnte gezeigt werden, dass pH-abhängig kleinere Mengen Hydrazin von Hydralazin freigesetzt werden, jedoch sind diese im pM Bereich und daher wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze. Auch andere Erklärungen wie eine Umsetzung vom Hydralazin mit einer einhergehenden NO Freisetzung sollten sich bei den Umsetzungsraten, welche bei mARC1 im NADH-Assay sich ergeben, zu einem Produkt führen, welches mithilfe der LC-MS identifizierbar ist. Aufgrund der Tatsache, dass ein Produkt in der LC-MS nicht eindeutig identifizierbar ist, bleiben zwei Theorien. Zum einen könnte das Produkt instabil sein und vor der Vermessung via LC-MS zerfallen. Zum anderen könnte auch kein Unterschied festgestellt werden, wenn das Produkt der Reaktion dem Edukt entspricht. Eine Möglichkeit wäre daher, dass während der Inkubation am Phthalazin ein *N*-Oxid entstehen würde, welches wiederum von mARC1 zur Ausgangssubstanz reduziert werden würde. Dafür gibt es einige Indizien. Eine enzymatische *N*-Oxygenierung von Phthalazin wurde bereits in anderen Zusammenhängen gefunden [175]. Es ist plausibel, dass die Bildung eines *N*-Oxids mit einer Veränderung des Chromophors einhergeht und somit die Erhöhung der Absorption bei 340 nm erklärbar macht. Die Reduktion des *N*-Oxids würde die Ausgangssubstanz, das Hydralazin als Produkt haben und wäre somit nicht durch die LC-MS nachweisbar. Das Absorptionsverhalten während des Versuchs lässt sich durch Zustrom von Sauerstoff verändern. Zuletzt würde dies erklären, warum lediglich mARC1 eine Reaktion katalysiert nicht jedoch mARC2. Hierzu müssten weitere Untersuchungen gemacht werden, die eindeutig ein *N*-Oxid als Zwischenprodukt nachweisen. Der in Abbildung 4.54 dargestellte Absorptionsunterschied ist hierbei zu deutlich und zudem reproduzierbar, daher muss es in irgendeiner Form eine durch mARC1 katalysierte Reaktion mit Hydralazin geben. Im Kontext zu den Testungen von Hydrazin, Natriumazid und Zidovudin erscheint es so, als wäre mARC nicht in der Lage *N-N*-Bindungen zu reduzieren.

## 4.6 Sonstige Substrate

### 4.6.1 Anorganische Substanzen

Da anhand von Natriumnitrit, Hydroxylamin und Wasserstoffperoxid bereits einige anorganische Substanzen als mARC-Substrate bestätigt wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit noch eine Reihe weitere anorganischen Substanzen getestet. Da keiner dieser Substanzen im NADH-Assay ein positives Ergebnis hatte (Methode 3.1.1), sollen diese hier nur der Vollständigkeit halber benannt werden. Getestet wurden: Natriumperchlorat,

Natriumarsenat sowie Natriumsulfat. Für keine dieser Substanzen wurde das Ergebnis aus dem NADH-Assay durch eine weitere Methode bestätigt. Bei allen aufgezählten Substanzen gilt, dass diese mARC-Substrate sein könnten, die eine Umsetzungsrate haben, welche unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Methoden liegt.

#### **4.6.2 Organische Substanzen**

Eine Reihe von Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet, die ein negatives Testresultat im Hinblick auf eine mARC-abhängige Reduktion aufwiesen. Auch diese sollen der Vollständigkeit halber hier einmal kurz benannt werden. Zu den Substanzen, die zwar reduziert werden konnten, dies jedoch auch unabhängig von mARC, also lediglich durch CYB5B und CYB5R3 wurden, zählten: *N*-Hydroxyphenacetin und Olaquinox. Substanzen, die sowohl mit der Methode aus 3.1.1 als auch mit Methode 3.2.1 nicht als Substrat identifiziert werden konnten waren: Ranitidin, Nitrobenzol, Glyceroltrinitrat, Allicin und Ciclopirox. Bei allen aufgezählten Substanzen gilt, dass diese mARC-Substrate sein könnten, die eine Umsetzungsrate haben, welche unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Methoden liegt. Bei Ranitidin, Nitrobenzol und Glyceroltrinitrat sollte mit der neuen Methodik überprüft werden, ob die *N*-O-Bindung von Nitrogruppen bzw. Salpetersäureestern durch mARC reduziert werden kann. In der Arbeit von *Bauch* konnte bereits gezeigt werden, dass aromatische Nitroverbindungen unter aeroben Bedingungen nicht von mARC reduziert werden können [176]. Anhand der hier überprüften Substanzen kann dies bestätigt werden. Substanzen dessen mARC-abhängige Reduktion bereits zuvor beschrieben und publiziert wurden, dienen im Rahmen dieser Arbeit zur Validierung des NADH-Assays hier besonders zu nennen sind Guanoxabenz und BAO.

### **4.7 Inhibitoren von mARC**

#### **4.7.1 Theoretische Grundlagen**

Die Inhibition von mARC ist aus vielerlei Hinsicht interessant. Ein Inhibitor würde es ermöglichen, die physiologische Funktion von mARC besser zu ergründen. Es bietet die Möglichkeit sowohl im Zellexperiment als auch in einem Tiermodell bestimmte physiologische Funktionen als sogenanntes „Tool“ mit und ohne mARC besser zu studieren. Eine Option, die ansonsten nur durch vergleichbare Knockout-Modelle, welche wesentlich zeitaufwendiger sind, besteht. Neben der Grundlagenforschung der Physiologie kann ein mARC-Inhibitor auch vielfältigen Einsatz in der Arzneitherapie finden. Zum einen besteht großer Bedarf einen mARC-Inhibitor als pharmakokinetische Booster-Substanz für andere Arzneistoffe zu verwenden. Ein pharmakokinetischer Booster, hat die Funktion die Bioverfügbarkeit oder die Plasmakonzentration eines anderen Arzneistoffes zu verbessern, indem dieser auf die Pharmakokinetik in der Absorption, Distribution, Metabolismus und/oder Elimination positiv einwirkt [177]. Zahlreiche etablierte Arzneistoffkombinationen folgen diesem Prinzip. So sind

die Dopamin-Decarboxylase-Hemmer Benserazid bzw. Carbidopa ein fester Bestandteil der Parkinsontherapie mit Levodopa. Diese erreichen, dass eine Aktivierung des Prodrugs Levodopa in der Peripherie unterbunden wird. Dies sorgt zum einen für eine geringere Nebenwirkungsrate (gastrointestinale Nebenwirkungen reduziert um den Faktor 5 mit Benserazid, kardiovaskuläre Nebenwirkungen reduziert um den Faktor 4), zum anderen kann eine niedrigere Dosis gegeben werden, da mehr Levodopa im ZNS zum aktiven Dopamin umgewandelt wird [178]. Benserazid selbst kann aufgrund seiner hohen Hydrophilie nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden und inhibiert somit nicht die Aktivierung im ZNS. Weitere bedeutende Beispiele für Booster-Substanzen sind: Ritonavir in der Kombination mit Lopinavir, Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam in der Kombination mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Probenecid in der Kombination mit Cidovovir, sowie Chinidin in der Kombination mit Dextrometorphan [177]. Diese Bandbreite an unterschiedlichen Indikationen zeigt die Bedeutung von Booster-Substanzen in der Arzneistofftherapie. In diesem Zusammenhang ist die Aktivität von mARC insbesondere gegenüber Arzneistoffen mit *N*-O-Bindungen relevant.

Zahlreiche Arzneistoffe scheitern in der Entwicklung an Hürden wie einer ausreichender Bioverfügbarkeit trotz einer vielversprechenden Wirksamkeit. Einige funktionelle Gruppen von Arzneistoffen und Arzneistoffkandidaten, welche bereits zuvor hier besprochen wurden, werden durch eine Reduktion durch mARC inaktiviert. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Hydroxamsäuren und die Hydroxyharnstoffderivate. Hierbei stellen die *N*-hydroxylierten Verbindungen zumeist die Wirkform dar. Der Wirkmechanismus des Hydroxyharnstoffderivats Zileuton bedingt beispielsweise die Komplexbildung eines Eisenions im aktiven Zentrum der 5-Lipoxygenase [83]. Dabei bildet sich ein Chelatkomplex über die freien Elektronenpaare der Hydroxyharnstoffstruktur. Eine Reduktion durch mARC stellt daher eine Inaktivierung dar. Zileuton besitzt nur eine sehr geringe Umsatzrate durch mARC, wie im vorherigen dargestellt und kann deswegen als Arzneistoff verwendet werden. Dies wäre bei hohen Umsatzraten nicht der Fall. Auch *Ginsel et al.* [40] zeigte anhand von Hydroxamsäuren den Einfluss der mARC-abhängigen Reduktion auf die Bioverfügbarkeit deutlich. Bei diesen Fällen könnte daher ein mARC-Inhibitor ähnlich der vorgenannten Fixkombinationen zusammen mit einem Arzneistoff, welcher normalerweise über mARC inaktiviert wird, über den Zeitraum der Anwendung zusammengegeben werden. Eine kurzzeitige Inaktivierung, wie bei der Kombination mit einem Antibiotikum ist wahrscheinlich gegenüber einer langzeitigen Inaktivierung, wie beispielsweise in der Kombination mit einem Antihypertonikum unproblematischer. Dies liegt an einer der physiologischen Funktionen von mARC, welche unter anderem die Reduktion von mutagenen *N*-oxygenierten Verbindungen ist. Hierbei ist es vorstellbar, dass eine Langzeitinhibition von mARC mit einem potenziell höheren Krebsrisiko

einhergeht. Jedoch müsste dies erst weiter untersucht werden. Zudem besteht die Möglichkeit nur eines der beiden paralogen mARC-Enzyme zu inhibieren, während das andere weiterhin diese Substanzen unschädlich macht. Die weitere Funktion eines mARC-Inhibitors als Arzneistoff bedingt sich aus den physiologischen Unterschiede zwischen Knockout-Mäusen zu Wildtyp-Mäusen [50] sowie Daten zu humanen mARC1-Varianten, welche mit einem günstigen Outcome für Lebererkrankungen verbunden sind [51]. Hier könnte der Einsatz eines mARC-Inhibitors zur Behandlung von unterschiedlichen Erkrankungen der Leber sowie des Fettstoffwechsels, um Krankheiten wie Adipositas, Leberzirrhose oder Diabetes Mellitus Typ-2 zu behandeln, denkbar sein. Hierzu ist es zunächst wichtig das exakte Target im humanen Metabolismus zu identifizieren, um die Möglichkeit eines Arzneistoffes zu eruieren, welches wiederum einfacher durch einen mARC-Inhibitor möglich ist.

#### 4.7.2 *N*-Hydroxycarbamate als Inhibitoren von mARC1

Urethan und *N*-Hydroxyurethan sind bekannte Lebensmittelkarzinogene, welche in Brot, Wein und fermentierten Obstbränden natürlicherweise vorkommen [179, 180]. Dabei wird Urethan im Menschen zum *N*-Hydroxyurethan oxidiert, welches wiederum strukturelle Chromosomenaberrationen im Organismus verursacht und somit mutagen ist [181, 182]. Analog zu der Untersuchung von NNK wurde diese Substanzklasse unter der Prämisse untersucht, dass lediglich die *N*-hydroxylierten Verbindungen karzinogen sind, welche nicht durch mARC detoxifiziert werden können. Es wurden die drei *N*-Hydroxycarbamate *N*-Hydroxyurethan, Ethyl-*N*-(3-Chlorphenyl)-*N*-Hydroxycarbamat und *N*-BOC-Hydroxylamin sowie das Hydroxycarbamat Urethan (Abbildung) nach der Methode aus 3.1.1 und dann folgend nach dem Protokoll aus 3.1.3 getestet.

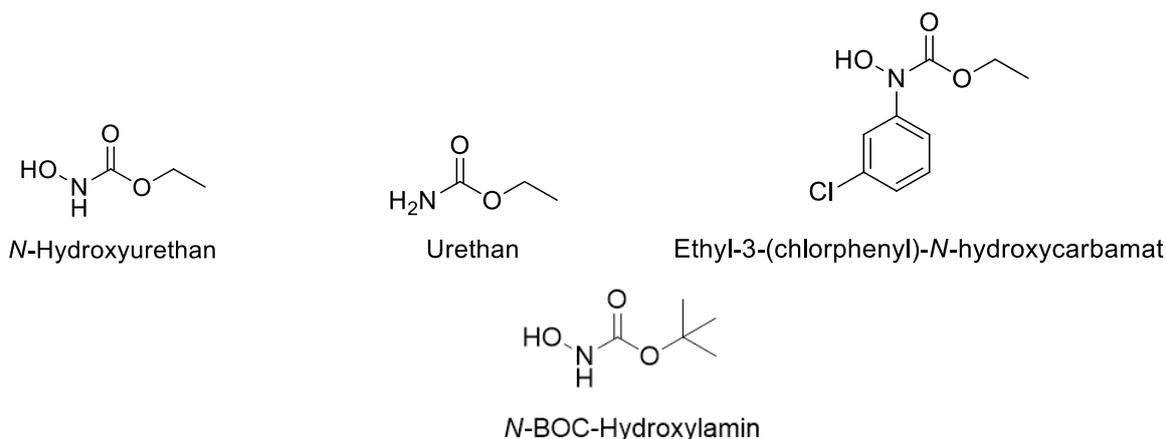
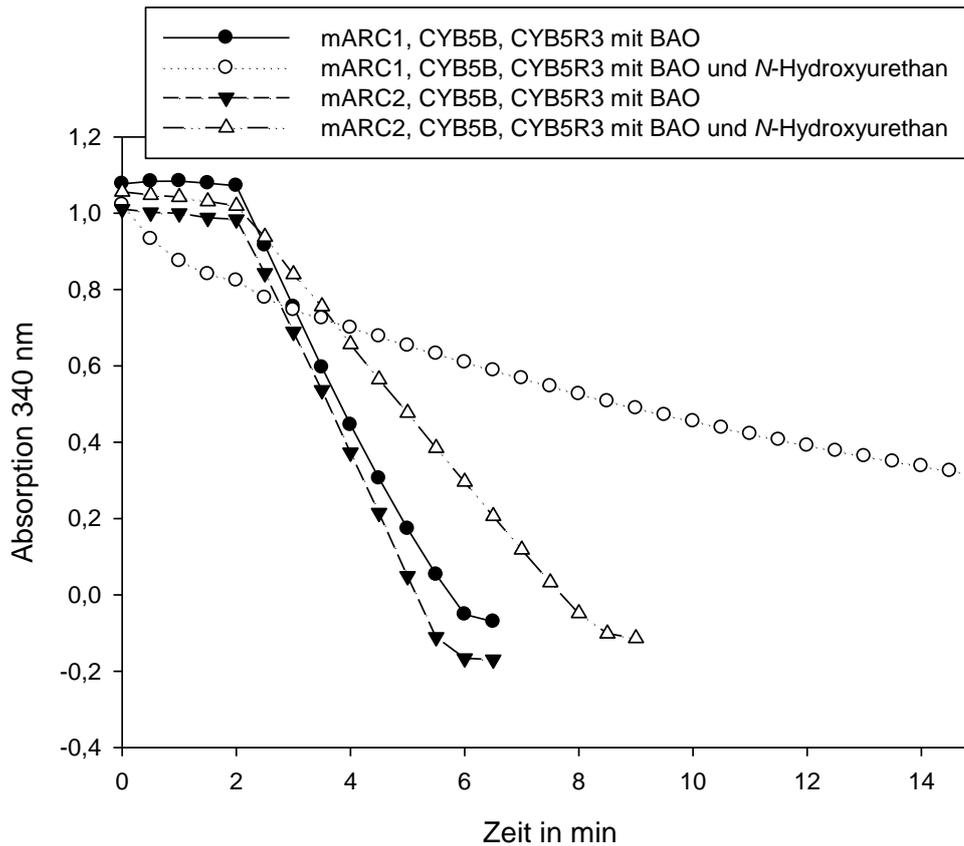


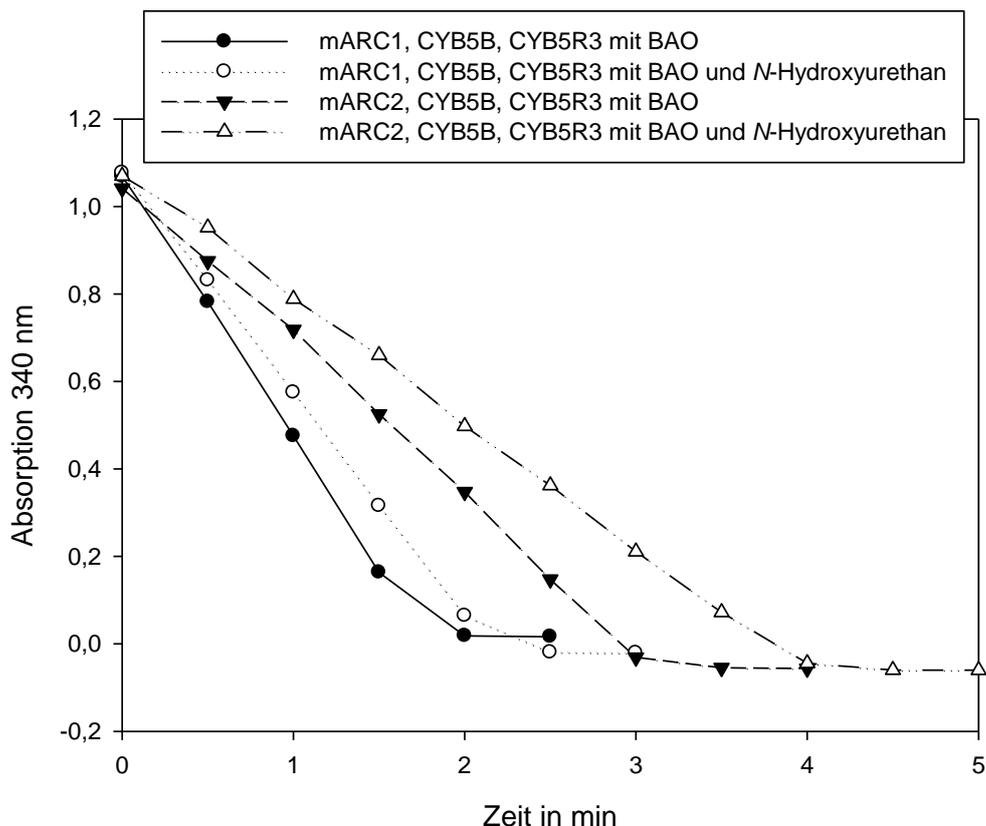
Abbildung 4.60: Strukturformeln der untersuchten Carbamate.



**Abbildung 4.61: Inhibitionsversuch mit und ohne 1 mM *N*-Hydroxyurethan von mARC1 und mARC2.** Die Zugabe von BAO (3 mM) erfolgte 2 min nach dem Starten des Versuchs mit NADH. Die Kontrolle zeigen die ungehinderte Umsetzung von BAO durch mARC.

Abbildung 4.61 zeigt deutliche Unterschiede zwischen den mARC1- und den mARC2-Inkubationen. Die Kontrolluntersuchungen zeigen eine etwa gleiche Umsetzungsrate nach der Zugabe von BAO. Bei dem Versuchsansatz, bei dem mARC2 zunächst mit *N*-Hydroxyurethan vorinkubiert wurde, sieht man nach der Zugabe von BAO auch dessen Umsetzung deutlich, jedoch dauert es etwa 2 Minuten länger bis das enthaltene NADH im Vergleich zu der Kontrolluntersuchung verbraucht ist. Dabei ist zu erkennen, dass *N*-Hydroxyurethan selbst kein mARC2-Substrat ist, da innerhalb der ersten 2 min vor Zugabe von BAO kein Verbrauch von NADH festzustellen ist und die Absorption parallel zu den Kontrolluntersuchungen verläuft. Aufgrund der kleinen Struktur und der relativ offenen Bindetasche von mARC ist es denkbar, dass der Unterschied zu den Kontrolluntersuchungen von mARC2 dadurch zustande kommt, dass *N*-Hydroxyurethan analog zu einem kompetitiven Inhibitor im aktiven Zentrum bindet, jedoch nicht umgesetzt wird und somit das BAO langsamer reduziert wird als ohne Zugabe von *N*-Hydroxyurethan. Hierbei ist jedoch ein deutlicher Unterschied zu dem Ansatz von *N*-Hydroxyurethan und mARC1 ersichtlich. Die mARC2-Inkubation mit Inhibitor ist innerhalb des Versuchszeitraum nach etwa 9 Minuten

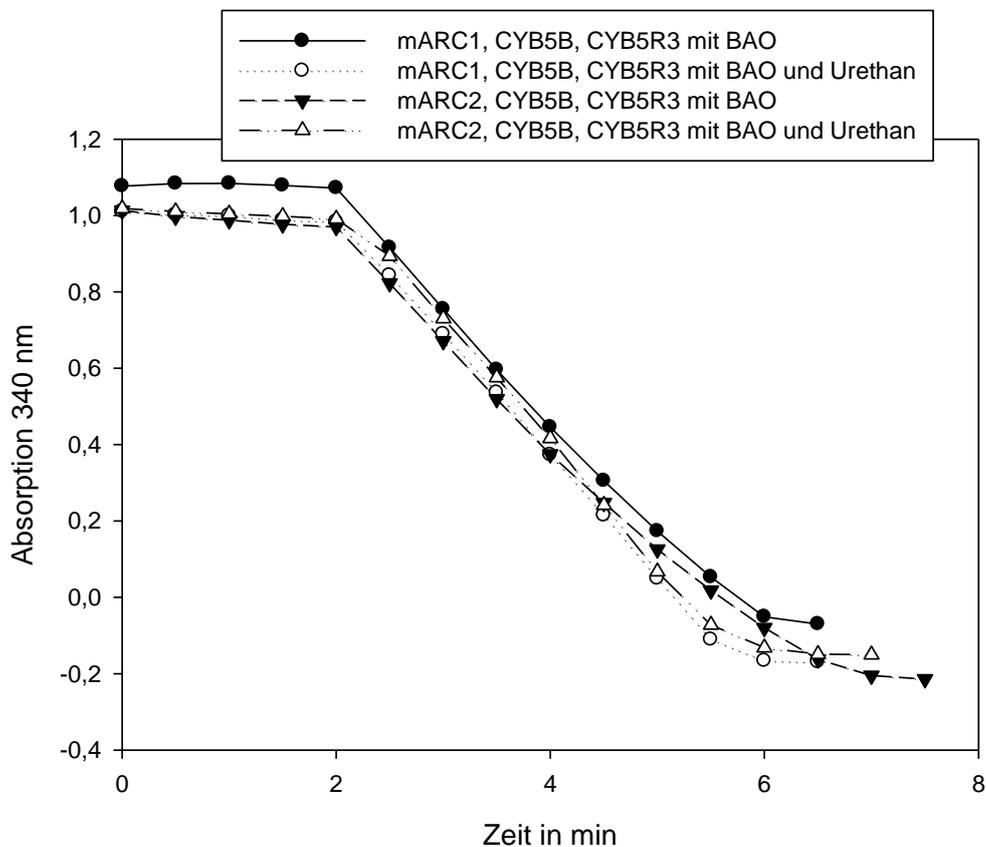
beendet worden, da es keine Unterschiede in der Absorption bei 340 nm mehr gab. Die mARC1-Inkubation mit Inhibitor hingegen zeigt durchgängig nur einen schwachen Abfall. Die maximale Absorptionsdifferenz im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen, ist nach Ablauf der 15 Minuten Reaktionszeit nur etwa zur Hälfte erreicht. Zudem ist im Gegensatz zu der mARC2-Inkubation deutlich ein Abfall der Absorption innerhalb der ersten 2 Minuten vor Zugabe von BAO zu sehen. Dies zeigt eine Umsetzung, welche mARC1 spezifisch ist. Anhand der mARC2-Inkubation wird deutlich, dass diese nicht von CY5B5 und CYB5R3 stammen kann. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt dabei deutlich ab. Innerhalb der ersten Minute ist ein Abfall der Absorption von 0,1474 detektierbar während zwischen Minute 1 und 2 lediglich der Abfall 0,0512 beträgt. Diese Beobachtung spricht klar für eine Giftung des mARC1-Enzyms, welche durch die Reduktion von *N*-Hydroxyurethan zum Urethan zustande kommt. Hierbei ist der Mechanismus einer kovalenten Inhibition anhand der Beobachtungen plausibel. Dieser wird in Kapitel 4.7.3 erläutert. Um den Mechanismus der Giftung näher zu betrachten, wurde derselbe Versuch mit dem Unterschied, dass BAO zusammen mit *N*-Hydroxyurethan und den Enzymen kokubiert wurde und nicht nach 2 min hinzugeführt wurde, durchgeführt.



**Abbildung 4.62:** Inhibitionsversuch mit und ohne 1 mM *N*-Hydroxyurethan in einer Kokubation mit BAO von mARC1 und mARC2. *N*-Hydroxyurethan und BAO wurden über 3 min mit den Proteinen vorinkubiert. Der Versuch startete mit der Zugabe von NADH. Die Kontrolle zeigen die ungehinderte Umsetzung von BAO durch mARC.

Hierbei wird sehr deutlich, dass die Koinkubation nicht annähernd den inhibitorischen Effekt aufzeigt wie das Vergleichsexperiment zuvor. Sowohl mARC1 als auch mARC2 weisen lediglich leicht geringere Umsetzungsrate im Vergleich zu den Kontrollexperimenten ohne *N*-Hydroxyurethan auf. Jedoch sind diese Effekte eher auf eine kompetitive Hemmung als eine kovalente Hemmung zurückzuführen. Dies ist auch daran erkennbar, dass hier keinerlei Unterschiede zwischen mARC1 und mARC2 im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen vorliegen.

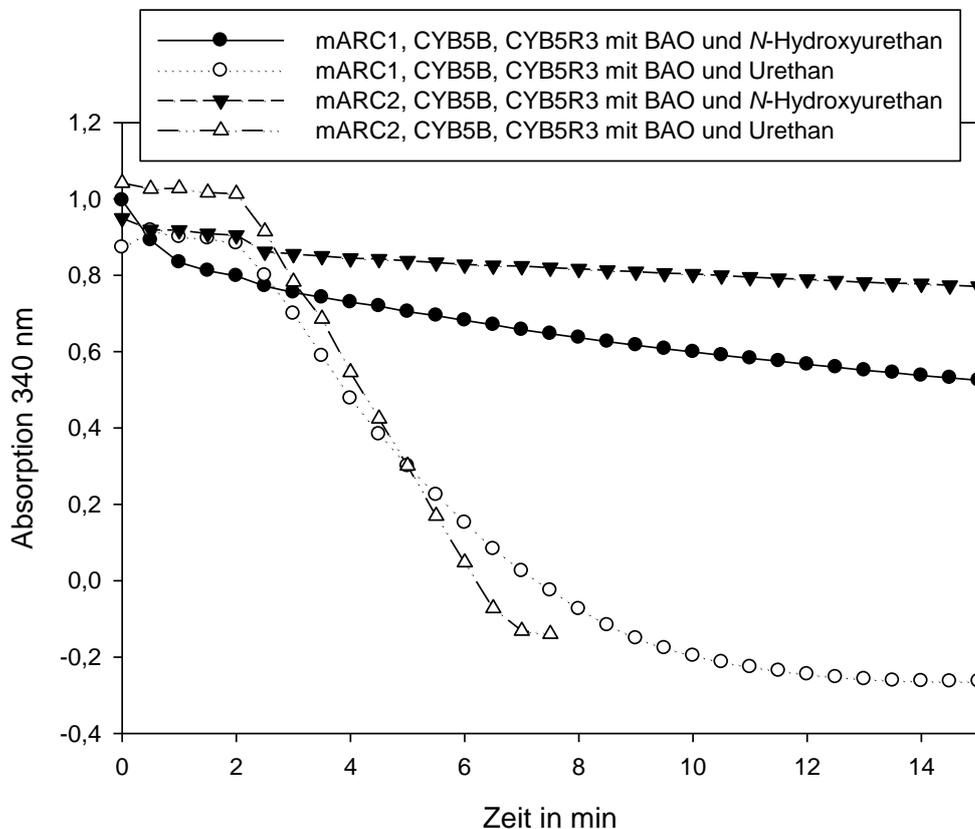
Um zu testen, ob diese Inhibition abhängig ist von dem *N*-hydroxylierten Carbamat oder ob diese auch mit einem Carbamat möglich ist, wurde der Versuch mit dem identischen Ablauf mit Urethan durchgeführt.



**Abbildung 4.63: Inhibitionsversuch mit und ohne 1 mM Urethan von mARC1 und mARC2.** Die Zugabe von BAO (3 mM) erfolgte 2 min nach dem Starten des Versuchs mit NADH. Die Kontrolle zeigen die ungehinderte Umsetzung von BAO durch mARC.

Die Abbildung 4.63 zeigt hierbei deutlich, dass weder bei mARC1 noch bei mARC2 eine Inhibition im Vergleich zu den Kontrollexperimenten detektierbar ist. Es ist somit davon auszugehen, dass essenziell die intakte *N*-hydroxylierte Struktur Voraussetzung für die Hemmung ist. Dies erscheint zudem vom Standpunkt des Reduktionsmechanismus von

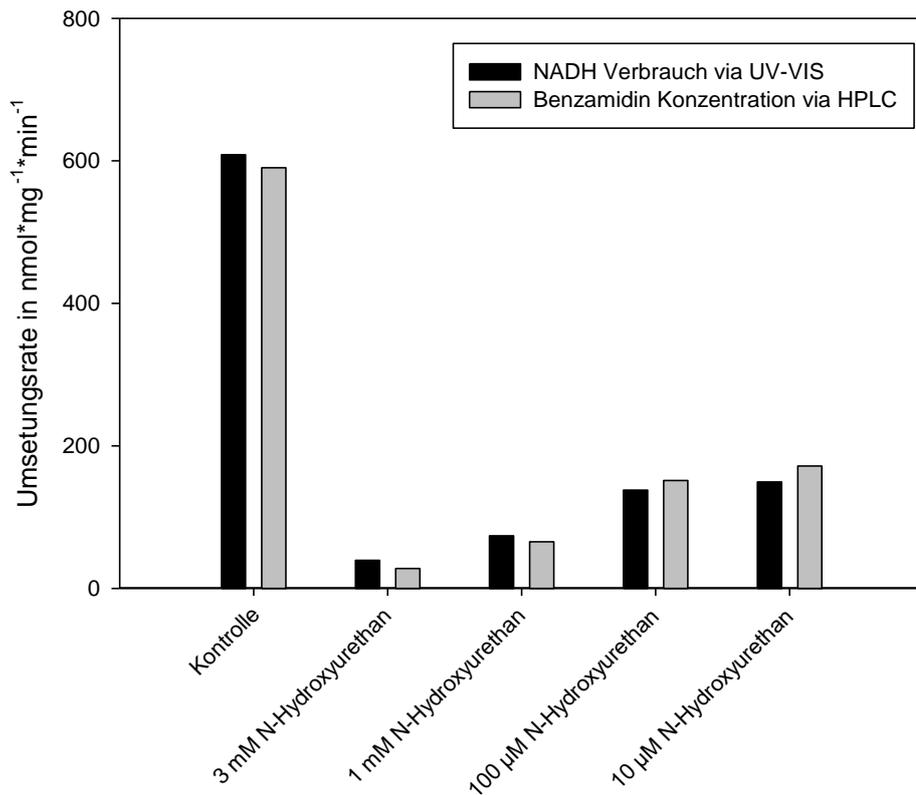
mARC sinnvoll, da die *N*-O-Bindung im aktiven Zentrum fixiert wird und somit die Ausrichtung in der Bindetasche festlegt. Einzuschränken ist diese Beobachtung, sowie die der präferenziellen mARC1-Inhibition von *N*-Hydroxycarbamaten durch das Experiment mit relativ hohen *N*-Hydroxyurethan Konzentrationen von 3 mM (Abbildung 4.64).



**Abbildung 4.64:** Inhibitionsversuch mit 3 mM *N*-Hydroxyurethan oder 3 mM Urethan von mARC1 und mARC2. Die Zugabe von BAO (3 mM) erfolgte 2 min nach dem Starten des Versuchs mit NADH. Die Kontrollen können aus den vorherigen Abbildungen entnommen werden und wurden hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt.

Hierbei zeigt sich eine starke Inhibition von mARC1 und mARC2 durch im Vergleich zu BAO äquimolaren Einsatz von *N*-Hydroxyurethan. Zudem ist erkennbar, dass auch das Urethan, zumindest im Fall von mARC1 über eine gewisse Hemmwirkung verfügt, dies ist bei mARC2 indes nicht zu beobachten.

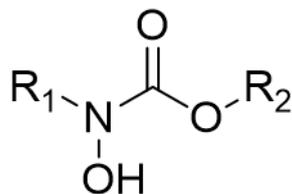
Um das Ausmaß der Inhibition noch mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurde eine Bestimmung der BA-Konzentration durch HPLC nach der Methode 3.4.3 durchgeführt. Dabei sollte gezeigt werden, inwiefern unterschiedliche Konzentrationen *N*-Hydroxyurethan unterschiedlichen Umsetzungsrate, der Reduktion von BAO zu BA zur Folge hat. Für die Vergleichbarkeit wurde die Reaktion sowohl mittels HPLC als auch UV-VIS überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.65 aufgezeigt.



**Abbildung 4.65: Vergleich der Umsetzungsrate in  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  von Inkubationsansätzen mit mARC1, CYB5B und CYB5R3 und unterschiedlicher Konzentration von *N*-Hydroxyurethan.** Der Versuch wurde nach der Methode aus 3.1.1 durchgeführt und nach der Beendigung mit Methanol versetzt. Danach wurde der Ansatz nach Methode 3.4.3 via HPLC vermessen. Die Balken für NADH und BA entstammen jeweils aus demselben Inkubationsansatz

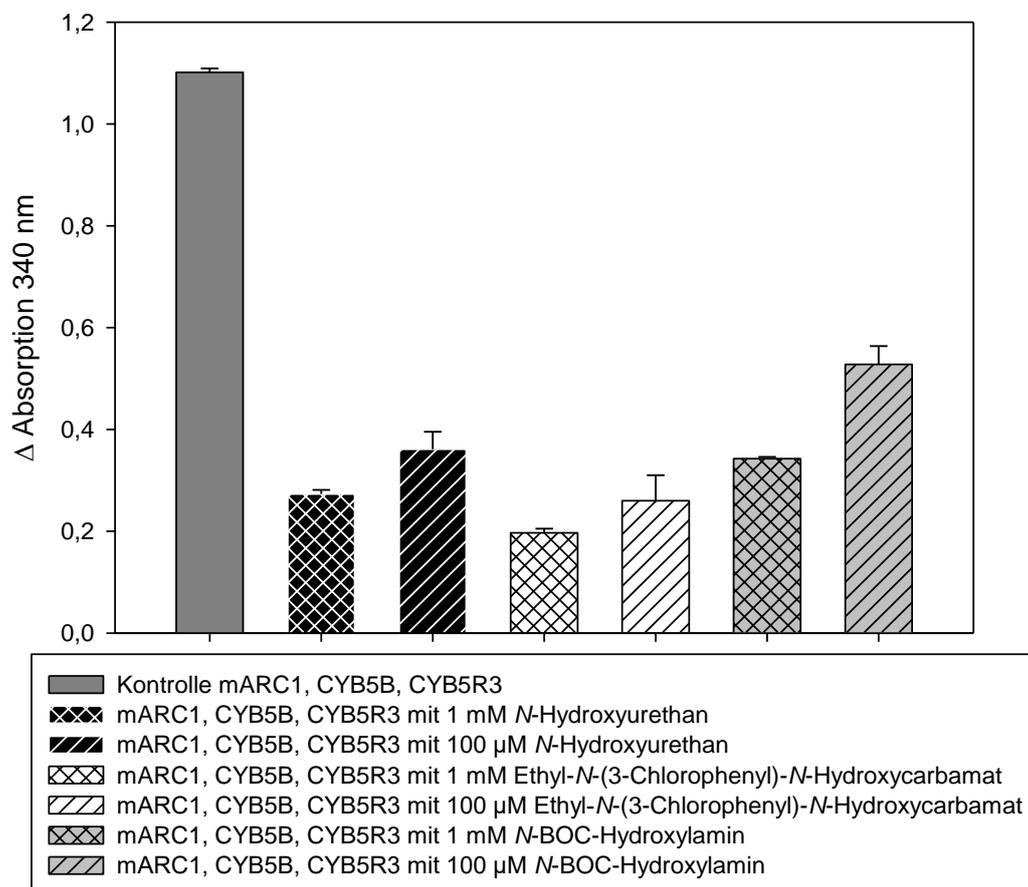
Hier wird die starke Inhibition von mARC1 auch bei vergleichbar niedrigen Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  deutlich. Mit beiden Detektionsmethoden konnte derselbe Grad an Inhibition bei der Reduktion von BAO festgestellt werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte der Einfluss von Substitutionen auf die Inhibitionswirkung gezeigt werden. Die allgemeine Struktur der *N*-Hydroxycarbamate (Abbildung 4.66) besitzt an zwei Positionen Möglichkeiten einer Derivatisierung.



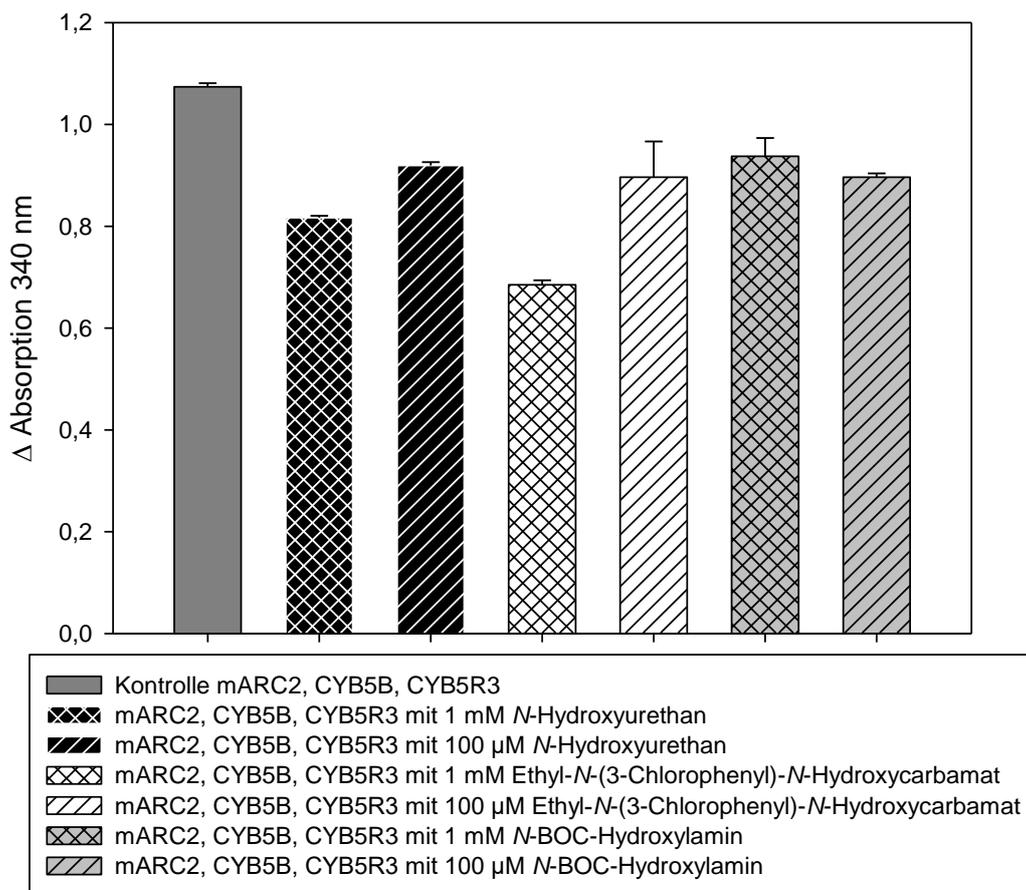
**Abbildung 4.66: Allgemeine Struktur des Pharmakophors eines *N*-Hydroxycarbamats als mARC1-Inhibitor.**

Um zu überprüfen, ob  $R_1$  und  $R_2$  im Vergleich zu *N*-Hydroxyurethan veränderbar ist, wurden zwei Derivate untersucht wobei jeweils nur  $R_1$  bzw. nur  $R_2$  im Vergleich zum *N*-Hydroxyurethan verändert wurden. Dafür wurden Ethyl-*N*-(3-Chlorophenyl)-*N*-Hydroxycarbamat und *N*-BOC-Hydroxylamin ausgewählt (Abbildung 460).



**Abbildung 4.67:** NADH-Assay Ergebnisse einer BAO mARC1-Inkubationsreihe nach Vorinkubation mit unterschiedlichen *N*-Hydroxycarbamaten, jeweils in einer Konzentration von 1 mM und 100 μM als Doppelbestimmung.

Die Abbildung 4.67 zeigt, dass bei hohen Konzentrationen von Inhibitor alle Derivate in der Lage sind, die BAO Umsetzung stark einzuschränken. Auffallend ist, dass bei diesen Konzentrationen die Inhibition durch *N*-BOC-Hydroxylamin nicht so stark hemmt wie die anderen beiden *N*-Hydroxycarbamate. Dies könnte an sterischen Gründen des *tert*-butylrestes liegen, jedoch zeigen die Daten, dass die Inhibition auch bei diesen Derivaten noch erfolgt. Das identische Experiment mit mARC2 zeigt, dass die Inhibition nur sehr schwach ist bzw. teilweise nicht nachweisbar ist (Abbildung 4.64).



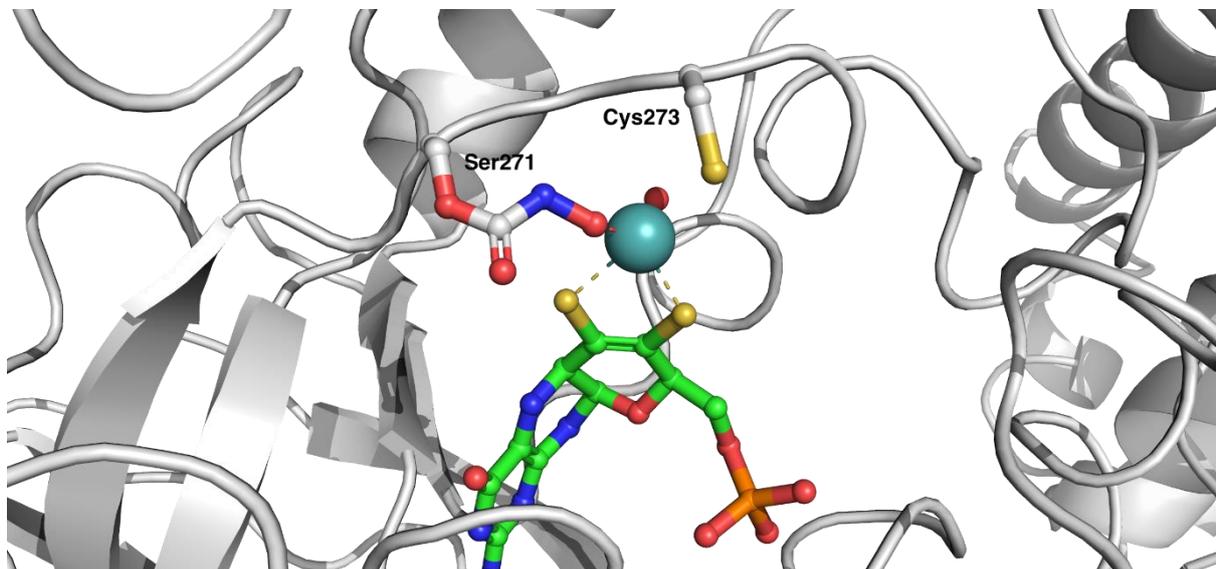
**Abbildung 4.68:** NADH-Assay Ergebnisse einer BAO mARC2-Inkubationsreihe nach Vorinkubation mit unterschiedlichen *N*-Hydroxycarbamaten, jeweils in einer Konzentration von 1 mM und 100 μM als Doppelbestimmung.

Lediglich die Inkubation mit 1 mM Ethyl-*N*-(3-Chlorophenyl)-*N*-Hydroxycarbamat und 1 mM *N*-Hydroxyurethan zeigt einen erkennbaren Effekt auf die Umsetzungsrate.

#### 4.7.3 Postulierter Mechanismus der Inhibition von mARC1 durch *N*-Hydroxycarbamate

Der postulierte Mechanismus folgt aus den Versuchsbeobachtungen, den Daten zu den Unterschieden im aktiven Zentrum von mARC1 und mARC2, sowie auf bereits bekannte Inhibitionen, welche mit einer ähnlichen Struktur andere Enzyme hemmen. *N*-Hydroxyurethan kann als Inhibitor von mARC1 an dem Serin 271 in dem aktiven Zentrum binden. Dieses liegt in einem Abstand von 7,1 Å zum Molybdän von mARC1 vor. Dabei wird die *N*-O-Bindung von *N*-Hydroxyurethan, wie für mARC üblich, am Moco fixiert. Dadurch gelangt die Carbonylfunktion aus dem Carbamat in direkter Umgebung zu der Hydroxyfunktion vom Serin 271 (anhand der mARC1-Kristallstruktur nachvollzogen [17, 60]). Es kommt zu einem nucleophilen Angriff mit anschließender Carbamylierung des Serins unter Abspaltung von

Ethanol. Das aktive Zentrum von mARC1 ist dadurch sterisch für Substrate blockiert (Abbildung 4.69). Zudem ist es denkbar, dass dabei die *N*-O-Bindung weiterhin über das aktive Zentrum fixiert bleibt und auch somit die Bindung von Substraten unterbindet.



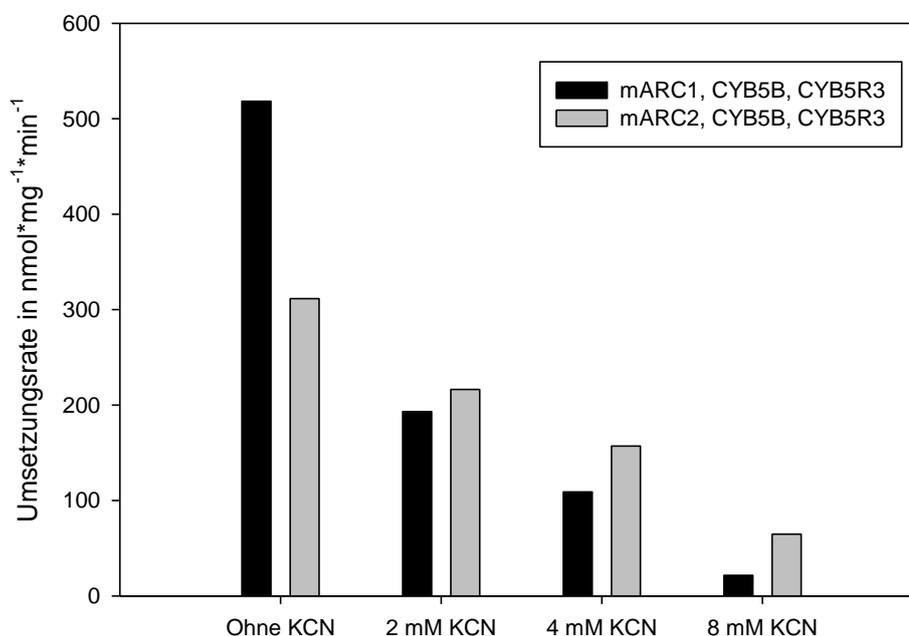
**Abbildung 4.69: Aktives Zentrum von mARC1 nach Inhibition mit *N*-Hydroxyurethan (erstellt mithilfe der Software Schrödinger mit freundlicher Unterstützung von Michel Struwe).** Dargestellt ist das aktive Zentrum der mARC1 Bindetasche. Hervorgehoben ist das Cystein 273, welches das Molybdän im aktiven Zentrum koordiniert, sowie das Serin 271, welches als Angriffspunkt für die kovalente Inhibition der *N*-Hydroxycarbamate vermutet wird. In der Abbildung liegt das Serin 271 nach der Reaktion mit *N*-Hydroxyurethan vor. Der türkise Ball stellt das Molybdän im aktiven Zentrum dar, unterhalb diesen ist die Koordination zum Moco dargestellt. Der nicht relevante Teil der Bindetasche für diese Reaktion ist grau gezeigt.

Das carbamilierte Serin kann durch eine Reaktion mit Wasser wieder in den Ursprungszustand zurückkehren. Die Wahrscheinlichkeit dafür könnte von dem Substitutionsmuster der Ausgangsverbindung abhängig sein, in diesem Fall *N*-Hydroxyurethan. Diese Reaktion ist mARC1-spezifisch, da mARC2 an der Position über ein Prolin an Stelle des Serins verfügt. Für die Reaktion ist zudem die Bindung am Moco mithilfe der *N*-O-Bindung unabdingbar. Urethan besitzt keinen messbaren inhibitorischen Effekt auf mARC1 unterhalb einer Konzentration von 1 mM (Abbildung 4.63). Aus den Versuchsbeobachtungen geht zudem hervor, dass die Giftung durch *N*-Hydroxycarbamaten nur bei der Elektronenübertragung möglich ist, da es anfangs zu einem deutlichen Abfall der Absorption kommt. Dies bedeutet, dass mARC1 zu diesem Zeitpunkt, trotz Vorinkubation mit *N*-Hydroxyurethan, noch aktiv ist. Erst die Zugabe des Reduktionsäquivalents NADH sorgt für die Inhibition von mARC. Der generelle Mechanismus einer Reaktion von einem Serin im aktiven Zentrum mit einem Carbamat als Inhibitor ist bekannt und wird bei der Hemmung der Acetylcholinesterase mit Wirkstoffen wie Rivastigmin genutzt. Ebenfalls findet sich dieser Mechanismus bei der Anwendung zahlreicher Insektizide wie beispielsweise Adicarb, Carbofuran oder Propoxur wieder [183]. Auch für viele weitere Enzyme wurde dieser Mechanismus zur kovalenten Inhibition diskutiert. Die Arbeitsgruppe um *Alexander et al.* beispielsweise, fand analog eine Carbamalyierung der Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH),

welche im Metabolismus von Signallipiden involviert ist [184]. Der dabei vorgeschlagte Arbeitsweg zur Beweisführung gibt dabei gute Anhaltspunkte zur weiteren Derivatisierung mit dem Ziel der besseren Inhibition von mARC1. Der genannte Mechanismus für die Inhibition von mARC1 ist generell für nucleophile Verbindungen denkbar, die analog zu den *N*-Hydroxycarbamaten, über eine *N*-O-Bindung verfügen. Hierbei muss der nucleophile Teil des Moleküls in einem geeigneten Abstand zur *N*-O-Bindung vorliegen, um bei einer Bindung am Molybdän das Serin 271 angreifen zu können. Auch die Inhibition analog zu der Acetylcholinesterase mit Organophosphaten ist hierbei für die rein mechanistische Aufklärung denkbar. Da diese irreversible Suizidinhibitoren darstellen, ist der Einsatz als Arzneistoff, aufgrund der erwartbaren Nebenwirkungen eher nicht plausibel.

#### 4.7.4 Inhibition von mARC durch anorganische Substanzen

Neben den organischen Inhibitoren sollte ebenfalls untersucht werden, ob es anorganische Substanzen gibt, welche die Reduktion durch das mARC-Enzymsystem inhibieren. Hierzu wurde als bekannte Substanz zur Inhibition der mitochondrialen Atmungskette KCN [185] untersucht. Analog zu den Überlegungen der Testung von Organophosphaten diente diese Untersuchung lediglich der Möglichkeit zur mechanistischen Aufklärung und als Positivkontrolle für die Testung von Assays zur Identifizierung von weiteren Inhibitoren.



**Abbildung 4.70: Umsetzungsrate von mARC1- und mARC2-Inkubationsreihen von der Reduktion von 3 mM BAO unter Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen von KCN. KCN und BAO wurden koinkubiert und die Reaktion mit NADH gestartet.**

Die Versuchsreihe um die mARC-abhängige Reduktion von BAO unter Einfluss von KCN zeigt, dass erwartungsgemäß höhere Konzentrationen KCN die Umsetzungsrate von mARC1 und mARC2 senken. Die Ergebnisse suggerieren eine erhöhte Empfindlichkeit von mARC1, da die Umsetzungsrate vergleichsweise stärker zurückgeht. Da es einen Unterschied zwischen den relativen Aktivitätsverlusten von mARC1 und mARC2 im Vergleich zu der Kontrolle gibt, lässt sich spekulieren, dass mARC direkt betroffen ist und es sich hierbei nicht um eine Inhibition von CYB5B oder CYB5R3 handelt. Da es sich bei dem Versuch jedoch nur um eine Einfachbestimmung handelte, bleibt dies, genauso wie die Beobachtung einer stärkeren Inhibition von mARC1, Gegenstand von Spekulationen. Eine genauere Betrachtung erscheint aufgrund der weniger starken Inhibition im Vergleich zu den *N*-Hydroxycarbamaten jedoch nicht notwendig. Lediglich, um sowohl mARC1 als auch gleichermaßen mARC2 zu inhibieren, kann der Einsatz von höheren Konzentrationen KCN sinnvoll sein.

Ein weiterer anorganischer Stoff mit ähnlichen Voraussetzungen ist NaCl. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Konzentration von 200 mM NaCl die mARC-Aktivität zum Stillstand kommt. Diese Beobachtung ist insofern interessant, dass es die Möglichkeit der vergleichsweise schonenden Abstopfung einer mARC-abhängigen Reduktion bietet ohne Einsatz von organischen Lösemitteln (wie z.B. Methanol oder Acetonitril) oder Hitze zur Denaturierung der Proteine, um in einer enzymatisch katalysierten Folgereaktion ein Medium zu haben, welches das jeweilige andere Enzym nicht stört. Dies könnte beispielsweise eine Alternative für den in 3.3.1 beschriebenen Peroxidase-Assay darstellen, welcher in der hier angewendeten Form die Notwendigkeit der Denaturierung bei 95 °C beinhaltet. Da ein solcher Schritt fehleranfällig sein kann, könnte das Abstoppen mit einer hohen NaCl Konzentration eine Alternative bieten. Die Aktivität von Peroxidase in Gegenwart von 200 mM NaCl wurde allerdings in dieser Arbeit nicht getestet.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Substrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Identifizierung von Substraten und Inhibitoren des mARC-Enzymsystems etabliert. Mithilfe einer HPLC-Methode konnte zunächst der NADH-Assay validiert werden. Dabei konnte anhand des Modellsubstrats BAO die optimalen Reaktionsbedingungen erarbeitet werden. Nach der erfolgreichen Testung von BAO konnten mithilfe des NADH-Assays mehr als 50 bekannte und neu untersuchte Substrate getestet werden. Dabei lag der Fokus neben zugelassenen und in der klinischen Phase befindlichen Arzneistoffen auf einer Reihe von kleineren Molekülen, welche bislang nicht getestet werden konnten und Hinweise auf die physiologische Funktion von mARC geben könnten. Mit Ausnahme der erhaltenen Daten für das Prodrug Upamostat, bei dem eine andere Priorisierung zwischen der Umsetzung durch mARC1 und mARC2 zu den publizierten Daten detektiert wurde, konnten keinerlei signifikanten Unterschiede zu den untersuchten und publizierten Substraten aus der Arbeitsgruppe gefunden werden.

In der Kombination mit der ebenfalls neu etablierten LC-MS-Analytik konnten hingegen andere Publikationen in Frage gestellt werden. So wurde im Rahmen dieser Arbeit eindeutig bewiesen, dass der Arzneistoffkandidat Epacadostat ein mARC-Substrat ist. Die Arbeitsgruppe um *Boer et al.* hatte zuvor aus eigenen Daten andere Schlüsse gezogen [103]. Diese Ergebnisse stammten aus einer Untersuchung mit einer Inkubation von einfachen Leberfraktionen mit Epacadostat und anschließender HPLC-Analytik. Dies zeigt, dass der NADH-Assay mit rekombinanten Proteinen diesen Methoden überlegen sein können. Des Weiteren konnten mithilfe des Assays Hydroxyharnstoffderivate als neue funktionelle Gruppe mit *N*-O-Bindung als mARC-Substrate identifiziert werden. Anhand der beiden Arzneistoffe Hydroxyharnstoff und Zileuton wurden wichtige Hinweise auf Strukturabhängigkeiten gewonnen. Beide Arzneistoffe sind lange Zeit in ihren jeweiligen Indikationsgebieten etabliert. Jedoch wies Zileuton eine verhältnismäßige geringe Umsetzungsrate auf, während Hydroxyharnstoff im Fall von mARC1 Umsetzungsraten erreicht, die mit BAO vergleichbar sind. Dies bedeutet zum einen, dass die Einführung eines Substituenten bei einer unerwünschten Reduktion durch mARC in der Arzneistoffentwicklung von Hydroxyharnstoffderivaten ein sinnvoller Schritt ist. Zum anderen konnten dadurch Schlüsse zum Metabolismus von Hydroxyharnstoff gezogen werden. Obwohl Hydroxyharnstoff seit über 50 Jahren angewendet wird, gibt es wenig Daten zur Biotransformation. Es konnte lediglich eine Reduktion zum Harnstoff in der Leber nachgewiesen werden, jedoch wurde das verantwortliche Enzym dabei nicht identifiziert [76]. Aufgrund der hohen Umsetzungsraten von mARC1 und *in vivo* Vergleichen von anderen mARC-Substraten mit Umsetzungsraten in diesem Bereich kann daher davon ausgegangen werden, dass mARC1 hauptsächlich für die

Reduktion von Hydroxyharnstoff verantwortlich ist. Hierdurch ergeben sich wichtige Fragen für den Therapieerfolg im Zusammenhang mit mARC1-Polymorphismen. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass es Patientenpopulationen gibt, welche auf eine Therapie mit Hydroxyharnstoff nicht ansprechen [77]. Im Zusammenhang mit dem Metabolismus wäre es daher interessant eine Genotypisierung vorzunehmen, um eventuell spezifische mARC1-Varianten mit dem Ansprechen in Verbindung zu bringen. So wäre es beispielsweise denkbar, dass die Patienten, welche besonders stark Hydroxyharnstoff verstoffwechseln, eine Therapieresistenz aufweisen. Zwar konnten bislang bei allen getesteten SNP Varianten von mARC1 eine ähnliche reduktive Aktivität für das Modellsbrat BAO gefunden werden [186], jedoch konnten *Emidin et al.* eine Korrelation zwischen einer mARC-Missens-Variante und dem Schutz vor bestimmten Lebererkrankungen finden [51]. Letzteres demonstriert deutlich, dass polymorphe mARC-Formen einen Einfluss auf klinische Parameter haben können, was insbesondere für Substrate wie Hydroxyharnstoff interessant ist, die mit einer hohen Umsetzungsrate von mARC reduziert werden.

Die hier ausgeführte Struktur-Aktivitätsbeziehung konnte in analoger Weise bei den Hydroxamsäuren Fosmidomycin und FR900098 beobachtet werden. Die beiden Substanzen unterscheiden sich lediglich durch eine Methylgruppe, welche bei FR900098 an der C-Position der Hydroxamsäure zu finden ist. Dieser vergleichsweise kleine Unterschied bedingt jedoch, dass FR900098, im Gegensatz zu Fosmidomycin, kein mARC-Substrat darstellt. Dies ist genauso wie bei den Hydroxyharnstoffderivaten eine wichtige Erkenntnis für die Entwicklung von Arzneistoffen. Da Fosmidomycin als Antibiotikum für die Wirksamkeit die Hydroxamsäure benötigt, ist aus der Perspektive der Stabilität der N-O-Bindung gegenüber einer mARC-abhängigen Reduktion eine Derivatisierung der C-Position absolut sinnvoll. Dies darf natürlich nicht mit einem Wirkungsverlust einhergehen.

Neben den etablierten Arzneistoffen wurden ebenfalls einige Arzneistoffkandidaten auf eine mARC-abhängige Reduktion überprüft. Als vielversprechende Kandidaten wurden CM433 und disc790 näher untersucht. Bei beiden Substanzen handelt es sich um Amidoxime, welche als Prodrug für das wirksame Amidin genutzt werden. Daher ist, analog zu den Prodrugs Ximelagratan und Upamostat, eine hohe Umsetzungsrate durch mARC erwünscht. Wahrscheinlich auf Grundlage des lipophilen Charakters, wies disc790 eher niedrigere Umsetzungsraten als CM433 auf. Jedoch kann anhand des Vergleichs zu Upamostat, welches eine noch geringere Umsetzungsrate aufweist, davon ausgegangen werden, dass disc790 eine ausreichende Bioverfügbarkeit und metabolische Aktivierung aufweist. Zwar besitzt in Bezug auf die Bioverfügbarkeit CM433 gute Voraussetzungen, jedoch ist das ZNS die Zielstruktur für die Substanz. Dies bedingt eine weitere Modifikation durch z.B. der Derivatisierung mit Glycolsäure für eine gezielte Aktivierung im ZNS und zur Verhinderung

einer systemischen Umsetzung. Von dem Standpunkt der metabolischen Aktivierung haben beide Substanzen das Potenzial ein Arzneistoff zu werden.

Aus der Gruppe der Amidoxime konnten auch die beiden Substanzen Upamostat und Ximelagatran, welche zuvor bereits untersucht wurden, nochmals mithilfe der neuen Methode betrachtet werden. Dabei konnten einige ergänzende Daten zu den bisherigen gesammelt werden. So konnte gezeigt werden, dass Ximelagatran stärker durch mARC2 reduziert wird. Eine Tendenz die so auch, entgegen vorheriger Publikationen [42], für Upamostat gefunden wurde.

Ein sehr einfacher Vertreter einer Verbindung mit einer *N*-O-Bindung stellt Hydroxylamin dar. Zwar ist die genaue physiologische Relevanz dieser Verbindung noch nicht endgültig aufgeklärt, sie tritt aber als Zwischenstufe im Metabolismus auf. Mithilfe des NADH-Assays und einer anschließenden Detektion des Produkts durch einen Ammoniak-Assay, konnte Hydroxylamin als die Substanz mit der bislang höchsten Umsetzungsrate für mARC identifiziert werden. Die Umsetzungsrate ist mit  $1719 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  etwa dreimal so hoch wie die Umsetzungsrate des Modellsubstrats BAO. Interessant ist hierbei auch, dass zwar die hohen Umsetzungsraten in dieser Form lediglich für mARC2 gefunden werden, mARC1 jedoch den niedrigeren  $K_m$ -Wert hat und damit verbunden eine ähnliche Affinität besitzt. Somit hat im physiologischen Kontext mARC1 eine größere bzw. nicht unterscheidbare Bedeutung, da die Konzentrationen in denen die Umsetzung von mARC2 besser als die von mARC1 abläuft, nicht im physiologischen Bereich liegen.

Für die physiologische Funktion von mARC wurde unter anderem bislang immer der Schutz vor potenziell mutagenen und karzinogenen Stoffen aufgeführt. Für die Testungen im Rahmen dieser Arbeit konnten dabei unterschiedliche Resultate gewonnen werden. Eine klar detoxifizierende Wirkung wurde dabei bei den *N*-hydroxylierten Nucleosiden festgestellt. Diese vergleichsweise hohen Umsetzungsraten wurden bereits zuvor gefunden und konnten bestätigt werden. Auf Grundlage dieser Resultate entstand die Theorie, dass vor allem Verbindungen mit *N*-O-Bindung karzinogen sind, die nicht durch mARC reduziert werden. Um diese Theorie zu verifizieren, wurde die Gruppe der Nitrosamine näher betrachtet. Nitrosamine sind beinahe ausnahmslos für den Menschen karzinogen, da sie über Intermediate reaktive Verbindungen bilden, die, unter anderem, mit DNA-Basen reagieren können. Hierzu wurde NNK als eines der potentesten Nitrosamine aus dem Tabakrauch getestet. In der Tat konnte diese *N*-O-Bindung nicht von mARC reduziert werden. In einem anderen Zusammenhang wurde auch *N*-Hydroxyurethan als ein Karzinogen identifiziert, welches nicht von mARC reduziert werden kann. Auf Basis dieser Ergebnisse konnte die Theorie bestätigt werden, wobei ein größerer Stichprobenumfang mit bekannten Karzinogenen wie beispielsweise das

*N*-hydroxylierte 2-Acetylaminofluoren [187] nötig ist, um endgültig diese Theorie zu verifizieren. Eine weitere Gruppe, die mit Tumoren der Leber in Verbindung gebracht wird, stellen die PAs dar. Eine hoch potente Verbindung, welche als Fraßschutz unterschiedlicher Pflanzenarten dient, kommt als Verunreinigung in Tee und Honig vor. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Reduktion durch mARC auch eine Toxifizierung darstellen kann. So können *N*-Oxide von PAs durch mARC zurück in die Ausgangsverbindung reduziert werden. Da das *N*-Oxid, welches durch CYP450 oder FMOs mittels Oxidation entsteht, eine weniger toxische Verbindung ist, die durch den Urin ausgeschieden werden kann, ist eine Reduktion unerwünscht. Es konnte *in vivo* bereits diese Reaktion beobachtet werden. Hier konnte nun ein Zusammenhang mit dem mARC-Enzymsystem hergestellt werden.

Die Gruppe der *N*-Oxide umfasst noch eine Reihe vielfältiger anderer Verbindungen. Interessant sind diese für die mARC-Forschung zum einen, da sie stark unterschiedliche Umsetzungsraten aufweisen und zum anderen, da diese bislang nur durch mARC1 reduziert werden konnten. Als Ausnahme dieser postulierten Regel wurde Resazurin entdeckt. Die Substanz, welche in zahlreichen Zellviabilitäts-Assays eingesetzt wird, konnte in den Untersuchungen sowohl von mARC1 als auch mARC2 umgesetzt werden. Zwar lief diese auch ohne Beteiligung von mARC, rein durch CYB5B und CYB5R3 ab, jedoch waren die Reaktionsgeschwindigkeiten dabei nicht vergleichbar. Hierdurch stellt sich die Frage, was Resazurin strukturell von den anderen getesteten *N*-Oxiden unterscheidet.

Alle bisherigen Ergebnisse haben gemeinsam, dass es sich um Reduktionen von *N*-O-Bindungen handelt. In dieser Arbeit ist es jedoch auch gelungen, anhand der Substanzen DMSO und Wasserstoffperoxid Reduktionen von *S*-O- sowie *O*-O-Bindungen nachzuweisen. DMSO ist dabei nicht nur das bisher erste nachgewiesene Molekül mit einer *S*-O-Bindung, welches von mARC umgesetzt wird, sondern hat zudem noch einige andere Besonderheiten. So wird DMSO lediglich von mARC2 umgesetzt, mARC1 zeigt keinerlei Verbrauch an NADH. Dies ist insofern interessant, als bislang mit der Gruppe der *N*-Oxide lediglich Substanzen bekannt waren, welche ausschließlich von mARC1 umgesetzt werden. Zudem zeigt DMSO eine ungewöhnliche Umsetzung, welcher nicht einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Genauso wie TMAO steigert sich die Umsatzrate von DMSO weit über die theoretische Sättigung hinaus. Alle anderen Substanzen mit *S*-O-Bindung, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, konnten nicht als mARC-Substrat identifiziert werden. Diese Substanzen könnten jedoch auch unterhalb der Nachweisgrenzen der Methoden liegen. So wurde beispielsweise die Substanz Ziprasidon mit einer *S*-*N*-Bindung mit einer Reduktion durch die Aldehydoxidase in Verbindung gebracht, wobei die Umsetzungsraten im  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$  Bereich gemessen wurden [188]. Eine Rate, welche nicht zweifelsfrei mithilfe der NADH-Methode bestimmt werden kann. Jedoch wurde sowohl bei Ziprasidon als auch bei den anderen

Substanzen keine erkennbaren Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen durch LC-MS gefunden werden. Durch den Nachweis der mARC2-abhängigen Reduktion von DMSO müssen frühere Arbeiten, die sich mit Umsetzung von Substraten befassen, neu bewertet werden. Bei lipophilen Substanzen war der Einsatz von DMSO als Lösungsvermittler für Biotransformationsassays in den Arbeiten Standard. Die Detektion mithilfe der HPLC konnte jedoch dabei nicht die Umsetzung von DMSO zeigen. Dadurch wurden wahrscheinlich viele Substrate von mARC2 mit einer falsch zu niedrigen Umsetzungsrate bestimmt. Da diese Substrate in Konkurrenz zu DMSO betrachtet wurden, während mARC1 lediglich das eigentliche Substrat umgesetzt hat. Hierbei wurde DMSO meist in Konzentrationen im niedrigen Prozentbereich eingesetzt, welches jedoch umgerechnet einen dreistelligen mM Bereich entspricht und damit über den Faktor 100 größer ist als die üblichen Substratkonzentrationen. Für eine bessere Abbildung der *in vivo* Situation wäre es daher sinnvoll einen Lösungsvermittler zu wählen, welcher mARC1 und mARC2 in gleicherweise oder besser überhaupt nicht beeinflusst. Alternativ kann auch der NADH-Assay angewendet werden, welcher es ermöglicht den Einfluss von DMSO mithilfe der Kontrollen aus der Gesamtumsetzung rauszurechnen.

Im Zusammenhang mit der Entdeckung von mARC in Peroxisomen war Wasserstoffperoxid ein interessantes Molekül für eine Untersuchung. In der Tat konnte unter Zuhilfenahme des fluorimetrischen Assay zweifelsfrei eine mARC-abhängige Reduktion von Wasserstoffperoxid festgestellt werden. Dies ist in Hinblick auf die physiologische Funktion von mARC relevant, da Wasserstoffperoxid im zellulären Metabolismus anfällt und detoxifiziert werden muss. Die Lokalisation in der OMM kann dabei auch in einem Zusammenhang mit der Umsetzung von Wasserstoffperoxid gebracht werden. Hier kann mARC den Austausch von Wasserstoffperoxid aus dem Cytosol zu den Mitochondrien regulieren und zudem die OMM vor den oxidativen Einfluss von Wasserstoffperoxid schützen. Für einen physiologischen Zusammenhang spricht ebenfalls, dass ein Knockout der Katalase einem sehr wichtigen Enzym für den Wasserstoffperoxidmetabolismus, im Mausmodell, Ähnlichkeiten zu dem mARC2-Knockout in der Maus hat [50, 157]. Hierbei bildet sich bei beiden ein prädiabetischer Phänotyp aus, welcher durch erhöhte Glucosespiegel gekennzeichnet ist. Auch die mausspezifische Aldehydoxidase 4 zeigt im Knockout ein solchen Phänotyp [31]. Zudem haben sowohl der Knockout der Aldehydoxidase 4 als auch der Knockout von mARC2 einen negativen Einfluss auf die Expression von Genen, welche mit dem circadianen Rhythmus in Verbindung gebracht werden. Daher kann ein Zusammenhang mit dem Wasserstoffperoxidmetabolismus und den genannten Enzymen vermutet werden.

Auch die *N-N*-Bindung wurde als potenziell interessante Bindung für eine Reduktion durch mARC diskutiert. Herausstechend dabei sind die Ergebnisse für Hydralazin. Das Antihypertonikum, welches häufig in der Schwangerschaft angewendet wird, zeigte ein eindeutig positives Ergebnis im NADH-Assay für eine mARC1-abhängige Reduktion. Da jedoch das Resultat der LC-MS-Überprüfung keinerlei Hinweise auf die Reduktion einer *N-N*-Bindung lieferten, sind hierfür andere Theorien in den Vordergrund gerückt. So ist vom Reaktionsverlauf eine oxidative Veränderung des Hydralazins wahrscheinlich. Nur dies würde gleichzeitig erklären, warum es keine nachweisbaren Produkte in der LC-MS zu finden sind und trotzdem mARC1 eine größere Menge NADH für eine Reduktion nutzt. Das eigentliche Substrat konnte dabei nicht eindeutig identifiziert werden. Anhand der Testung von anderen Verbindungen mit *N-N*-Bindung konnte jedoch innerhalb dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Reduktion dieses Bindungstyps durch mARC festgestellt werden.

Alle nachgewiesenen Substrate wurden in der folgenden Abbildung 5.1 einmal als Übersicht zusammengetragen.

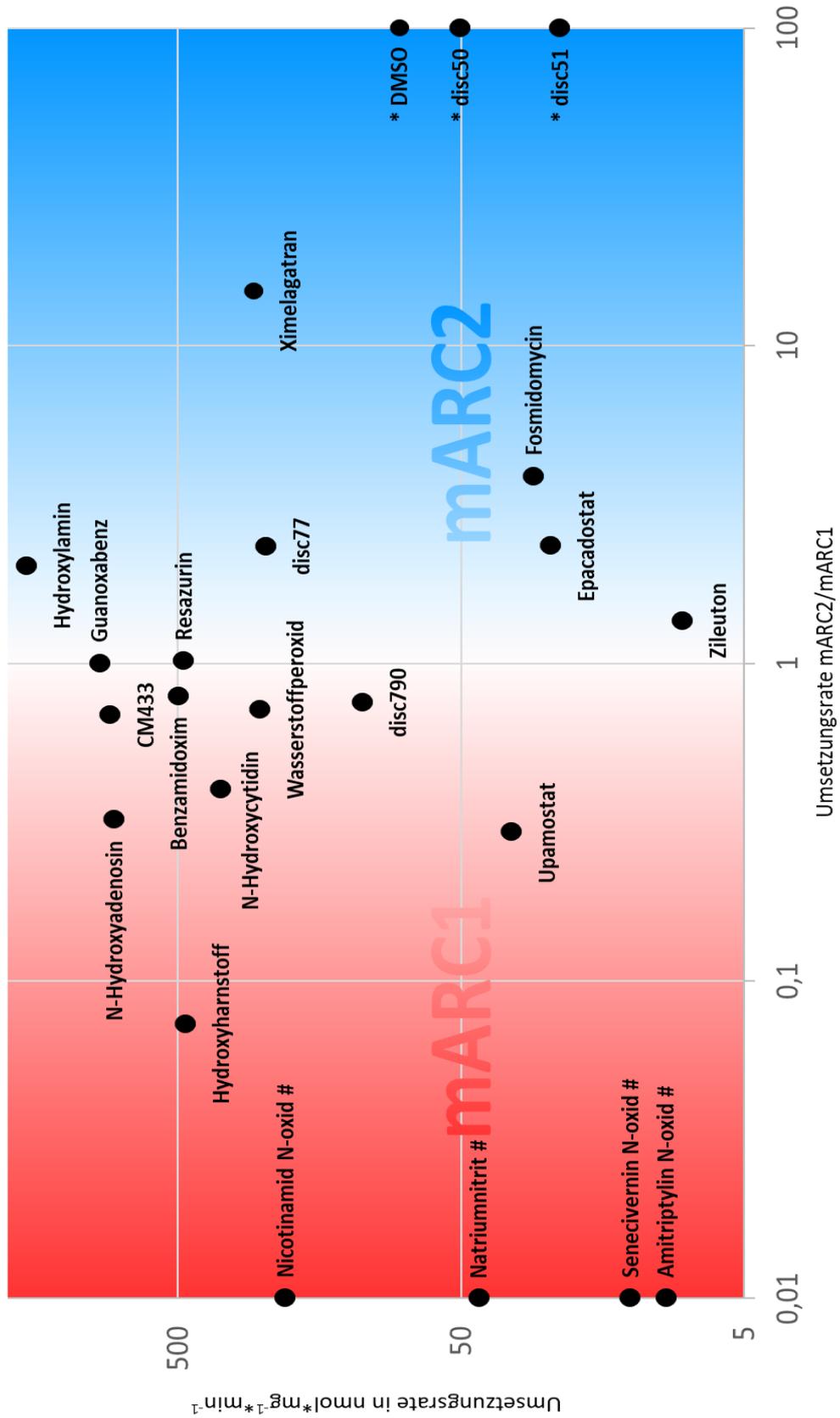


Abbildung 5.1: Alle positiv getesteten mARC-Substrate aufgetragen nach Umsetzungsrate und Präferenz gegenüber der Umsetzung durch mARC1 oder mARC2. # bedeutet Quotient der Umsetzungsrate  $< 0,01$   
 \* bedeutet Quotient der Umsetzungsrate  $> 100$ .

Die Abbildung 5.1 gibt einen Überblick über alle positiv getesteten Substrate. Die Achsen sind dabei jeweils logarithmisch aufgetragen. Dementsprechend sind Substrate mit höherer Umsatzrate weiter oben dargestellt (z.B. Hydroxylamin). Die Abszisse ist als Quotient von der Umsatzrate von mARC2 geteilt durch die Umsatzrate von mARC1 aufgetragen. Dies bedeutet, dass Substrate die präferenziell von mARC2 umgesetzt werden (z.B. Ximelagatran) weiter rechts aufgetragen sind und Substrate die präferenziell von mARC1 umgesetzt werden weiter links aufgetragen sind (z.B. Hydroxyharnstoff). Entsprechend werden Substanzen in der Mitte von beiden Enzymen ähnlich gut umgesetzt (z.B. Guanoxabenz). An den äußeren Rändern sind jeweils die Substrate aufgetragen, welche nur von einem der beiden paralogen Enzyme umgesetzt werden. Der Wert für Substrate, welche nur von mARC1 umgesetzt werden, wurde auf 0,01 gesetzt und der Wert für Substrate, die nur von mARC2 umgesetzt werden, wurde auf 100 gesetzt. Mit Ausnahme des Wertes für disc790 entstammen die Messdaten dem NADH-Assay. Im Fall von Natriumnitrit wurden die Werte aus der Untersuchung im Tris-Puffer zu Grunde gelegt, daher ist keine Umsetzung von mARC2 dargestellt. Nicht aufgetragen, trotz eindeutiger Indizien auf eine mARC-abhängige Umsetzung, sind Methyloisothiazolinon und Hydralazin, da bei diesen Substanzen nicht zweifelsfrei nachvollzogen werden konnte, welche Reaktion im Detail abläuft. Ebenfalls nicht dargestellt sind Substanzen, welche auch ohne mARC nur durch CYB5B und CYB5R3 mit gleicher Geschwindigkeit umgesetzt werden. Da es sich hierbei jeweils um die Umsatzrate handelt, welche durch die jeweiligen Kontrollen bereinigt ist, bedeutet dies, dass zum Teil die Substanzen höhere Gesamtumsatzraten erzielen. So besitzen disc50 und disc51 eine CYB5B- und CYB5R3-abhängig höhere Umsatzraten als hier dargestellt. Die Zugabe von mARC1 erwirkt keine Verbesserung dieser Umsatzrate, die Zugabe von mARC2 lediglich eine leichte. Somit ist hier der zusätzliche Effekt von mARC2 gezeigt als Differenz aus der Umsatzrate mit nur CYB5B und CYB5R3. Jedoch fällt diese Art der Berechnung lediglich bei den beiden genannten Substanzen stark ins Gewicht. Alle anderen gezeigten Substanzen werden primär mARC-abhängig umgesetzt.

Die Abbildung 5.1 zeigt eine deutliche Präferenz zu Gunsten der Umsetzung durch mARC1. Da es sich um humane rekombinante Enzyme handelt, ist diese Beobachtung nicht überraschend. Im Menschen wird ubiquitär mARC1 exprimiert und hat daher eine höhere metabolische Bedeutung als mARC2 [37]. Dabei schwanken die gemessenen Umsatzraten um mehr als den Faktor 100. Zwischen Hydroxylamin, welches Werte über  $1719 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  hervorbringt, bis zu Zileuton, welches im niedrigen nmol Bereich umgesetzt wird. Insgesamt gesehen nimmt hierbei die *N*-O-Bindung immer noch eine dominierende Relevanz ein. Zwar konnte die Reduktion anderer Bindungstypen nachgewiesen werden, dennoch kann nicht bestritten werden, dass mARC zu jetzigen Stand hauptsächlich

diesen Bindungstyp reduziert. Dabei kann mARC eine Reihe der bekannten unterschiedlichen funktionellen Gruppen mit *N*-O-Bindung umsetzen.

Ein weiterer Trend ist ebenso gut an der Abbildung 5.1 ablesbar. Es gibt eine klare Tendenz für die Umsetzung von hydrophilen Stoffen. So sind alle Stoffe mit sehr hohen Umsetzungsraten (Hydroxylamin, Guanoxabenz, *N*-Hydroxyadenosin, *N*-Hydroxycytidin, Hydroxyharnstoff etc.) ausgesprochen gut wasserlöslich, während die Substrate welche eher im unteren Bereich der Grafik zu finden sind (Zileuton, Upamostat, Epacadostat, Amitriptylin-*N*-oxid, disc51 etc.) tendenziell lipophilere Stoffe. Dies steht im Zusammenhang mit der Bindetasche von mARC, die ausgehend von diesen Daten, hydrophilere Stoffe bevorzugt. Trotz der offenen Bindetasche kann somit die Umsetzungsrate bei Arzneistoffkandidaten deutlich gelenkt werden, indem die Reduktion mithilfe von sterisch anspruchsvollen, lipophilen Resten verringert wird. Der hier etablierte NADH-Assay liefert dazu gleich das richtige Werkzeug, um den Einfluss der Derivatisierung zu messen.

## 5.2 Inhibitoren

Die Rolle von mARC im menschlichen Organismus nimmt in jüngster Vergangenheit immer konkretere Formen an. Durch den Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel bei Mäusen [50] und Menschen [51] rückt mARC nun auch als Target für einen Arzneistoff stärker in den Fokus. Hierbei wurde mARC mit dem metabolischen Syndrom, einer Volkskrankheit des 21. Jahrhunderts, in Verbindung gebracht. Somit stellt die Entwicklung eines Inhibitors nicht nur aus Sichtweise der Grundlagenforschung, sondern auch als potentieller Arzneistoff ein interessantes Gebiet dar. In dieser Arbeit ist es gelungen, durch Carbamylierung erstmals einen mARC1-spezifischen Inhibitor zu finden. Die Gruppe der *N*-Hydroxycarbamate bringt dabei eine Reihe nützlicher Eigenschaften als „Tool“ für die Untersuchung von mARC mit. Als mARC1-spezifischer Inhibitor kann ein *N*-Hydroxycarbamat Stoffwechselwege, welche spezifisch für mARC1 oder mARC2 sind, differenzieren. Zwei Positionen für eine Derivatisierung liegen vor, welche die Anpassung an die mARC1 Bindetasche ermöglichen und gleichzeitig damit verhindern können, dass andere Enzyme gehemmt werden. Der Angriff auf das Serin 271 mit definierten Abstand zum katalytischen Zentrum von mARC1 gibt zudem die Möglichkeit auch andere funktionelle Gruppen analog zu den *N*-Hydroxycarbamaten als Inhibitoren zu finden. Lipophile Derivate können im Tier- und Zellmodell gezielt genutzt werden, um wichtige *in vivo* Daten von Arzneistoffen und Stoffwechselwegen zu erhalten. Aber die Gruppe hat auch erwähnenswerte Nachteile. Die Grundstruktur ist bedingt durch die hohe Reaktivität als Lebensmittelkarzinogen bekannt. Daher ist eine Derivatisierung unabdingbar. Aus Sichtweise bereits etablierter Arzneistoffe und Arzneistoffkandidaten ist dies jedoch ein machbares Unterfangen. Das Strukturelement konnte bereits erfolgreich für andere Enzyme angepasst werden [184].

### 5.3 Ausblick

Auf Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse ergeben sich vielfältige neue Forschungsfelder. So kann für eine Vielzahl der neu entdeckten Verbindungen wie Wasserstoffperoxid oder Hydroxylamin die physiologische Relevanz im Zellsystem genauer betrachtet werden. Gerade bei den beiden genannten Verbindungen könnte hierbei näher auf die Rolle von mARC im Organismus geschlossen werden. Ein Vergleich von Wildtyp- und Knockout-Zellen und/oder Mäuseorganen würden hierfür wertvolle Informationen liefern. Im Fall von Hydroxyharnstoff wären Patientenstudien von Interesse, die genauer den Metabolismus abhängig vom Genotyp beurteilen. Die Findung von nicht *N-O*-Bindungen, welche von mARC reduziert werden, eröffnet weitreichende Untersuchungen zur Findung weiterer Substrate, gerade mit *O-O*- und *S-O*-Bindung. Dies erweitert zudem die Möglichkeit für die Entdeckung von Biotransformationswegen im Menschen, welche für die Veränderungen im Fettstoffwechsel verantwortlich sind.

Diesbezüglich kann auch ein Inhibitor wertvolle Informationen geben. Eine Derivatisierungsreihe mit anschließender Evaluierung des  $K_i$ -Wertes wäre hierfür eine sinnvolle Ergänzung. Ein mARC1-Inhibitor, welcher im niedrigen  $\mu\text{M}$  oder  $\text{nM}$  Bereich hemmen würde, könnte sogar Potenzial für die Entwicklung eines Arzneistoffes bieten. Sollte es dabei aufgrund der hohen Reaktivität der *N*-Hydroxycarbamatfunktion nicht gelingen, spezifisch mARC1 zu adressieren, wäre auch denkbar analog zu dieser Inhibitorreihe das Serin 271 von mARC1 mithilfe von anderen nucleophilen Verbindungen zu inhibieren. Wichtig hierbei wäre lediglich eine *N-O*-Bindung, welche die Verbindung im aktiven Zentrum in einem geeigneten Abstand zu der funktionellen Gruppe ausrichtet, die mit dem Serin interagieren soll. Somit könnte man einen analogen (Suizid-)Inhibitor entwickeln, welcher nicht die mutagenen Eigenschaften der *N*-Hydroxycarbamate aufweist. Es ist jedoch auch möglich auf Grundlage des NADH-Assays ein Hochdurchsatz-Screening weiterzuentwickeln. In der jetzigen Form hat der NADH-Assay den Nachteil, dass das Absorptionsmaximum von 340 nm in einem automatisierten Verfahren nicht für alle Substrate geeignet ist. Für die Lösung des Problems gibt es jedoch einige Ansätze. Der einfachste stellt dabei die Kopplung mit einer zweiten Redoxreaktion dar. Hierbei kommt ein Redoxfarbstoff zum Einsatz, welcher mit dem unverbrauchten NADH reagieren kann. Die Endverbindung besitzt dann ein Absorptionsmaximum im höheren nm Bereich, sodass es zu weniger Problemen mit Substraten kommt, da diese in der Regel in diesem Bereich nicht absorbieren. Ein Beispiel hierfür wäre die Kopplung mit NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) (Abbildung 5.2).

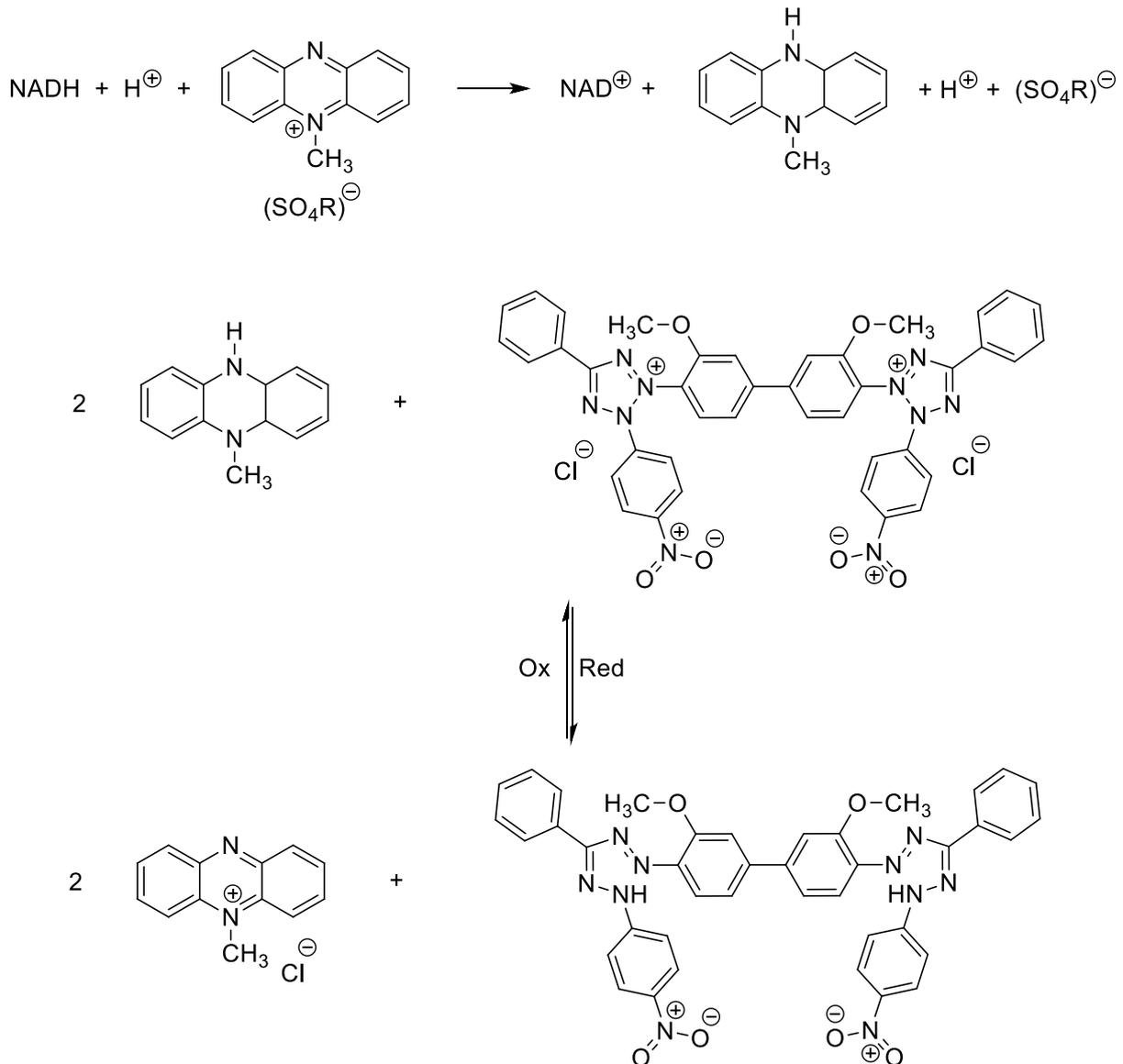


Abbildung 5.2 Redoxreaktion von NADH mit Phenazinmethosulfat mit anschließender Reaktion von NBT zum Diformazan [67].

Grundlage dieser Testung ist, dass Phenazinmethosulfat mit dem in der enzymatischen Reaktion nicht verwendeten NADH reagiert. Das Reaktionsprodukt kann wiederum mit dem Redoxfarbstoff NBT reagieren, welcher dann das bläuliche unlösliche Diformazan bildet. Dieses ist wiederum bei 560 nm mittels UV-VIS messbar [67]. Hierfür muss jedoch eine Reduktion durch Teile des 3-Komponentensystems ausgeschlossen werden. Für diesen Fall gibt es jedoch zahlreiche weitere alternative Redoxfarbstoffe, die auf einem ähnlichen Prinzip beruhen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Hierbei würde ein Substrat mit einem Farbstoff derivatisiert werden, welcher nach der Reduktion fluoresziert [189]. Vorteile dieser Methode sind die hohe Empfindlichkeit und geringe

Störanfälligkeit. Auch eine Messung der Chemilumineszenz wird hierfür verwendet [190]. Nachteilig ist hierbei jedoch, dass ein Substratscreening dafür nicht geeignet ist.

Zuletzt bleiben die genauen Reaktionsverläufe von Hydralazin und Methylisothiazolinon noch offen für eine genauere Betrachtung. Auch das genaue Produkt der Reduktion von Nitrit konnte noch nicht endgültig identifiziert werden. Dies sind offene Fragestellungen, welche Gegenstand weiterer Untersuchungen sein könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. M. Freissmuth, S. Offermanns, S. Böhm, *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* (Springer Berlin Heidelberg, 2016), 16-26.
2. T. Herdegen, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie* (Thieme, 2019), 13-14.
3. E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, P. Ruth, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie* (WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2013), 22-35.
4. T. Sousa, R. Paterson, V. Moore, A. Carlsson, B. Abrahamsson, A. W. Basit, The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **363**, 1–25 (2008).
5. K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, Eds., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker* (Elsevier, 2017), 51-52.
6. M. J. Kurth, T. Yokoi, M. E. Gershwin, Halothane-induced hepatitis: Paradigm or paradox for drug-induced liver injury. *Hepatology* **60**, 1473–1475 (2014).
7. F. P. Guengerich, Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology* **14**, 611–650 (2001).
8. H.-K. Biesalski, *Vitamine, Spurenelemente und Minerale: Indikation, Diagnostik, Therapie* (Georg Thieme Verlag, 2019), 191-193.
9. J. A. Novotny, C. A. Peterson, Molybdenum. *Advances in Nutrition* **9**, 272–273 (2018).
10. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Tägliche empfohlene Tageszufuhr von Kupfer, Mangan, Chrom, Molybdän: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/kupfer-mangan-chrom-molybdaen/> Aufgerufen am 31.08.2020.
11. A. Domke, R. Großklaus, B. Niemann, H. Przyrembel, K. Richter, E Schmidt, A. Weißenborn, B. Wörner, R. Ziegenhagen, Bundesinstitut für Risikobewertung: Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln – Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte: Aufgerufen am 01.09.2020.
12. I. Elmadfa, C. Leitzmann, *Ernährung des Menschen* (Verlag Eugen Ulmer, 2019), 293-294.
13. R. R. Mendel, T. Kruse, Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**, 1568–1579 (2012).

14. E. I. Stiefel, The biogeochemistry of molybdenum and tungsten. *Metal ions in biological systems* **39**, 1–29 (2002).
15. G. Schwarz, R. R. Mendel, M. W. Ribbe, Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**, 839–847 (2009).
16. A. Havemeyer, J. Lang, B. Clement, The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: Current state of research. *Drug Metabolism Reviews* **43**, 524–539 (2011).
17. C. Kubitzka, F. Bittner, C. Ginsel, A. Havemeyer, B. Clement, A. J. Scheidig, Crystal structure of human mARC1 reveals its exceptional position among eukaryotic molybdenum enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 11958–11963 (2018).
18. R. A. Rothery, B. Stein, M. Solomonson, M. L. Kirk, J. H. Weiner, Pyranopterin conformation defines the function of molybdenum and tungsten enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 14773–14778 (2012).
19. B. Wahl, D. Reichmann, D. Nix, N. Krompholz, A. Havemeyer, B. Clement, T. Messerschmidt, M. Rothkegel, H. Biester, R. Hille, R. R. Mendel, F. Bittner, Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *The Journal of biological chemistry* **285**, 37847–37859 (2010).
20. J. Reiss, R. Hahnewald, Molybdenum cofactor deficiency: Mutations in GPHN, MOCS1, and MOCS2. *Human Mutation* **32**, 10–18 (2011).
21. M. Grings, A. P. Moura, A. U. Amaral, B. Parmeggiani, J. Gasparotto, J. C. F. Moreira, D. P. Gelain, A. T. S. Wyse, M. Wajner, G. Leipnitz, Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochimica et biophysica acta* **1842**, 1413–1422 (2014).
22. Orphanet Database, Enzephalopathie durch Sulfitoxidase Mangel: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=DE&Expert=833](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=833) Aufgerufen am 01.09.2020.
23. S. J. Mayr, J. O. Sass, J. Vry, J. Kirschner, I. Mader, J.-B. Hövener, J. Reiss, J. A. Santamaria-Araujo, G. Schwarz, S. C. Grünert, A mild case of molybdenum cofactor deficiency defines an alternative route of MOCS1 protein maturation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **41**, 187–196 (2018).

24. C. D. Brondino, M. J. Romão, I. Moura, J. J. G. Moura, Molybdenum and tungsten enzymes: The xanthine oxidase family. *Current Opinion in Chemical Biology* **10**, 109–114 (2006).
25. R. Hille, T. Nishino, F. Bittner, Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination Chemistry Reviews* **255**, 1179–1205 (2011).
26. R. Hille, T. Nishino, Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 995–1003 (1995).
27. A. Agarwal, A. Banerjee, U. C. Banerjee, Xanthine oxidoreductase: A journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Critical reviews in biotechnology* **31**, 264–280 (2011).
28. C. Vorbach, A. Scriven, M. R. Capecchi, The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: Gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes & development* **16**, 3223–3235 (2002).
29. T. Herdegen, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie* (Thieme, 2019), 216-218.
30. F. Rodríguez-Trelles, R. Tarrío, F. J. Ayala, Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13413–13417 (2003).
31. M. Terao, E. Garattini, M. J. Romão, S. Leimkühler, Evolution, expression, and substrate specificities of aldehyde oxidase enzymes in eukaryotes. *The Journal of biological chemistry* **295**, 5377–5389 (2020).
32. N. Cheshmazar, S. Dastmalchi, M. Terao, E. Garattini, M. Hamzeh-Mivehroud, Aldehyde oxidase at the crossroad of metabolism and preclinical screening. *Drug Metabolism Reviews* **51**, 428–452 (2019).
33. E. Garattini, M. Fratelli, M. Terao, Mammalian aldehyde oxidases: Genetics, evolution and biochemistry. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **65**, 1019–1048 (2008).
34. K. Nowak, N. Luniak, C. Witt, Y. Wüstefeld, A. Wachter, R. R. Mendel, R. Hänsch, Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant & cell physiology* **45**, 1889–1894 (2004).
35. J. Durner, D. F. Klessig, Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 369–374 (1999).

36. A. Havemeyer, F. Bittner, S. Wollers, R. Mendel, T. Kunze, B. Clement, Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *The Journal of biological chemistry* **281**, 34796–34802 (2006).
37. G. Ott, A. Havemeyer, B. Clement, The mammalian molybdenum enzymes of mARC. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **20**, 265–275 (2015).
38. B. Plitzko, A. Havemeyer, B. Bork, F. Bittner, R. Mendel, B. Clement, Defining the Role of the NADH-Cytochrome-b5 Reductase 3 in the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzyme System. *Drug Metabolism and Disposition* **44**, 1617–1621 (2016).
39. K. Fischer, G. G. Barbier, H.-J. Hecht, R. R. Mendel, W. H. Campbell, G. Schwarz, Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: Crystal structures of the nitrate reductase active site. *The Plant cell* **17**, 1167–1179 (2005).
40. C. Ginsel, B. Plitzko, D. Froriep, D. A. Stolfa, M. Jung, C. Kubitza, A. J. Scheidig, A. Havemeyer, B. Clement, The Involvement of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) in the Reductive Metabolism of Hydroxamic Acids. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **46**, 1396–1402 (2018).
41. H. H. Jakobs, D. Froriep, A. Havemeyer, R. R. Mendel, F. Bittner, B. Clement, The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): involvement in metabolic reduction of N-oxides, oximes and N-hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem* **9**, 2381–2387 (2014).
42. D. Froriep, B. Clement, F. Bittner, R. R. Mendel, D. Reichmann, W. Schmalix, A. Havemeyer, Activation of the anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **43**, 780–784 (2013).
43. N. Krompholz, C. Krischkowski, D. Reichmann, D. Garbe-Schonberg, R.-R. Mendel, F. Bittner, B. Clement, A. Havemeyer, The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. *Chemical research in toxicology* **25**, 2443–2450 (2012).
44. P. Indorf, C. Kubitza, A. J. Scheidig, T. Kunze, B. Clement, Drug Metabolism by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Rapid Assay and Identification of New Substrates. *Journal of medicinal chemistry* **63**, 6538–6546 (2020).
45. J. Kotthaus, B. Wahl, A. Havemeyer, J. Kotthaus, D. Schade, D. Garbe-Schönberg, R. Mendel, F. Bittner, B. Clement, Reduction of N( $\omega$ )-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *The Biochemical journal* **433**, 383–391 (2011).

46. C. E. Sparacino-Watkins, J. Tejero, B. Sun, M. C. Gauthier, J. Thomas, V. Ragireddy, B. A. Merchant, J. Wang, I. Azarov, P. Basu, M. T. Gladwin, Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *The Journal of biological chemistry* **289**, 10345–10358 (2014).
47. E. P. A. Neve, A. Nordling, T. B. Andersson, U. Hellman, U. Diczfalusy, I. Johansson, M. Ingelman-Sundberg, Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **287**, 6307–6317 (2012).
48. H. H. Jakobs, M. Mikula, A. Havemeyer, A. Strzalkowska, M. Borowa-Chmielak, A. Dzwonek, M. Gajewska, E. E. Hennig, J. Ostrowski, B. Clement, The N-reductive system composed of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b5 (CYB5B) and cytochrome b5 reductase (CYB5R) is regulated by fasting and high fat diet in mice. *PLoS one* **9**, e105371 (2014).
49. T. M. Teslovich, K. Musunuru, A. V. Smith, A. C. Edmondson, I. M. Stylianou, M. Koseki, J. P. Pirruccello, S. Ripatti, D. I. Chasman, C. J. Willer, C. T. Johansen, S. W. Fouchier, A. Isaacs, G. M. Peloso, M. Barbalic, S. L. Ricketts, J. C. Bis, Y. S. Aulchenko, G. Thorleifsson, M. F. Feitosa, J. Chambers, M. Orho-Melander, O. Melander, T. Johnson, X. Li, X. Guo, M. Li, Y. Shin Cho, M. Jin Go, Y. Jin Kim, J.-Y. Lee, T. Park, K. Kim, X. Sim, R. Twee-Hee Ong, D. C. Croteau-Chonka, L. A. Lange, J. D. Smith, K. Song, J. Hua Zhao, X. Yuan, J. a. Luan, C. Lamina, A. Ziegler, W. Zhang, R. Y. L. Zee, A. F. Wright, J. C. M. Witteman, J. F. Wilson, G. Willemsen, H.-E. Wichmann, J. B. Whitfield, D. M. Waterworth, N. J. Wareham, G. Waeber, P. Vollenweider, B. F. Voight, V. Vitart, A. G. Uitterlinden, M. Uda, J. Tuomilehto, J. R. Thompson, T. Tanaka, I. Surakka, H. M. Stringham, T. D. Spector, N. Soranzo, J. H. Smit, J. Sinisalo, K. Silander, E. J. G. Sijbrands, A. Scuteri, J. Scott, D. Schlessinger, S. Sanna, V. Salomaa, J. Saharinen, C. Sabatti, A. Ruukonen, I. Rudan, L. M. Rose, R. Roberts, M. Rieder, B. M. Psaty, P. P. Pramstaller, I. Pichler, M. Perola, B. W. J. H. Penninx, N. L. Pedersen, C. Pattaro, A. N. Parker, G. Pare, B. A. Oostra, C. J. O'Donnell, M. S. Nieminen, D. A. Nickerson, G. W. Montgomery, T. Meitinger, R. McPherson, M. I. McCarthy, W. McArdle, D. Masson, N. G. Martin, F. Marroni, M. Mangino, P. K. E. Magnusson, G. Lucas, R. Luben, R. J. F. Loos, M.-L. Lokki, G. Lettre, C. Langenberg, L. J. Launer, E. G. Lakatta, R. Laaksonen, K. O. Kyvik, F. Kronenberg, I. R. König, K.-T. Khaw, J. Kaprio, L. M. Kaplan, A. Johansson, M.-R. Jarvelin, A. C. J. W. Janssens, E. Ingelsson, W. Igl, G. Kees Hovingh, J.-J. Hottenga, A. Hofman, A. A. Hicks, C. Hengstenberg, I. M. Heid, C. Hayward, A. S. Havulinna, N. D. Hastie, T. B. Harris, T. Haritunians, A. S. Hall, U. Gyllensten, C. Guiducci, L. C. Groop, E. Gonzalez, C. Gieger, N. B. Freimer, L. Ferrucci, J. Erdmann, P. Elliott, K. G. Ejebe, A. Döring, A. F. Dominiczak,

- S. Demissie, P. Deloukas, E. J. C. de Geus, U. de Faire, G. Crawford, F. S. Collins, Y.-d. I. Chen, M. J. Caulfield, H. Campbell, N. P. Burtt, L. L. Bonnycastle, D. I. Boomsma, S. M. Boekholdt, R. N. Bergman, I. Barroso, S. Bandinelli, C. M. Ballantyne, T. L. Assimes, T. Quertermous, D. Altshuler, M. Seielstad, T. Y. Wong, E.-S. Tai, A. B. Feranil, C. W. Kuzawa, L. S. Adair, H. A. Taylor, I. B. Borecki, S. B. Gabriel, J. G. Wilson, H. Holm, U. Thorsteinsdottir, V. Gudnason, R. M. Krauss, K. L. Mohlke, J. M. Ordovas, P. B. Munroe, J. S. Kooner, A. R. Tall, R. A. Hegele, J. J. P. Kastelein, E. E. Schadt, J. I. Rotter, E. Boerwinkle, D. P. Strachan, V. Mooser, K. Stefansson, M. P. Reilly, N. J. Samani, H. Schunkert, L. A. Cupples, M. S. Sandhu, P. M. Ridker, D. J. Rader, C. M. van Duijn, L. Peltonen, G. R. Abecasis, M. Boehnke, S. Kathiresan, Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **466**, 707–713 (2010).
50. S. Rixen, A. Havemeyer, A. Tyl-Bielicka, K. Pysniak, M. Gajewska, M. Kulecka, J. Ostrowski, M. Mikula, B. Clement, Mitochondrial amidoxime-reducing component 2 (MARC2) has a significant role in N -reductive activity and energy metabolism. *The Journal of biological chemistry* **294**, 17593–17602 (2019).
51. C. A. Emdin, M. E. Haas, A. V. Khera, K. Aragam, M. Chaffin, D. Klarin, G. Hindy, L. Jiang, W.-Q. Wei, Q. Feng, J. Karjalainen, A. Havulinna, T. Kiiskinen, A. Bick, D. Ardissino, J. G. Wilson, H. Schunkert, R. McPherson, H. Watkins, R. Elosua, M. J. Bown, N. J. Samani, U. Baber, J. Erdmann, N. Gupta, J. Danesh, D. Saleheen, K.-M. Chang, M. Vujkovic, B. Voight, S. Damrauer, J. Lynch, D. Kaplan, M. Serper, P. Tsao, J. Mercader, C. Hanis, M. Daly, J. Denny, S. Gabriel, S. Kathiresan, D. G. Murdock, A missense variant in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 gene and protection against liver disease. *PLOS Genetics* **16**, e1008629 (2020).
52. X. Chen, X. Li, P. Wang, Y. Liu, Z. Zhang, G. Zhao, H. Xu, J. Zhu, X. Qin, S. Chen, L. Hu, X. Kong, P. Awadalla, Novel Association Strategy with Copy Number Variation for Identifying New Risk Loci of Human Diseases. *PloS one* **5**, e12185 (2010).
53. S. F. Altschul, W. Gish, "[27] Local alignment statistics" in *Computer methods for macromolecular sequence analysis*, R. F. Doolittle, Ed. (Acad. Press, 1996), 460–480.
54. J. M. Klein, J. D. Busch, C. Potting, M. J. Baker, T. Langer, G. Schwarz, The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* **287**, 42795–42803 (2012).
55. M. Islinger, G. H. Lüers, K. W. Li, M. Loos, A. Völkl, Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* **282**, 23055–23069 (2007).

56. S. Wiese, T. Gronemeyer, R. Ofman, M. Kunze, C. P. Grou, J. A. Almeida, M. Eisenacher, C. Stephan, H. Hayen, L. Schollenberger, T. Korosec, H. R. Waterham, W. Schliebs, R. Erdmann, J. Berger, H. E. Meyer, W. Just, J. E. Azevedo, R. J. A. Wanders, B. Warscheid, Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **6**, 2045–2057 (2007).
57. A. Llamas, A. Chamizo-Ampudia, M. Tejada-Jimenez, A. Galvan, E. Fernandez, The molybdenum cofactor enzyme mARC: Moonlighting or promiscuous enzyme? *BioFactors* **43**, 486–494 (2017).
58. Y. Chen, D. C. Thompson, V. Koppaka, J. V. Jester, V. Vasiliou, Ocular aldehyde dehydrogenases: Protection against ultraviolet damage and maintenance of transparency for vision. *Progress in Retinal and Eye Research* **33**, 28–39 (2013).
59. The Human Protein Atlas: <https://www.proteinatlas.org/> Aufgerufen am 14.09.2020.
60. C. Kubitza, C. Ginsel, F. Bittner, A. Havemeyer, B. Clement, A. J. Scheidig, T4 lysozyme-facilitated crystallization of the human molybdenum cofactor-dependent enzyme mARC. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* **74**, 337–344 (2018).
61. N. Krompholz, Reduktion von aliphatischen Amidoximen und N-hydroxylierten Basenanaloga durch neue molybdänhaltige Enzymsysteme: *Dissertation. Kiel.* (2013).
62. J. A. Hinson, J. R. Mitchell, N-Hydroxylation of phenacetin by hamster liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **4**, 430–435 (1976).
63. R. W. Estabrook, J. Werringloer, The measurement of difference spectra: Application to the cytochromes of microsomes. *Methods in enzymology* **52**, 212–220 (1978).
64. L. G. Whitby, A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *The Biochemical journal* **54**, 437–442 (1953).
65. P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, G. Löffler, Eds., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Springer, 2014), 103-105.
66. O. Warburg, W. Christian, A. Griese, Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. *Biochemische Zeitschrift* **282** (1935).
67. K.-E. Jaeger, A. Liese, C. Syldatk, Eds., *Einführung in die Enzymtechnologie* (Springer Berlin Heidelberg, 2018), 117-123.
68. R. B. McComb, L. W. Bond, R. W. Burnett, R. C. Keech, G. N. Bowers, JR, Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clinical chemistry* **22**, 141–150 (1976).

69. R. Matissek, M. Fischer, G. Steiner, *Lebensmittelanalytik* (Springer Berlin Heidelberg, 2018), 169-175.
70. D. M. Ziegler, An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs. *Drug Metabolism Reviews* **34**, 503–511 (2002).
71. E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, P. Ruth, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie* (WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2013), 1021-1023.
72. N. J. Gooderham, Ed., *Drug metabolism: Towards the next millennium* (IOS Press, 1998), 59-71.
73. World Health Organization, *Executive Summary The Selection and Use of Essential Medicines: Report of the 22nd WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines* (2019).
74. S. Jinna, P. B. Khandhar, "Hydroxyurea Toxicity" in *StatPearls* (2020).
75. Bristol-Myers Squibb, Fachinformation Litalir®: <https://fi.b-ms.de/Litalir> Aufgerufen am 22.07.2020.
76. R. H. Adamson, S. L. Ague, S. M. Hess, J. D. Davidson, The Distribution, Excretion And Metabolism Of Hydroxyurea. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **150**, 322 (1965).
77. A. Alvarez-Larran, A. Pereira, F. Cervantes, E. Arellano-Rodrigo, J.-C. Hernandez-Boluda, F. Ferrer-Marin, A. Angona, M. Gomez, B. Muina, H. Guillen, A. Teruel, B. Bellosillo, C. Burgaleta, V. Vicente, C. Besses, Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood* **119**, 1363–1369 (2012).
78. D. Bachir, A. Hulin, E. Huet, A. Habibi, R. Nzouakou, M. El Mahrab, A. Astier, F. Galacteros, Plasma and urine hydroxyurea levels might be useful in the management of adult sickle cell disease. *Hemoglobin* **31**, 417–425 (2007).
79. C. Bengtsson, G. Johnsson, C. G. Regårdh, Plasma levels and effects of metoprolol on blood pressure and heart rate in hypertensive patients after an acute dose and between two doses during long-term treatment. *Clinical pharmacology and therapeutics* **17**, 400-408 (1975).
80. J. Hilbert, E. Radwanski, R. Weglein, V. Luc, G. Perentesis, S. Symchowicz, N. Zampaglione, Pharmacokinetics and dose proportionality of loratadine. *Journal of clinical pharmacology* **27**, 694–698 (1987).

81. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) **9** (2017): Hydroxycarbamid Testung auf Reinheit, 3975-3976.
82. C. Reeh, J. Wundt, B. Clement, N. N'-Dihydroxyamidines: A New Prodrug Principle To Improve the Oral Bioavailability of Amidines. *Journal of medicinal chemistry* **50**, 6730-6734 (2007).
83. K. A. McGill, W. W. Busse, Zileuton. *The Lancet* **348**, 519–524 (1996).
84. J. M. Machinist, M. D. Mayer, M. S. Shet, J. L. Ferrero, A. D. Rodrigues, Identification of the human liver cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of zileuton (ABT-077) and its N-dehydroxylated metabolite, Abbott-66193. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **23**, 1163–1174 (1995).
85. S. G. Kozmin, P. Leroy, Y. I. Pavlov, R. M. Schaaper, YcbX and yiiM, two novel determinants for resistance of Escherichia coli to N-hydroxylated base analogues. *Molecular microbiology* **68**, 51–65 (2008).
86. J. Schneider, U. Girreser, A. Havemeyer, F. Bittner, B. Clement, Detoxification of Trimethylamine N -Oxide by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component mARC. *Chemical research in toxicology* **31**, 447–453 (2018).
87. M. H. Bickel, The pharmacology and biochemistry of N-oxides. *Pharmacological reviews* **21**, 325–355 (1969).
88. A. Lampen, *Pyrrolizidinalkaloide (PA): Toxikologie und Risikobewertung: Vortrag 03.12.2015*.
89. M. G. Neuman, L. Cohen, M. Opris, R. M. Nanau, J. Hyunjin, Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **18**, 825–843 (2015).
90. C. L. Miranda, W. Chung, R. E. Reed, X. Zhao, M. C. Henderson, J. L. Wang, D. E. Williams, D. R. Buhler, Flavin-containing monooxygenase: A major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochemical and biophysical research communications* **178**, 546–552 (1991).
91. R. Lindigkeit, A. Biller, M. Buch, H.-M. Schiebel, M. Boppre, T. Hartmann, The two Faces of Pyrrolizidine Alkaloids: The Role of the Tertiary Amine and its N-Oxide in Chemical Defense of Insects with Acquired Plant Alkaloids. *European Journal of Biochemistry* **245**, 626–636 (1997).
92. J. Xu, W. Wang, X. Yang, A. Xiong, L. Yang, Z. Wang, Pyrrolizidine alkaloids: An update on their metabolism and hepatotoxicity mechanism. *Liver Research* **3**, 176–184 (2019).

93. G. Powis, M. M. Ames, J. S. Kovach, Metabolic conversion of indicine N-oxide to indicine in rabbits and humans. *Cancer research* **39**, 3564–3570 (1979).
94. M. W. Chou, Y.-P. Wang, J. Yan, Y.-C. Yang, R. D. Beger, L. D. Williams, D. R. Doerge, P. P. Fu, Riddelliine N-oxide is a phytochemical and mammalian metabolite with genotoxic activity that is comparable to the parent pyrrolizidine alkaloid riddelliine. *Toxicology Letters* **145**, 239–247 (2003).
95. P. P. Fu, Pyrrolizidine Alkaloids: Metabolic Activation Pathways Leading to Liver Tumor Initiation. *Chemical research in toxicology* **30**, 81–93 (2017).
96. Y.-P. Wang, J. Yan, P. P. Fu, M. W. Chou, Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. *Toxicology Letters* **155**, 411–420 (2005).
97. Q. Xia, Y. Zhao, L. S. von Tungeln, D. R. Doerge, G. Lin, L. Cai, P. P. Fu, Pyrrolizidine Alkaloid-Derived DNA Adducts as a Common Biological Biomarker of Pyrrolizidine Alkaloid-Induced Tumorigenicity. *Chemical research in toxicology* **26**, 1384–1396 (2013).
98. T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, *Cell Viability Assays* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016).
99. F. S. G. Silva, I. G. Starostina, V. V. Ivanova, A. A. Rizvanov, P. J. Oliveira, S. P. Pereira, Determination of Metabolic Viability and Cell Mass Using a Tandem Resazurin/Sulforhodamine B Assay. *Current protocols in toxicology* **68**, 2.24.1-2.24.15 (2016).
100. B. Clement, Reduction of N-Hydroxylated Compounds: Amidoximes (N-Hydroxyamidines) as Pro-Drugs of Amidines. *Drug Metabolism Reviews* **34**, 565–579 (2002).
101. E. Bauch, D. Reichmann, R.-R. Mendel, F. Bittner, A.-M. Manke, P. Kurz, U. Girreser, A. Havemeyer, B. Clement, Electrochemical and mARC-catalyzed enzymatic reduction of para-substituted benzamidoximes: Consequences for the prodrug concept "amidoximes instead of amidines". *ChemMedChem* **10**, 360–367 (2015).
102. E. W. Yue, R. Sparks, P. Polam, D. Modi, B. Douty, B. Wayland, B. Glass, A. Takvorian, J. Glenn, W. Zhu, M. Bower, X. Liu, L. Leffet, Q. Wang, K. J. Bowman, M. J. Hansbury, M. Wei, Y. Li, R. Wynn, T. C. Burn, H. K. Koblisch, J. S. Fridman, T. Emm, P. A. Scherle, B. Metcalf, A. P. Combs, INCB24360 (Epacadostat), a Highly Potent and Selective Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor for Immuno-oncology. *ACS medicinal chemistry letters* **8**, 486–491 (2017).

103. J. Boer, R. Young-Sciame, F. Lee, K. J. Bowman, X. Yang, J. G. Shi, F. M. Nedza, W. Fietze, L. Galya, A. P. Combs, S. Yeleswaram, S. Diamond, Roles of UGT, P450, and Gut Microbiota in the Metabolism of Epacadostat in Humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **44**, 1668–1674 (2016).
104. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen* (Springer Spektrum, 2013), 544-545.
105. C. Maccallini, L. Marinelli, P. Indorf, I. Cacciatore, M. Fantacuzzi, B. Clement, A. Di Stefano, R. Amoroso, A novel prodrug of a nNOS inhibitor with improved pharmacokinetic potential. *ChemMedChem*. 10.1002/cmdc.202000349 (2020).
106. G. S. Wand, R. L. Ney, S. Baylin, B. Eipper, R. E. Mains, Characterization of a peptide alpha-amidation activity in human plasma and tissues. *Metabolism* **34**, 1044–1052 (1985).
107. D. Schade, J. Kotthaus, H. Hungeling, J. Kotthaus, B. Clement, The Peptidylglycine  $\alpha$ -Amidating Monooxygenase (PAM): A Novel Prodrug Strategy for Amidoximes and N - Hydroxyguanidines? *ChemMedChem* **4**, 1595–1599 (2009).
108. Orphanet Database, IRIDA Syndrom: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=DE&Expert=209981](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=209981) Aufgerufen am 12.06.2020.
109. S. Kovac, P. Boser, Y. Cui, D. Ferring-Appel, D. Casarrubea, L. Huang, E. Fung, A. Popp, B. K. Mueller, M. W. Hentze, Anti-hemojuvelin antibody corrects anemia caused by inappropriately high hepcidin levels. *Haematologica* **101**, e173-e176 (2016).
110. J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, Prodrugs: Design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 255–270 (2008).
111. E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, P. Ruth, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie* (WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2013), 455-456.
112. S. Gruenewald, B. Wahl, F. Bittner, H. Hungeling, S. Kanzow, J. Kotthaus, U. Schwering, R. R. Mendel, B. Clement, The fourth molybdenum containing enzyme mARC: Cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *Journal of medicinal chemistry* **51**, 8173–8177 (2008).
113. RedHill Biopharma, Information über RHB-107 (Upamostat): <https://www.redhillbio.com/rhb-107> Augerufen 05.08.2020.

114. C.-Y. Liu, H.-J. Chang, S.-S. Uang, P.-J. Sun, Aliphatic Hydroxamic Acids as Chelating Agents; the Stability of Their Proton and Metal Complexes. *Journal of the Chinese Chemical Society* **22**, 225–235 (1975).
115. C. Ginsel, Metabolismus von Hydroxamsäuren durch das mARC-Enzymsystem: *Dissertation. Kiel.* (2019).
116. D. Gießmann, P. Heidler, T. Haemers, S. Van Calenbergh, A. Reichenberg, H. Jomaa, C. Weidemeyer, S. Sanderbrand, J. Wiesner, A. Link, Towards New Antimalarial Drugs: Synthesis of Non-Hydrolyzable Phosphate Mimics as Feed for a Predictive QSAR Study on 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *Chemistry & Biodiversity* **5**, 643–656 (2008).
117. A. Wollrab, *Organische Chemie: Eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009), 869-874.
118. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Chargenrückrufe Valsartan: [https://www.bfarm.de/DE/Arzneimittel/Arzneimittelzulassung/Arzneimittelinformationen/Arzneimittelfaeschungen/RapidAlertSystem/Valsartan/\\_node.html](https://www.bfarm.de/DE/Arzneimittel/Arzneimittelzulassung/Arzneimittelinformationen/Arzneimittelfaeschungen/RapidAlertSystem/Valsartan/_node.html). Aufgerufen am 12.08.2020.
119. swissmedic, Chargenrückruf Metformin Streuli, Filmtabletten: <https://www.swissmedic.ch/swissmedic/de/home/humanarzneimittel/marktueberwachung/qualitaetsmaengel-und-chargenrueckrufe/chargenrueckrufe/chargenrueckruf-streuli-filmtabletten.html>. Aufgerufen am 12.08.2020.
120. P. de Groot, R. F. Munden, Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiologic Clinics of North America* **50**, 863–876 (2012).
121. S. S. Hecht, DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**, 127–142 (1999).
122. J. L. Modesto, A. Hull, A. Y. Angstadt, A. Berg, C. J. Gallagher, P. Lazarus, J. E. Muscat, NNK reduction pathway gene polymorphisms and risk of lung cancer. *Molecular carcinogenesis* **54 Suppl 1**, E94-E102 (2015).
123. L. J. Boux, K. H. Leung, M. E. Sweet, M. C. Archer, Enzymatic reduction of beta-ketonitrosamines. *Carcinogenesis* **4**, 1495–1498 (1983).
124. C. Nagata, O. Mårtensson, On the mechanism of mutagenic action of hydroxylamine. *Journal of Theoretical Biology* **19**, 133–146 (1968).
125. R. L. Saul, M. C. Archer, Oxidation of ammonia and hydroxylamine to nitrate in the rat and in vitro. *Carcinogenesis* **5**, 77–81 (1984).

126. V. Neve, Reduktion von kleinen anorganischen Molekülen mit N-O Bindung durch mARC: *Masterarbeit. Kiel.* (2018).
127. I. Suzuki, U. Dular, S. C. Kwok, Ammonia or Ammonium Ion as Substrate for Oxidation by *Nitrosomonas europaea* Cells and Extracts. *Journal of Bacteriology* **120**, 556–558 (1974).
128. W. H. Campbell, Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiologia Plantarum* **74**, 214–219 (1988).
129. J. Schneider, Studien zur Beteiligung des mARC-Enzymsystems an kardiovaskulär relevanten Prozessen: *Dissertation. Kiel.* (2018).
130. C. L. Bianco, J. P. Toscano, M. D. Bartberger, J. M. Fukuto, The chemical biology of HNO signaling. *Archives of biochemistry and biophysics* **617**, 129–136 (2017).
131. P. Rivera-Fuentes, S. J. Lippard, Metal-Based Optical Probes for Live Cell Imaging of Nitroxyl (HNO). *Accounts of Chemical Research* **48**, 2927–2934 (2015).
132. H. Nakasa, M. Komiya, S. Ohmori, T. Rikihisa, M. Kitada, Rat liver microsomal cytochrome P-450 responsible for reductive metabolism of zonisamide. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **21**, 777–781 (1993).
133. D. D. Stiff, J. T. Robicheau, M. A. Zemaitis, Reductive metabolism of the anticonvulsant agent zonisamide, a 1,2-benzisoxazole derivative. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **22**, 1–11 (2008).
134. Ratiopharm, Fachinformation Zonisamid-Ratiopharm 25 mg, 50 mg, 100 mg Hartkapseln: [www.ratiopharm.de](http://www.ratiopharm.de) Aufgerufen am 15.07.2020.
135. Ratiopharm, Fachinformation Leflunomid Ratiopharm 10 mg, 20 mg Filmtabletten: [www.ratiopharm.de](http://www.ratiopharm.de) Aufgerufen am 23.07.2020.
136. E. Kis, T. Nagy, M. Jani, E. Molnar, J. Janossy, O. Ujhellyi, K. Nemet, K. Heredi-Szabo, P. Krajcsi, Leflunomide and its metabolite A771726 are high affinity substrates of BCRP: Implications for drug resistance. *Annals of the rheumatic diseases* **68**, 1201–1207 (2009).
137. B. Rozman, Clinical Pharmacokinetics of Leflunomide. *Clinical Pharmacokinetics* **41**, 421–430 (2002).
138. E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie* (De Gruyter, 2007), 122-123.
139. L. Stein Gold, W. P. Werschler, J. Mohawk, Adapalene/Benzoyl Peroxide Gel 0.3%/2.5%: Effective Acne Therapy Regardless of Age or Gender. *Journal of drugs in dermatology : JDD* **16**, 582–589 (2017).

140. E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, P. Ruth, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie* (WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2013), 690-691.
141. E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, P. Ruth, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie* (WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2013), 444-449.
142. C. C. Winterbourn, The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in enzymology* **528**, 3–25 (2013).
143. H. Sies, Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology* **11**, 613–619 (2017).
144. R. H. Burdon, C. Rice-Evans, Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free radical research communications* **6**, 345–358 (1989).
145. J. V. Cordeiro, A. Jacinto, The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 249–262 (2013).
146. P. Niethammer, C. Grabher, A. T. Look, T. J. Mitchison, A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **459**, 996–999 (2009).
147. S. Iwakami, H. Misu, T. Takeda, M. Sugimori, S. Matsugo, S. Kaneko, T. Takamura, Concentration-dependent dual effects of hydrogen peroxide on insulin signal transduction in H4IIEC hepatocytes. *PloS one* **6**, e27401 (2011).
148. H. Sies, Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **289**, 8735–8741 (2014).
149. S. Mueller, J. Arnhold, Fast and sensitive chemiluminescence determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in stimulated human neutrophils. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* **10**, 229–237 (1995).
150. R. Schreck, P. Rieber, P. A. Baeuerle, Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal* **10**, 2247–2258 (1991).
151. H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, F. Antunes, Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology* **2**, 535–562 (2014).

152. Y.-M. Go, J. D. Chandler, D. P. Jones, The cysteine proteome. *Free radical biology & medicine* **84**, 227–245 (2015).
153. E. M. Link, P. A. Riley, Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/xanthine oxidase system. *The Biochemical journal* **249**, 391–399 (1988).
154. M. D. Brand, Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free radical biology & medicine* **100**, 14–31 (2016).
155. A. Deisseroth, A. L. Dounce, Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological reviews* **50**, 319–375 (1970).
156. B. Chance, The composition of catalase-peroxide complexes. *The Journal of biological chemistry* **179**, 1311–1330 (1949).
157. C. Heit, S. Marshall, S. Singh, X. Yu, G. Charkoftaki, H. Zhao, D. J. Orlicky, K. S. Fritz, D. C. Thompson, V. Vasiliou, Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice. *Free Radical Biology and Medicine* **103**, 48–56 (2017).
158. L. Flohé, "Changing Paradigms in Thiology" in *Thiol redox transitions in cell signaling: Part A: Chemistry and biochemistry of low molecular weight and protein thiols*, E. Cadenas, L. Packer, Eds. (Elsevier/Academic, 2010), 1–39.
159. T. Henzler, E. Steudle, Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *Journal of experimental botany* **51**, 2053–2066 (2000).
160. G. P. Bienert, A. L. B. Moller, K. A. Kristiansen, A. Schulz, I. M. Moller, J. K. Schjoerring, T. P. Jahn, Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry* **282**, 1183–1192 (2007).
161. G. G. Guilbault, P. J. Brignac, JR, M. Juneau, New substrates for the fluorometric determination of oxidative enzymes. *Analytical chemistry* **40**, 1256–1263 (1968).
162. S. Toppo, L. Flohé, F. Ursini, S. Vanin, M. Maiorino, Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochimica et biophysica acta* **1790**, 1486–1500 (2009).
163. M. Rorth, P. K. Jensen, Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochimica et biophysica acta* **139**, 171–173 (1967).
164. C. M. Grant, Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular microbiology* **39**, 533–541 (2001).

165. J. Riemer, M. Schwarzländer, M. Conrad, J. M. Herrmann, Thiol switches in mitochondria: operation and physiological relevance. *Biological chemistry* **396**, 465–482 (2015).
166. C. Iobbi-Nivol, J. Pommier, J. Simala-Grant, V. Méjean, G. Giordano, High substrate specificity and induction characteristics of trimethylamine-N-oxide reductase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1294**, 77–82 (1996).
167. K. E. Johnson, K. V. Rajagopalan, An active site tyrosine influences the ability of the dimethyl sulfoxide reductase family of molybdopterin enzymes to reduce S-oxides. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13178–13185 (2001).
168. A. G. Cox, C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *The Biochemical journal* **425**, 313–325 (2009).
169. V. E. Kagan, V. A. Tyurin, J. Jiang, Y. Y. Tyurina, V. B. Ritov, A. A. Amoscato, A. N. Osipov, N. A. Belikova, A. A. Kapralov, V. Kini, I. I. Vlasova, Q. Zhao, M. Zou, P. Di, D. A. Svistunenko, I. V. Kurnikov, G. G. Borisenko, Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology* **1**, 223–232 (2005).
170. A. N. Malik, C. Rossios, G. Al-Kafaji, A. Shah, R. A. Page, Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochemical and biophysical research communications* **357**, 237–244 (2007).
171. C. Beedham, J. J. Miceli, R. S. Obach, Ziprasidone metabolism, aldehyde oxidase, and clinical implications. *Journal of clinical psychopharmacology* **23**, 229–232 (2003).
172. M. P. Castanedo-Tardana, K. A. Zug, Methylisothiazolinone. *Dermatitis: contact, atopic, occupational, drug* **24**, 2–6 (2013).
173. X. R. Pan-Zhou, E. Cretton-Scott, X. J. Zhou, M. X. Yang, J. M. Lasker, J. P. Sommadossi, Role of human liver P450s and cytochrome b5 in the reductive metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) to 3'-amino-3'-deoxythymidine. *Biochemical pharmacology* **55**, 757–766 (1998).
174. S. Nehlsen, Untersuchungen zum Wirkmechanismus therapeutisch relevanter Hydrazinderivate: *Dissertation. Kiel.* (2002).
175. J. B. Sutherland, J. P. Freeman, A. J. Williams, J. Deck, Biotransformation of phthalazine by *Fusarium moniliforme* and *Cunninghamella elegans*. *Mycologia* **91**, 114–116 (2019).
176. E. Bauch, Untersuchungen zu Struktur-Aktivitätsbeziehungen am mARC-Enzymsystem.: *Dissertation. Kiel.* (2015).

177. J. Krauß, F. Bracher, Pharmacokinetic Enhancers (Boosters)—Escort for Drugs against Degrading Enzymes and Beyond. *Scientia Pharmaceutica* **86**, 43 (2018).
178. E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, S. Menzel, P. Ruth, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie* (WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2013), 300-302.
179. R. Nery, Some aspects of the metabolism of urethane and N-hydroxyurethane in rodents. *Biochemical Journal* **106**, 1–13 (1968).
180. D. Ryu, B. Choi, E. Kim, S. Park, H. Paeng, C.-i. Kim, J.-y. Lee, H. J. Yoon, E. Koh, Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Fermented Foods Sold in Korea. *Toxicological Research* **31**, 289–297 (2015).
181. E. Boyland, R. Nery, K. S. Pegg, The induction of chromosome aberrations in *Vicia faba* root meristems by N-hydroxyurethane and related compounds. *British Journal of Cancer* **19**, 878–881 (1965).
182. K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, S. Kawanishi, Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 703–714 (2002).
183. M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, V. M. Vasic, Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* **11**, 315–335 (2013).
184. J. P. Alexander, B. F. Cravatt, Mechanism of Carbamate Inactivation of FAAH: Implications for the Design of Covalent Inhibitors and In Vivo Functional Probes for Enzymes. *Chemistry & Biology* **12**, 1179–1187 (2005).
185. H. G. Albaum, J. Teppermann, O. Bodansky, A spectrophotometric study of the competition of methemoglobin and cytochrome oxidase for cyanide in vitro. *The Journal of biological chemistry* **163**, 641–647 (1946).
186. G. Ott, D. Reichmann, C. Boerger, I. Cascorbi, F. Bittner, R.-R. Mendel, T. Kunze, B. Clement, A. Havemeyer, Functional Characterization of Protein Variants Encoded by Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms in MARC1 and MARC2 in Healthy Caucasians. *Drug Metabolism and Disposition* **42**, 718–725 (2014).
187. K. Tatsumi, S. Kitamura, N-hydroxy-2-acetylaminofluorene as effective inhibitor of aldehyde oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* **138** (1986).

188. R. S. Obach, C. Prakash, A. M. Kamel, Reduction and methylation of ziprasidone by glutathione, aldehyde oxidase, and thiol S-methyltransferase in humans: An in vitro study. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **42**, 1049–1057 (2012).
189. K. H. Shaughnessy, P. Kim, J. F. Hartwig, A Fluorescence-Based Assay for High-Throughput Screening of Coupling Reactions. Application to Heck Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 2123–2132 (1999).
190. A. Roda, M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**, 826–833 (2003).

**Erklärung zu §8 der Promotionsordnung**

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer, selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

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

Mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht oder wurden wie folgt präsentiert:

Publikationen:

P. Indorf, C. Kubitza, A. J. Scheidig, T. Kunze, B. Clement, Drug Metabolism by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Rapid Assay and Identification of New Substrates. *Journal of medicinal chemistry* **63**, 6538–6546 (2020).

C. Maccallini, L. Marinelli, P. Indorf, I. Cacciatore, M. Fantacuzzi, B. Clement, A. Di Stefano, R. Amoroso, A novel prodrug of a nNOS inhibitor with improved pharmacokinetic potential. *ChemMedChem*, (2020).

Tagungsbeiträge:

P. Indorf, C. Ginsel, B. Clement, T. Kunze, Development of an amidoxime-reductive assay. (2017), *Posterpräsentation*, DPhG Jahrestagung, Saarbrücken.

P. Indorf, B. Clement, T. Kunze, Identification of new substrates for the mARC Enzyme System. (2018), *Posterpräsentation*, DPhG Jahrestagung, Hamburg.

V. Neve, P. Indorf, C. Ginsel, B. Clement, Reduction of hydroxylamine to ammonia via the molybdenum containing enzyme mARC. (2018), *Posterpräsentation*, DPhG Jahrestagung, Hamburg.

P. Indorf, C. Kubitza, A. J. Scheidig, T. Kunze, B. Clement, Drug Metabolism by mARC: Rapid Assay and Identification of New Substrates. (2019), *Posterpräsentation*, Molybdenum and Tungsten Enzymes Conference, Potsdam.

Patentschriften:

B. Clement, P. Indorf, T. Kunze, Hemmstoffe von mARC1 zur Behandlung von Krankheiten (2020) eingereicht.

Kiel im Oktober 2020

Patrick Indorf

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von **Prof. Dr. Thomas Kunze**.

Zuallererst möchte ich in einem Atemzug meinen Betreuern Thomas und **Prof. Dr. Bernd Clement** danken. Beide haben es mir ermöglicht mit großen Freiheiten meine Promotion anzugehen und mich dabei stets unterstützt.

Insbesondere danke ich Bernd für die Herausgabe des Themas und den Input von neuen Ideen, welche mir stets geholfen haben mein Projekt weiterzubringen. Bernd hatte immer im Blick, welche Aspekte ich noch nachverfolgen sollte, um meine Arbeit voranzubringen.

Ich danke Thomas vor allem dafür, dass er auch für Detailfragen zu meinen Versuchen immer eine offene Tür hatte und mir dabei bei den Herausforderungen der alltäglichen Forschung zu Seite stand. Ich werde sicherlich das angeregte Diskutieren von Versuchsergebnissen in seinem Büro vermissen genauso wie die vielen kleineren Events, wie das gemeinschaftliche Grillen oder die Glühweinabende und die manchmal auch spontanen Ausflüge mit dem Segelboot.

Ich möchte zudem Prof. Dr. Axel Scheidig danken, der in zahlreichen mARC-Sitzungen durch seine andere Perspektive auf das Projekt mir wertvolle Tipps geben konnte, um Probleme bei der Analytik zu beheben. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Christian danken ohne dessen Kooperation mit den Proteinen das Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Dennis Schade danken, für die angenehme Zeit bei der Betreuung des achten Semesters und für den unkomplizierten Übergang am Institut nachdem er in Kiel seine Professur angetreten hat.

Für die Hilfe bei meinen analytischen Fragestellungen danke ich recht herzlichst Uli, Sven und Thomas Behrendt. Insbesondere danke ich Uli für die vielen Hilfestellungen bei meinen MS-Problem und Thomas für die netten Unterhaltungen in den Pausen meiner Versuche.

Meinen Dank gebührt natürlich auch meinen Arbeitskreis. Insbesondere sind hierbei meine Kollegen aus der mARC-Forschung: Carsten, Sophia, Vanessa und Jenny zu nennen. Neben einer tollen Aufnahme in dem Arbeitskreis werden mir sicherlich die zahlreichen Erlebnisse aus den Tagungen in guter Erinnerung bleiben.

Einen Dank auch an allen Korrekturlesern und vor allem an Britta, die mir eine große Hilfe bei einigen Abbildungen waren.

Während meiner Zeit am Institut konnte ich viele Freunde finden. Für die wunderbare Zeit bei den Kaffee und Mittagspausen danke ich Britta, Karsten, Sophia, Philipp, Malte und Holger. Für die tollen Abende nach der Arbeitszeit und den Dänemarkurlaube danke ich Stefan Kirschner, Stefan Lohmann, Karsten, Daniel, Till, Jana, Basti, Maddi und Linda. Zudem möchte ich auch den Freunden danken, die mich schon über meine gesamte Zeit in Kiel begleiten hierbei sind insbesondere Theo, Kai, Falk, Natalie und Frauke zu nennen.

Zuallerletzt gebührt mein Dank meiner Familie, die mich stets unterstützt haben und es mich dadurch erst ermöglicht haben meinen Lebensweg bis zu diesem Punkt zu gehen.

**Lebenslauf****Persönliche Daten**

---

Name	Patrick Marcel Indorf
Geburtsdatum	29.02.1992
Geburtsort	Delmenhorst
Staatsangehörigkeit	deutsch

**Schulbildung**

---

1998-2002	Grundschule Bookholzberg
2002-2004	Orientierungsstufe Bookholzberg
2004-2011	Gymnasium Ganderkesee
Mai 2011	allgemeine Hochschulreife

**Studium und Ausbildung**

---

Okt. 2011-Sept. 2015	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jan. bis Juni 2016	Pharmaziepraktikant bei der apo-rot Esmarch-Apotheke Kiel
Juli bis Dez. 2016	Master der Arzneimittelforschung (M.Sc.) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Februar 2017	Erteilung der Approbation als Apotheker

**Promotion und Weiterbildung**

---

Seit April 2017	Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Kunze mit dem Thema: Entwicklung eines Amidoxim-Reduktase Assays zur Findung von Inhibitoren
Seit April 2017	Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

## Kurzfassung

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) ist das vierte im Menschen identifizierte Molybdoenzym. Mithilfe von Cytochrom  $b_5$  und der NADH-abhängigen Cytochrom  $b_5$  Reduktase, kann es eine Vielzahl von endogenen und xenogenen *N*-oxygenierten Verbindungen reduzieren. Die physiologische Funktion von mARC ist noch nicht voll umfassend aufgeklärt. Jedoch ist mARC hoch konserviert in allen getesteten Säugetiergenomen und konnte bislang mit der Entgiftung von *N*-oxygenierten Nucleosiden, der NO Homöostase sowie den Lipidstoffwechsel in Verbindung gebracht werden. Zudem spielt mARC eine wichtige Rolle bei der Reduktion von verschiedenen funktionellen Gruppen mit *N*-O-Bindung, welche auch in einer Vielzahl von Arzneistoffen und Arzneistoffkandidaten vorkommen bzw. als Metaboliten durch CYP450 gebildet werden.

In dieser Arbeit ist es gelungen einen schnellen NADH-Assay zu etablieren, der zur Findung von neuen Substraten und Inhibitoren mit einem sehr viel höheren Durchsatz als vergleichbare HPLC-Methoden in der Lage ist. Nach erfolgreicher Validierung und Kopplung mit einer LC-MS-Methodik konnten so über 50 Substanzen mithilfe einer Kombination von unterschiedlichen Methoden näher untersucht werden. Dabei wurden mit DMSO (*S*-O-Bindung) und Wasserstoffperoxid (*O*-O-Bindung) erstmals die Reduktion von Substanzen ohne *N*-O-Bindung nachgewiesen. Mit Hydroxylamin, welches die höchste Umsatzrate aller bislang gefundenen Substrate aufweist und Wasserstoffperoxid, wurden Substanzen identifiziert, die zudem große physiologische Relevanz besitzen und somit weitere Hinweise auf die Funktion liefern. Ein bislang nicht beschriebener Schritt der Toxifizierung von Pyrrolizidinalkaloiden wurde durch die neuen Methoden mit mARC in Verbindung gebracht. Auch in dem Feld des Arzneistoffmetabolismus konnten neue Erkenntnisse gesammelt werden. So wurden mit Hydroxyharnstoff und Zileuton, Hydroxyharnstoffe als neue funktionelle Gruppe identifiziert, welche durch mARC reduziert werden. Anhand dieser teils über mehr als 60 Jahre angewendeten Arzneistoffe konnte zudem gezeigt werden, wie die Einführung von Substituenten die Reduktion beeinflusst.

Erstmalig ist es gelungen, einen mARC1-selektiven Inhibitor zu finden. Die Gruppe der *N*-Hydroxycarbamate konnte hierbei als kovalente Suizidinhibitoren beschrieben werden.

Durch diese Arbeit öffnen sich vielfältige neue interessante Felder für die mARC-Forschung. Es kann daran gearbeitet werden, einen Hemmstoff für mARC1 weiter zu entwickeln und es können neue und zudem nicht nur *N*-O-haltige funktionelle Gruppen für die mARC-abhängige Reduktion in Betracht gezogen werden. Der entwickelte Assay ermöglicht es, in den frühen Phasen der Arzneistoffentwicklung eine Untersuchung des mARC-abhängigen Metabolismus durchzuführen.

**Abstract**

The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC) is the fourth molybdenum-containing enzyme in humans. Using cytochrome b5 and the NADH-dependent cytochrome b5 reductase, it can reduce a variety of endogenous and xenogenous *N*-oxygenated compounds. The physiological function of mARC has not yet been fully elucidated. However, mARC is highly conserved and has been associated with detoxification of *N*-oxygenated base analogues, NO homeostasis and lipid metabolism. In addition, mARC plays an important role in the reduction of various functional groups with *N*-O bonds, which also occur in a variety of drugs and drug candidates and also formed by CYP450 enzymes as metabolites.

In this thesis, a rapid NADH-assay capable of finding new substrates and inhibitors with a much higher throughput than comparable HPLC methods has been established. After successful validation and coupling with a LC-MS method, more than 50 substances could be investigated through a combination of different methods in greater detail. DMSO (*S*-O bond) and hydrogen peroxide (*O*-O bond) were the first detected substances without a *N*-O bond that are reduced by mARC. Hydrogen peroxide along with hydroxylamine, which has the highest turnover rate of all substrates found so far, were identified as substances of great physiological relevance and thus provide further information on the function of mARC. A previously undescribed step in the toxification of pyrrolizidine alkaloids was associated with mARC using the new methods. New findings were also obtained in the field of drug metabolism. For the examples of hydroxyurea and zileutone the hydroxyurea functional group, was identified as a new functionality, which is reduced by mARC. Based on these drugs, some of which have been established for more than 60 years, it was also possible to show the influence of substituents in the reduction.

For the first time, a mARC1 selective inhibitor was identified. The group of *N*-hydroxycarbamates could be described as covalent suicide inhibitors.

This work opens up many new interesting fields for mARC research. It is now possible to develop an inhibitor for mARC1 and to consider new functional groups for a mARC reduction that must not necessarily contain *N*-O bonds. This developed assay allows the study of mARC-dependent metabolism in an early stage of drug discovery and development.



