
Studien zur funktionellen Charakterisierung der humanen und murinen mARC-Proteine

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

vorgelegt von

Sophia Rixen

Kiel 2021

1. Gutachter:	Prof. Dr. Bernd Clement
2. Gutachter:	Prof. Dr. Axel Scheidig
Tag der mündlichen Prüfung:	14.12.2021
Zum Druck genehmigt:	14.12.2021

Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt
- Marie Curie

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
------------------------------------	----------

Strukturformelverzeichnis	IX
--	-----------

1	Einleitung.....	1
1.1	Adipositas und Stoffwechselerkrankungen.....	1
1.1.1	Das Metabolische Syndrom.....	1
1.1.2	Lebererkrankungen	2
1.1.2.1	Fettlebererkrankungen.....	3
1.1.3	Oxidativer Stress und das Metabolische Syndrom.....	6
1.2	Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente mARC	9
1.2.1	N-reduktiver Metabolismus	10
1.2.2	mARC1 und mARC2	11
1.2.3	mARC im Energiestoffwechsel	13
1.2.4	mARC als detoxifizierendes Enzym.....	15
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
2	Materialien und Geräte	19
2.1	Medien und Mediensupplemente	19
2.2	Reagenzien.....	19
2.3	Assay Kits	21
2.4	Materialien	22
2.5	Oligonukleotide, Plasmide und Enzyme.....	23
2.6	Geräte und Softwares	23
2.7	Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper	25
3	Methoden	26
3.1	Molekularbiologische Arbeiten: <i>Knockout</i> von <i>MTARC1</i> mittels CRISPR/Cas9.....	26
3.1.1	Vorarbeiten: <i>Target</i> -Auswahl, sgRNA-Design und Plasmid-Auswahl.....	26
3.1.2	Klonierung	27
3.1.3	Transformation und Selektion	28
3.2	Zellkulturmethoden.....	29
3.2.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	29
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	30
3.2.3	Transfektion	30
3.2.4	Selektion	30

3.2.5	DNA-Isolierung	31
3.2.6	Gewinnung der zellulären Proteine	32
3.2.7	Zellviabilitäts-Assays	32
3.2.7.1	Zelltitration	32
3.2.7.2	Resazurin	33
3.2.7.3	<i>CellTiter Glo</i> ®	33
3.2.8	Hoechst-Färbung	34
3.2.9	Proliferations-Assay	34
3.2.10	Toleranz-Studien	35
3.2.10.1	6- <i>N</i> -Hydroxyaminopurin-Toleranzanalyse	35
3.2.10.2	Wasserstoffperoxid-Toleranzanalyse	35
3.2.10.3	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies	35
3.2.10.4	Messung von Lipidperoxiden (LPO)	36
3.2.10.5	Untersuchung der Toleranz gegenüber Substanzen im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel	37
3.2.11	<i>Nile Red</i> -Färbung	37
3.3	Tierstudien mit <i>MTARC1</i>- und <i>MTARC2</i>-KO Mäusen	38
3.3.1	Messung der Körpertemperatur	38
3.3.2	Studie zur Körpergewichtszunahme unter hochkalorischer und normokalorischer Diät	39
3.3.3	Untersuchung des Serums auf biochemische Marker	39
3.3.4	Histologische Untersuchung der murinen Leber	39
3.4	Homogenisation von murinem und humanem Fettgewebe	40
3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.6	Bestimmung der Proteinexpression	40
3.6.1	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.6.2	Western Blot	42
3.7	Inkubationsstudien zur Bestimmung der <i>N</i>-reduktiven Aktivität	43
3.7.1	Synthese von Amitriptylin- <i>N</i> -Oxid	43
3.7.2	Inkubationsstudien mit rekombinanten Proteinen	43
3.7.3	Inkubationsstudien mit murinen und humanen Gewebehomogenaten	44
3.7.3.1	Detektion von Harnstoff	45
3.7.4	Inkubationsstudien mit humanen Zellen	45
3.8	HPLC-Analytik	46
3.8.1	Trennung und Quantifizierung von Benamidin und Benzamidoxim	46
3.8.2	Trennung und Quantifizierung von Nicotinamid und Nicotinamid- <i>N</i> -Oxid	46
3.8.3	Trennung und Quantifizierung von Adenin und 6- <i>N</i> -Hydroxyaminopurin	47
3.8.4	Trennung und Quantifizierung von Benamid und Benzhydroxamsäure	48
3.8.5	Trennung und Quantifizierung von Guanabenz und Guanoxabenz ..	48
3.8.6	Trennung und Quantifizierung von Cytidin und <i>N</i> -Hydroxycytidin	49

3.8.7	Trennung und Quantifizierung von Amitriptylin und Amitriptylin- <i>N</i> -Oxid	49
3.9	Statistische Auswertung	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Untersuchung der Substratspezifität muriner und humaner mARC-Proteine	51
4.1.1	<i>In vitro</i> Reduktase-Assay mit rekombinanten murinen und humanen Proteinen	53
4.1.2	<i>In vitro</i> Reduktase-Assay mit murinen Gewebekomogenaten.....	55
4.2	Untersuchung vom humanen <i>MTARC1</i> mittels CRIPSR/Cas9-vermitteltem KO in HEK-293T Zellen	59
4.2.1	Verifizierung mittels Sequenzierung und Western Blot-Analytik.....	61
4.2.2	Auswirkung auf die Zellvitalität	63
4.2.3	Auswirkung auf die Reduktaseaktivität	65
4.2.4	Auswirkung auf die Toleranz gegenüber des Mutagens HAP	67
4.2.5	Auswirkung auf die Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid	71
4.2.5.1	Auswirkung auf Biomarker des oxidativen Stresses.....	75
4.3	Untersuchung einer hochkalorischen Ernährung in mARC-defizienten Mausmodellen	76
4.3.1	Auswirkung auf das Körpergewicht.....	76
4.3.2	Auswirkung auf klinisch-chemische Laborparameter inklusive Körpertemperatur	78
4.3.3	Auswirkung auf die Leberhistologie	80
4.4	Auswirkung des humanen mARC1 auf den Lipidstoffwechsel.....	81
4.4.1	Auswirkung der Variante A165T auf die Reduktaseaktivität von Fettgewebekomogenaten.....	81
4.4.2	Auswirkung des <i>MTARC1</i> -KOs auf die Lipidakkumulation in der Zellkultur	83
4.4.3	Auswirkung des <i>MTARC1</i> -KOs auf die Toleranz gegenüber Substanzen im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel	86
5	Diskussion und Ausblick	89
5.1	Untersuchung der Substratspezifität muriner und humaner mARC-Proteine	89
5.2	Auswirkung des <i>MTARC1</i>-KOs auf HEK-293T Zellen	93
5.3	Auswirkung eines <i>MTARC</i>-KOs auf den Lipidstoffwechsel	100
6	Literaturverzeichnis.....	112
7	Anhang.....	128
7.1	Western Blot – Ladekontrollen.....	128
7.1.1	<i>MTARC1</i> -KO Mäuse	128
7.1.2	<i>MTARC2</i> -KO Mäuse	130

7.1.3	Leber, Niere, Lunge von WT Mäusen	131
7.1.4	HEK-293T <i>MTARC1</i> ^{-/-} und WT Zellen.....	132
7.1.5	Humanes Fettgewebe WT und A165T Variante	133
7.2	N-reduktive Aktivität unterschiedlicher muriner Organe	135
7.3	Sequenzierungsergebnisse.....	136
7.4	Einfluss von DMSO als Lösungsvermittler auf die Zellviabilität.....	140
7.5	Ermittlung der optimalen Konzentration mittels Zellviabilitäts-Assay..	141
7.6	Genexpressionsdaten.....	142
7.7	Charakterisierung anatomischer Merkmale der <i>MTARC2</i>-KO Mäuse....	146
 Erklärung zu §8 der Promotionsordnung.....		147
 Danksagung		148
 Lebenslauf.....		150
 Zusammenfassung		151
 Abstract		152

Abkürzungsverzeichnis

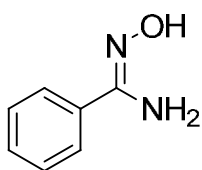
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ACN	Acetonitril
ACOX	Acyl-CoA-Oxidase
ACS	Acetyl-CoA-Synthetase
ALT	Alanin-Aminotransferase
apoB100	Apolipoprotein B100
<i>Aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
<i>Aqua dem.</i>	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BAO	Benzamidoxim
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
C	Cytidin
Cas9	Caspase 9
CD36	Thrombozytenglykoprotein 4
CHREBP	<i>Carbohydrate Responsive Element Binding Protein</i>
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
CPT1A	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1A
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CYB5B	Cytochrom b ₅ B
CYB5R	NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Salin</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Em	Emission
EMMA	<i>European Mouse Mutant Archive</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ex	Extinktion
FABP1	Fettsäure-bindendes Protein 1
FAD	Flavinadenindinukleotid
FFA	Freie Fettsäuren
FAS	Fettsäure-Synthase
FATP	Fettsäure-Transporter
FBS	Fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
G	Guanosin
g	Gramm (m = milli, μ = mikro, n = nano)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
gp78	Glycoprotein 78
h	Stunden (<i>hours</i>)
HAP	6- <i>N</i> -Hydroxyadenin (6- <i>N</i> -Hydroxylaminopurin)
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HFD	Hochkalorische Diät (<i>High-Fat-Diet</i>)
Hg	Quecksilber
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
<i>i.v.</i>	intravenös
IgG	Immunglobulin G
IMPC	<i>International Mouse Phenotyping Consortium</i>
Kap.	Kapitel
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	<i>Knockout</i>
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
LPO	Lipidperoxide
M	Molar (mol/l; m = milli, μ = mikro, n = nano)
m	Meter (m = milli, μ = mikro, n = nano)
mARC	<i>Mitochondrial Amidoxime Reducing Component</i>

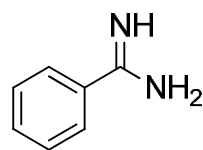
MDA	Malonyldialdehyd
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
Moco	Molybdäncofaktor
MOSC	Moco Sulfurase C-terminale Domäne
<i>MTARC</i>	<i>Mitochondrial Amidoxime Reducing Component</i> Genbezeichnung
N.D.	nicht detektierbar
n.s.	nicht signifikant
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NAFLD	nichtalkoholischen Fettlebererkrankung
ND	normokalorische Diät (<i>normal diet</i>)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonidet® P-40)
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	mit -1 multiplizierter Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
psi	<i>pound per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCAD	<i>short-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
sgRNA	<i>single guide</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

SOD	Superoxiddismutase
SREBP1c	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBH	Dithiobarbitursäure
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TMAO	Trimethylamin <i>N</i> -Oxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)ethylendiamin
U	Unit
US	Vereinigte Staaten (<i>United states</i>)
UV	Ultraviolett
VLCAD	<i>Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase</i>
VLDL	<i>Very-Low-Density-Lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp, <i>wildtype</i>
XO	Xanthinoxidase
γGT	γ-Glutamyltransferase
λ	Wellenlänge

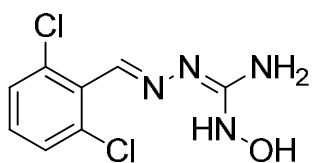
Strukturformelverzeichnis



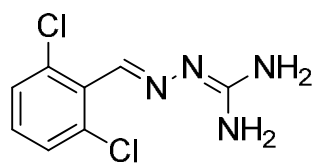
Benzamidoxim



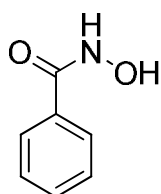
Benzamidin



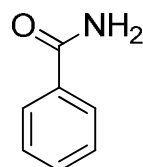
Guanoxabenz



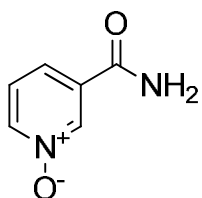
Guanabenz



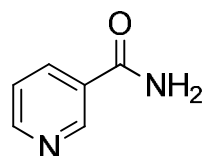
Benzhydroxamsäure



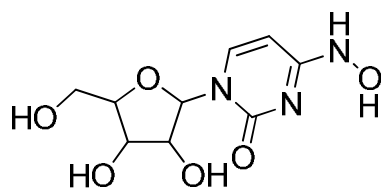
Benzamid



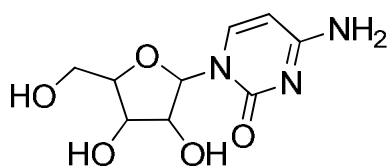
Nicotinamid-*N*-Oxid



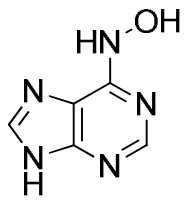
Nicotinamid



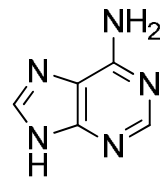
N-Hydroxy-Cytidin



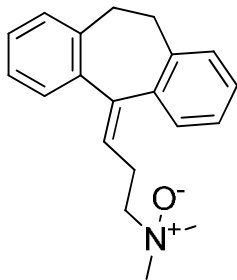
Cytidin



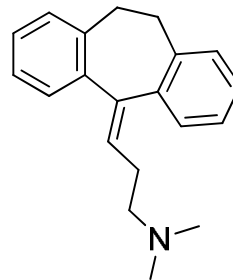
6-*N*-Hydroxyaminopurin (HAP)



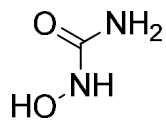
Adenin



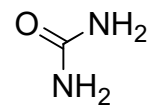
Amitriptylin-*N*-Oxid



Amitriptylin



Hydroxyharnstoff



Harnstoff

1 Einleitung

1.1 Adipositas und Stoffwechselerkrankungen

Drei große bevölkerungsbasierte Studien in den USA – ‚*The National Health and Nutrition Examination Survey*‘, ‚*The National Health Interview Survey*‘ und ‚*The Behavioral Risk Factor Surveillance System*‘ - zeigen, dass der durchschnittliche *Body-Mass-Index* (BMI) von 1970 bis 2005 von 25,5 kg/m² auf 28,5 kg/m² gestiegen ist. Die Prävalenz von Adipositas hat sich mehr als verdoppelt, sodass inzwischen mehr als ein Drittel der US-Bevölkerung betroffen ist (Flegal *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2009; Ogden *et al.*, 2015). Infolgedessen ist die Lebenserwartung in den Vereinigten Staaten zum ersten Mal gesunken (Xu *et al.*, 2008). Der BMI wurde von der *World Health Organisation* (WHO) definiert als das Verhältnis von Körpergewicht zu Körpergröße zum Quadrat. Er wird häufig herangezogen, um das Körpergewicht eines Menschen zu beurteilen. So gelten Menschen mit einem BMI < 18,5 kg/m² als untergewichtig, mit einem BMI von 18,5 kg/m² bis < 25 kg/m² als normalgewichtig, mit einem BMI von 25 kg/m² bis < 30 kg/m² als übergewichtig und mit einem BMI > 30 kg/m² als adipös (O'Rourke, 2018). Adipositas bedeutet für die Patienten nicht nur ein zu hohes Körpergewicht, sie stellt auch einen Risikofaktor für zahlreiche Erkrankungen, darunter Diabetes, Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Schlaganfall, Herzerkrankungen, Nierenerkrankungen, Krebs und Arthrose dar (Xu *et al.*, 2008; Field *et al.*, 2001). Diese Stoffwechselerkrankungen haben zur Folge, dass die Lebenserwartung bei übergewichtigen, adipösen und stark adipösen Untergruppen um bis zu 3, 6 bzw. 13 Jahre verkürzt ist (Finkelstein *et al.*, 2010). In Verbindung mit adipositasbedingten Stoffwechselerkrankungen ist das Metabolische Syndrom zu nennen (Alberti *et al.*, 2006).

1.1.1 Das Metabolische Syndrom

Ein metabolisches Syndrom nach der Definition der WHO liegt vor, wenn mindestens 3 der folgenden Merkmale bei einem Patienten vorliegen: Insulinresistenz, Dyslipidämie, Hypertonie, und/oder abdominale Adipositas (Alberti & Zimmet, 1998).

Eine Insulinresistenz ist definiert als ein pathophysiologischer Zustand, bei dem eine normale Insulinkonzentration keine ausreichende Insulinantwort in dem peripheren Zielgewebe wie Fettgewebe, Muskel und Leber hervorruft. Sie wird häufig anhand des Nüchternblutzuckers bestimmt, der bei einer manifestierten Insulinresistenz mindestens

110 mg/dl beträgt. Bei einer abdominalen Adipositas spricht man von einer Fettansammlung in der Bauchregion, die anhand des Taillenumfangs gemessen wird. Sie wird bei Männern definiert ab einem Taillenumfang von ≥ 94 cm, bei Frauen ≥ 80 cm. Bei einer Dyslipidämie handelt es sich um eine Stoffwechselstörung, die durch zu hohe Triglyceridwerte (> 150 mg/dl) zu geringem *High Density* Lipoprotein (HDL)-Cholesterin (< 35 mg/dl) und zu hohem *Low-Density*-Lipoprotein (LDL)-Cholesterin (> 110 mg/dl) definiert ist. Eine Hypertonie liegt vor, sobald der Patient bei wiederholten Messungen durchgängig Blutdruckwerte von 140/90 mm Hg oder darüber aufweist (Gill *et al.*, 2005; Alberti & Zimmet, 1998).

Die Definition des Metabolischen Syndroms 1998 hatte primär den Zweck, Patienten mit hohem Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen sowie einer Typ-2-Diabetes zu identifizieren (Alberti & Zimmet, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass sich mit dem Metabolischen Syndrom das Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 um das 5-fache und das Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung um das doppelte in den folgenden 5 bis 10 Jahren erhöht (Alberti *et al.*, 2009). So haben Patienten mit dem Metabolischen Syndrom im Vergleich zu Personen ohne dieses Syndrom ein 2- bis 4-fach erhöhtes Risiko einen Schlaganfall zu erleiden, ein 3- bis 4-fach erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt und ein doppelt so hohes Risiko an einem solchen Ereignis zu sterben (Alberti *et al.*, 2005). Dieses erhöhte Risiko ist dabei vollkommen unabhängig von einer Vorgeschichte mit kardiovaskulären Ereignissen (Olijhoek *et al.*, 2004). Nach Angaben der WHO sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache weltweit, die für schätzungsweise 18 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich sind (Go *et al.*, 2014). Die weltweite Prävalenz des Metabolischen Syndroms reicht von < 10 % bis zu 84 %, abhängig von der Region, der städtischen oder ländlichen Umgebung und der Zusammensetzung (Geschlecht, Alter, Rasse und ethnische Zugehörigkeit) der untersuchten Bevölkerung (Desroches & Lamarche, 2007; Kolovou *et al.*, 2007). In Ländern mit einer hohen Diabetes-Inzidenz, wie den Ländern des Pazifiks und des Nahen Osten, ist sogar jeder vierte Todesfall bei Erwachsenen im Alter zwischen 35 und 64 Jahren auf diese Erkrankung zurückzuführen. Aus diesem Grund stellt die Epidemie dieser Adipositas-assoziierten Stoffwechselerkrankungen eine unserer größten gesellschaftlichen Herausforderungen dar.

1.1.2 Lebererkrankungen

Die Leber spielt eine Schlüsselrolle im Glucose- und Lipidstoffwechsel, daher überrascht es nicht, dass Lebererkrankungen ein Risiko und eine Begleiterscheinung vieler Stoffwechselkrankheiten sind (Targher *et al.*, 2010; Lallukka & Yki-Järvinen, 2016).

Im Blut zirkulierende Lipide in Form von LDL und *Very-Low-Density*-Lipoproteinen (VLDL) sowie ektopische Lipidakkumulationen in Leber und Skelettmuskulatur führen dazu, dass die Insulinwirkung in diesen Geweben behindert wird und eine Insulinresistenz entsteht (Biddinger *et al.*, 2008; Sachithanandan *et al.*, 2010; Samuel & Shulman, 2016; Savage, 2006; Savage *et al.*, 2007). Andersherum kann aber auch das Vorhandensein von Diabetes mellitus nachweislich das Risiko für Lebererkrankungen erhöhen (Raff *et al.*, 2015).

Die epidemiologische Verschiebung von Infektions- zu Stoffwechselerkrankungen als Mortalitätsursache in den letzten Jahrzehnten spiegelt sich auch in der sich wandelnden Epidemiologie der Lebererkrankungen wider. Impfstoffe und Therapien verhindern oder heilen heute viele Formen der Virushepatitis. Mittlerweile ist es die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), die eine schwere wirtschaftliche Belastung darstellen (Perumpail *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Younossi *et al.*, 2016a). Patienten mit einer hierdurch bedingten terminalen oder verschlechterten Lebererkrankung stellen mittlerweile die Hauptgruppe der Lebertransplantationspatienten dar. Damit haben sie die Hepatitis-C-Patienten überholt (Wong *et al.*, 2014; Mikolasevic *et al.*, 2018).

1.1.2.1 Fettlebererkrankungen

Die Fettleber, auch Steatose bezeichnet, ist definiert als eine Einlagerung von Lipiden (v.a. Triglyceriden) in den Hepatozyten mit einem Fettanteil von mehr als 5 % des Lebergewichts (Tannapfel *et al.*, 2010). Sie wird mit Adipositas assoziiert und umfasst eine Reihe von Pathologien wie nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH), Fibrose, Zirrhose, bis hin zu hepatozellulären Karzinomen (Abb.1.1) (Shimada *et al.*, 2002). Für die Diagnose müssen weitere Ursachen für eine Steatose ausgeschlossen werden. Andere Ursachen wären z.B. Virushepatitis, Autoimmunhepatitis, chronische Lebererkrankungen wie Morbus Wilson, Hämochromatose, cholestatische Lebererkrankungen, Lipodystrophie, Zöliakie, Cushing-Krankheit und einige Medikamente (Kortikosteroide, Methotrexat, Diltiazem, Oxaliplatin, Amiodaron, Isoniazid, hochaktive antiretrovirale Therapie, usw.) (Perumpail *et al.*, 2017). Auch übermäßiger Alkoholkonsum (Frauen: > 20 g/d, Männer > 30 g/d) stellt eine häufige Ursache für die Entwicklung einer Steatose dar, da die Leber beim Metabolismus von Alkohol eine zentrale Rolle spielt. Bei übermäßigem Alkoholkonsum kommt es zu einer pathophysiologischen Veränderung von Stoffwechselprozessen, wie z.B. einem verminderten Abbau von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA). Überschüssiges Acetyl-CoA führt dazu, dass die Fettsäuresynthese gesteigert wird. Dies hat zur Folge, dass rund 90 % aller Alkoholiker an einer Fettleber leiden (Teli *et al.*, 1995; Stickel *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1998).

Mit der steigenden Zahl von Personen mit Adipositas und Diabetes mellitus nimmt die Verbreitung der NAFLD zu, von der weltweit mehr als ein Viertel der Erwachsenen (Younossi *et al.*, 2016b) und 60 % der Diabetiker (Dai *et al.*, 2017) betroffen sind. Bei Menschen mit Adipositas steigt die Prävalenz sogar auf 90 % an (Machado *et al.*, 2006). Eine NASH bezeichnet einen Zustand, bei dem neben der Steatose entzündliche Infiltrate in den Leberläppchen nachweisbar sind und zusätzlich eine Leberzellschädigung in Form einer Ballonierung, Nekroapoptose mit oder ohne Fibrose vorliegt. Die Unfähigkeit schädigende Prozesse wie oxidativen Stress, Dysregulation der entfaltenen Proteinreaktion, welches zu Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) führt, Lipotoxizität und apoptotische Wege zu unterdrücken, führt dann zu einer weiteren Leberzellschädigung und einer progressiven Fibrose (Singal *et al.*, 2014). Unter einer Leberfibrose versteht man eine übermäßige Ansammlung von extrazellulären Matrixproteinen, v.a. Kollagen, die bei den meisten Arten von chronischen Lebererkrankungen auftritt (Tannapfel *et al.*, 2010). Bei 20 % der Patienten, die eine NASH entwickelten, resultiert diese in einer Leberzirrhose (MATTEONI *et al.*, 1999). Die Leberzirrhose ist eine chronische Erkrankung der Leber, bei der es durch entzündliche Prozesse und Kollagenablagerungen zu einer Zerstörung der Hepatozyten kommt. Bei kontinuierlicher Zerstörung wird die Leber kleiner, die Durchblutung gestört und die physiologische Funktion kann nicht aufrechterhalten werden (Tannapfel *et al.*, 2010).

Die häufigste Todesursache von Patienten mit einer Leberzirrhose stellt ein sich hieraus entwickeltes hepatozelluläres Karzinom dar (Shimada *et al.*, 2002; Singal *et al.*, 2014; Michelotti *et al.*, 2013) (Abb. 1.1). Das hepatozelluläre Karzinom ist eine maligne Neoplasie, die sich direkt aus den Hepatozyten entwickelt (Tannapfel *et al.*, 2010). Es ist die fünfthäufigste Krebsursache und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit. Neben einer Hepatitis-C-Infektion, gewinnt die NAFLD als Ursache zunehmend an Bedeutung (El-Serag & Rudolph, 2007).

NAFLD stehen nachweislich in einem direkten Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen (Ismail & Dumitraşcu, 2019). Die aufgeführten potentiellen Folgen einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung sowie ihre steigende Prävalenz machen die Identifizierung von Strategien zur Reduzierung der Leberlipide entscheidend. Durch die Reduktion zirkulierender LDL und die Steigerung von HDL erweitert sich der therapeutische Nutzen auf eine Verringerung des Risikos von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Min *et al.*, 2012). Derzeit sind Bewegung und Kalorieneinschränkung die einzigen zugelassenen verfügbaren Behandlungsoptionen für die NAFLD (Nascimbeni *et al.*, 2013). Diesen Interventionen, die zwar wirksam sind, wenn sie befolgt werden, steht aber eine schlechte Compliance gegenüber (Larson-Meyer *et al.*, 2008; Keating *et al.*, 2015).

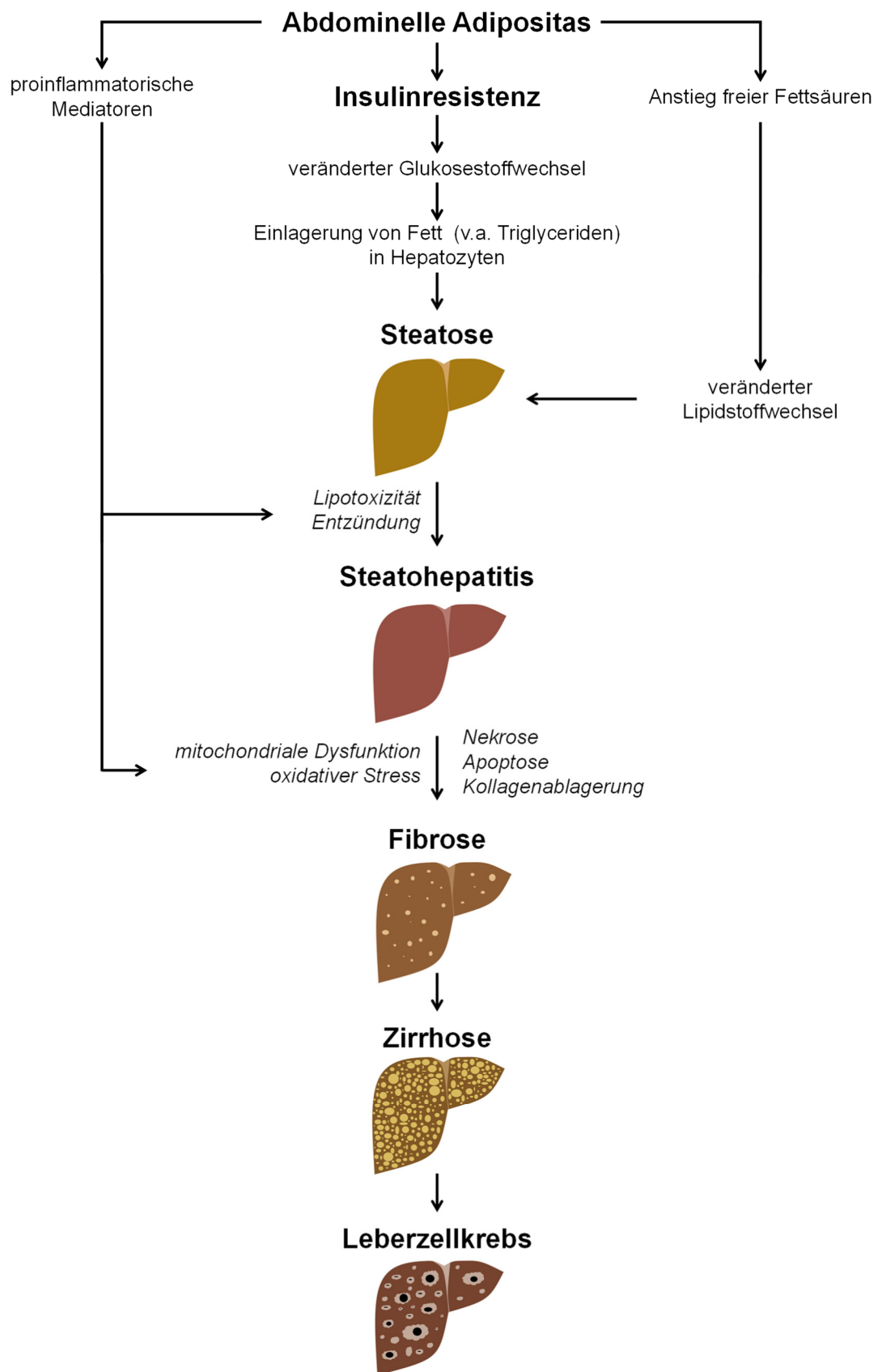


Abb. 1.1: Pathophysiologie der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (nach Rinella, 2015)

1.1.3 Oxidativer Stress und das Metabolische Syndrom

Das Robert Koch-Institut (RKI) definiert oxidativen Stress als einen Zustand, der durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen oxidativ wirksamen Molekülen (Oxidantien) und antioxidativ wirksamen Molekülen (Antioxidantien) im Organismus zugunsten der Ersteren charakterisiert ist. Anfallende reaktive Spezies können hierbei nicht ausreichend durch Antioxidantien neutralisiert werden (RKI, 2008). Zu den reaktiven Spezies zählt man die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS). Unter physiologischen Bedingungen wirken ROS und RNS als Signaltransduktionsmoleküle, die diverse Zellaktivitäten steuern und so Zellschutz bieten (Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Sies, 2017; Burdon & Rice-Evans, 1989). Prooxidantien sind biologische, chemische oder physikalische Noxen, exogene und endogene Moleküle, die die Bildung reaktiver Spezies (ROS, RNS) fördern (RKI, 2008). Bei einem leichten Ungleichgewicht zugunsten der Oxidantien kann ein antioxidatives System diesem entgegenwirken, wodurch die Zellen in ihren physiologischen Zustand zurückkehren. Bei pathologischen Zuständen (z.B. Entzündung, Atherosklerose, Ischämie/Reperfusionsverletzung, Diabetes mellitus) werden die Oxidantien-bildenden Enzyme im Gewebe aktiviert, um höhere Mengen an ROS und RNS zu produzieren. Dies führt in Verbindung mit der beeinträchtigten Aktivität der antioxidativen Systeme zur irreversiblen Oxidation von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren und damit zum Verlust essentieller Zellfunktionen und letztendlich zu einer Caspase-vermittelten Apoptose (Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2018a; Chiurchiù & Maccarrone, 2011).

ROS und RNS sind chemisch heterogene Moleküle, die radikale Spezies, wie Superoxidradikal ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikale ($\bullet OH$) und Stickstoffoxid ($\bullet NO$) und nichtradikale Spezies, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hypochlorige Säure ($HClO$) und Peroxynitrit ($ONOO^-$), umfassen. Sie werden kontinuierlich unter physiologischen Bedingungen in den Zellen produziert, insbesondere als Ergebnis der Elektronentransferprozesse in den Mitochondrien und der Aktivität verschiedener entzündungsbedingter Enzyme (NADPH-Oxidase, Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), Xanthinoxidase, Myeloperoxidase, Lipoxygenase, Cyclooxygenase) (Janssen-Heininger *et al.*, 2008). Zu den primären antioxidativen Enzymen in Geweben, gehören Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase und Katalase, die in der Lage sind, direkt oxidierende Spezies zu entgiften. Andere grundlegende antioxidative Enzyme wie Glutathion-Reduktase, Peroxiredoxine, Thioredoxin, Thioredoxin-Reduktase und Glutaredoxine tragen ebenfalls zum zellulären Schutz bei, indem sie oxidierte kritische Thiole in Schlüsselenzymen/Proteinen reduzieren und den geeigneten intrazellulären Redoxzustand aufrechterhalten. Das nicht-enzymatische System umfasst endogene Verbindungen wie

reduziertes Glutathion, Harnsäure, Bilirubin und Coeruloplasmin sowie ernährungsbedingte niedermolekulare Verbindungen wie Vitamine (Vitamine A, C und E), β -Carotin und Polyphenole (Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Lönn *et al.*, 2012; Spahis *et al.*, 2017). Die Produktion von ROS findet v.a. in den Mitochondrien, Mikrosomen und Peroxisomen statt (Weltman *et al.*, 1996; Weltman *et al.*, 1998; Grattagliano *et al.*, 1999) (Abb. 1.2). Die mitochondriale Atmungskette ist der primäre intrazelluläre Ort des Sauerstoffverbrauchs (Cadenas, 2018; Berg *et al.*, 2018). Hier wird durch die Cytochrom-c-Oxidase die Reduktion von molekularem Sauerstoff (O_2) zu Wasser katalysiert (Berg *et al.*, 2018). Hierbei kann es zu unvollständig reduzierten Sauerstoffspezies kommen, zu denen das $O_2^{\bullet-}$ sowie dessen Folgeprodukte H_2O_2 oder das $\bullet OH$ gehören (RKI, 2008). Eine Dysfunktion der Atmungskette kann also die ATP-Produktion senken, die ROS-Produktion erhöhen, die antioxidative Kapazität verringern und Apoptose induzieren (Stefano *et al.*, 2016; Cadenas, 2018). In den Peroxisomen, genauer der peroxisomalen β -Oxidation, wird der größte Teil des H_2O_2 produziert. Dies geschieht, wenn die mitochondriale β -Oxidation durch einen Fettsäureüberschuss gesättigt oder beeinträchtigt ist (Tsukamoto *et al.*, 1995).

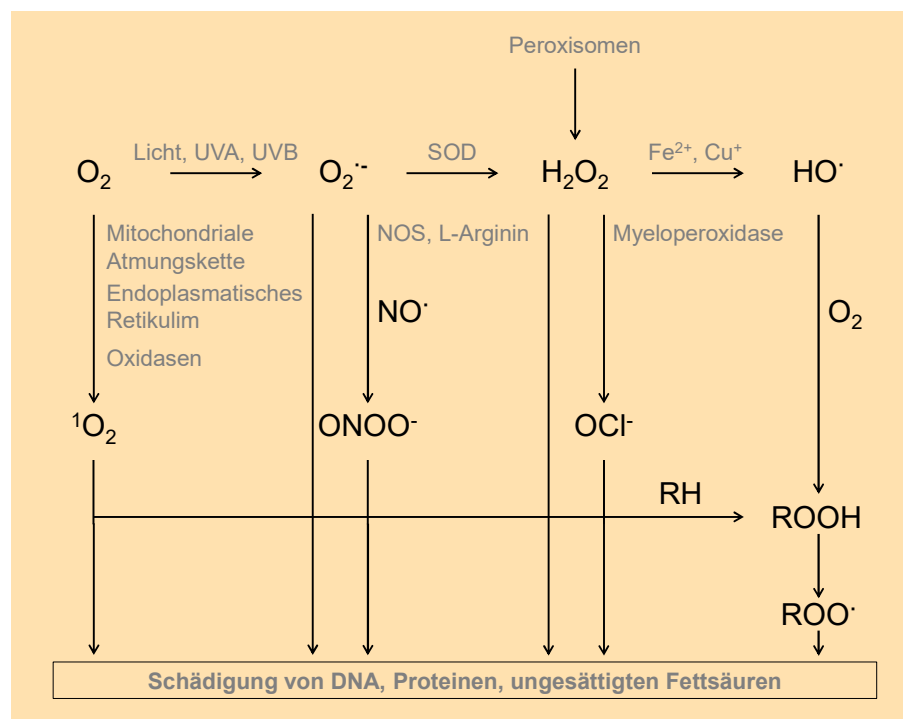


Abb. 1.2: Schematische Übersicht der Bildung und Vernetzung von ROS und RNS (nach RKI, 2008).

1O_2 Singulett-Sauerstoff; $O_2^{\bullet-}$ Superoxidradikal; NO^{\bullet} Stickstoffmonoxid; $ONOO^{\bullet-}$ Peroxynitrit; HO^{\bullet} Hydroxylradikal; H_2O_2 Wasserstoffperoxid; RH ungesättigte Fettsäuren; ROO^{\bullet} Lipidperoxylradikal; $ROOH$ Lipidhydroperoxid; SOD Superoxiddismutase.

Eine Reihe von Studien, sowohl im Menschen - als auch in Tiermodellen, haben ergeben, dass die meisten mit dem Metabolischen Syndrom assoziierten Krankheiten, wie Adipositas, Insulinresistenz, Hypertonie, Dyslipidämie, NAFLD und Diabetes mellitus, mit einer erhöhten Bildung von ROS und RNS sowie einem verminderten antioxidativen Potenzial einhergehen (Rani *et al.*, 2016; Spahis *et al.*, 2017). Es wurde berichtet, dass die Akkumulation von freiem Cholesterin, freien Fettsäuren (FFA), oxidiertem LDL, glykiertem HDL sowie die Freisetzung von Adipokinen zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit hoher ROS-Produktion führt (Furukawa *et al.*, 2004; Augé *et al.*, 2004; Puddu *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2009; Roy Chowdhury *et al.*, 2010; Shen, 2012; Stefano *et al.*, 2016). Erhöhte Mengen oxidierter Proteine sowie Lipidperoxidsprodukte wurden zusammen mit verminderten Aktivitäten mitochondrialer antioxidativer Enzyme (SOD und Glutathionperoxidase) in Fettgewebe von adipösen Patienten gemessen (Chattopadhyay *et al.*, 2015). Cheng und Almeida erklären, dass eine mitochondriale Dysfunktion ein frühes pathophysiologisches Ereignis bei der Entwicklung von Insulinresistenz und Adipositas darstellt (2014). Eine mitochondriale Dysfunktion führt zur Aktivierung von Stresswegen, die die zelluläre Sensitivität gegenüber Insulin reduzieren und so den Nährstoffeinstrom begrenzen. Chronisch entwickelt sich in Organen, wie der Leber und dem Skelettmuskel, eine Insulinresistenz mit nachfolgender Hyperinsulinämie (Matsuzawa-Nagata *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Martin & McGee, 2014).

Hohe Spiegel von FFA und Glucose im Plasma sind nicht nur mit einer Verschlimmerung der Adipositas verbunden (O'Keefe & Bell, 2007; Marzetti *et al.*, 2009), sondern steigern darüber hinaus die Bildung und Freisetzung von ROS und RNS in endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen sowie im Fettgewebe (Haffner & Taegtmeyer, 2003; Matsuda & Shimomura, 2013). Dies geschieht unter anderem, indem sie die NADPH-Oxidase stimulieren und die Aktivität der antioxidativen Enzyme herabsetzen (Furukawa *et al.*, 2004). Ein durch freie Fettsäuren im Plasma vermittelter Anstieg der ROS steht in Zusammenhang mit Hypertonie (Spahis *et al.*, 2017). Außerdem kann es zu einer systemischen Entzündungsreaktion kommen, die ebenfalls zum kardiovaskulären Risiko beiträgt (Otani, 2011). Gleichmaßen geht, wie bereits oben erwähnt, auch die Progression einer Fettleber mit der Unfähigkeit ROS zu unterdrücken einher. Letztendlich kann es dann zu einer Fibrose, Zirrhose und der Ausbildung eines Leberzellkarzinoms kommen (Matteoni *et al.*, 1999).

1.2 Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente mARC

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC) wurde 2006 als ein bis dahin unbekanntes molybdänhaltiges Protein in der äußeren mitochondrialen Membran entdeckt und identifiziert (Havemeyer *et al.*, 2006). Alle bisher untersuchten Säugetiergenome enthalten zwei mARC-Gene: *MTARC1* und *MTARC2*. Die von diesen Genen kodierten Proteine heißen mARC1 und mARC2 und stellen mit 37 kDa die leichteste und einfachste Form der eukaryotischen Molybdän-Enzyme dar, da sie nur den Molybdän-Cofaktor (Moco) binden. Weitere Molybdoenzyme sind die Sulfitoxidase, Xanthinoxidoreduktase und die Aldehydoxidase. mARC ist somit das vierte bisher bekannte menschliche Molybdoenzym. In Gegenwart von NADH üben alle mARC-Proteine zusammen mit den beiden mitochondrialen Elektronentransportproteinen Cytochrom b_5 B (CYB5B) und der Cytochrom b_5 -Reduktase Isoform 3 (CYB5R3) eine *N*-reduktive Aktivität gegenüber *N*-oxygenierten Substraten aus (Plitzko *et al.*, 2016) (Abb: 1.3).

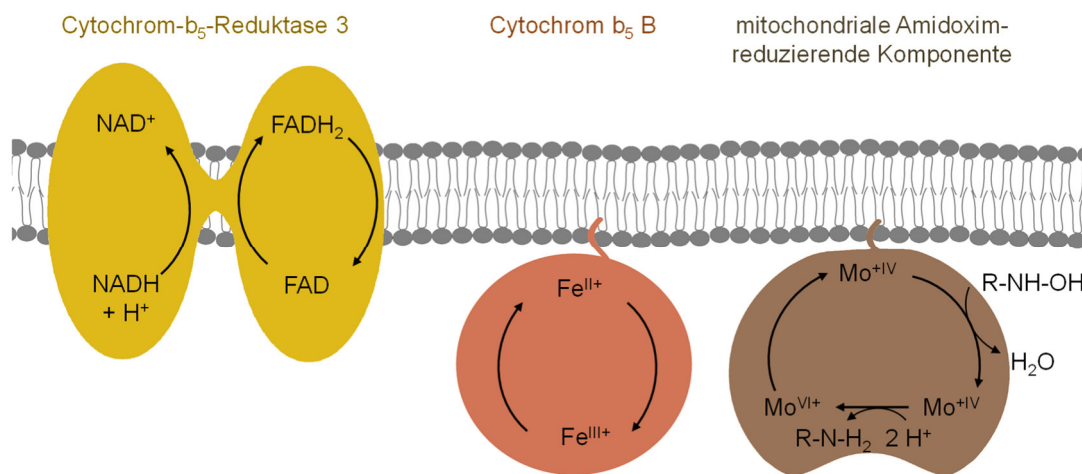


Abb. 1.3: Das *N*-reduktive Enzymsystem der äußeren mitochondrialen Membran (nach (Plitzko *et al.*, 2016; Elahian *et al.*, 2014; Havemeyer *et al.*, 2011)).

Die Elektronen werden durch die Oxidation von NADH bereitgestellt und über FAD auf die prosthetische Häm-Gruppe des CYB5B und schließlich auf den Moco von mARC übertragen. Hier wird die Reduktion katalysiert.

Die CYB5R3 ist ein Flavoenzym, d.h. sie katalysiert Reaktionen abhängig von ihrem Coenzym FAD. Man geht davon aus, dass die Elektronen von NADH über FAD auf CYB5B übertragen werden. Die prosthetische Gruppe des CYB5B ist Häm. Dieses ist für die Elektronenübertragung essentiell (Iyanagi *et al.*, 1984). An dieser Stelle ist *in vivo* die Isoform B beteiligt, die an der äußeren mitochondrialen Membran über Membrananker gebunden vorliegt (Elahian *et al.*, 2014; Plitzko *et al.*, 2013; Ito, 1980).

Eine weitere Lokalisation von mARC in Peroxisomen ist ebenfalls beschrieben (Islinger *et al.*, 2007; Wiese *et al.*, 2007). Interessanterweise ist eine Kolo-kalisation der beiden für die *N*-Reduktion essentiellen Reaktionspartner CYB5B und CYB5R3 in diesem Zellkompartiment nicht beschrieben. Es bleibt daher zu zeigen, ob die peroxisomal lokalisierten mARC-Proteine eine weitere, von der *N*-Reduktion unabhängige Funktion erfüllen.

1.2.1 *N*-reduktiver Metabolismus

Es ist allgemein anerkannt, dass das mARC-haltige Enzymsystem eine wichtige Rolle im *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus spielt. Es konnte gezeigt werden, dass ein breites Spektrum *N*-oxygenierter Verbindungen reduziert werden kann. Hierzu gehören unter anderem Amidoxime, Oxime, *N*-Hydroxysulfonamide, *N*-Hydroxy-Amidinohydrazone, *N*-Oxide, Hydroxylamine, Hydroxyharnstoff und Hydroxamsäuren (Gruenewald *et al.*, 2008; Bauch *et al.*, 2015; Clement & Lopian, 2003; Jakobs *et al.*, 2014a; Havemeyer *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2018; Ott *et al.*, 2014a; Ginsel *et al.*, 2018). Diese funktionellen Gruppen können sowohl essentielle Bestandteile vieler Arzneistoffe sein als auch im Rahmen der Biotransformation durch Cytochrom P450-katalysierte Biotransformationsprozesse eingeführt werden (el-Ghomari & Gorrod, 1987). Viele dieser gebildeten Metabolite sind von hoher toxikologischer Relevanz (Gonzalez, 2005). Auch kleine anorganischen Molekülen, so wie Hydroxylamin, Hydroxyharnstoff, Nitrit und Nitrat, werden durch das mARC-haltige Enzymsystem reduziert (Indorf *et al.*, 2020a; Sparacino-Watkins *et al.*, 2014).

Pharmakokinetisch kann die *N*-Reduktion genutzt werden, um die Bioverfügbarkeit von stark basische „Wirkstoffe“, die aufgrund ihrer Amidin- oder Guanidin-Struktur bei einem physiologischen pH-Wert überwiegend protoniert vorliegen und daher nicht ausreichend resorbiert werden, zu verbessern (Clement, 2002).

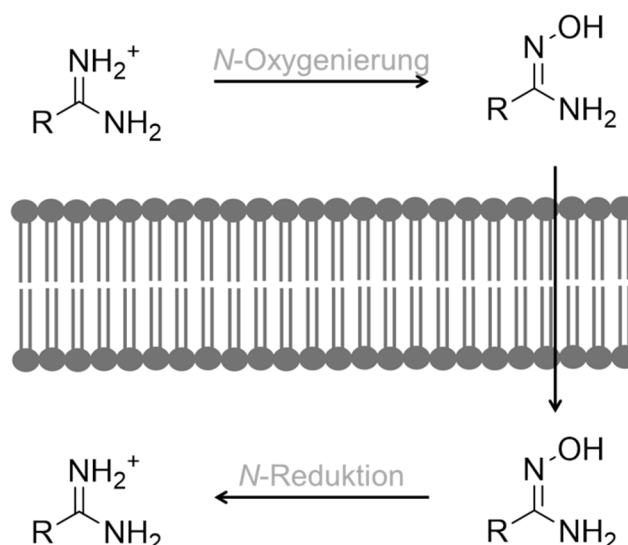


Abb.1.4: Prodrug-Prinzip anhand eines Amidoxims. Das Amidin stellt die Wirkform dar. Durch die hohe Basizität liegt es bei physiologischem pH geladen vor und hat dadurch, bei einer peroralen Gabe, eine schlechte Bioverfügbarkeit. Durch die Substitution mit einer Hydroxygruppe wird die Basizität vermindert, sodass der nun überwiegend ungeladen vorliegende Wirkstoff Biomembranen passieren kann und intrazellulär dann durch das *N*-reduktive Enzymsystem in die Wirkform überführt wird.

Entsprechende *N*-hydroxylierte Strukturen sogenannter *Prodrugs* liegen dann mit einem pK_s von 4-5 bei physiologischem pH überwiegend ungeladen vor und können so im Gastrointestinaltrakt resorbiert werden (Clement, 2002). Ein *Prodrug* stellt eine inaktive bzw. weniger aktive Form eines Wirkstoffes dar, die erst durch den Metabolismus im Organismus in die aktive Form überführt wird.

Als Beispiele für die Anwendung dieses Prinzips sind die Amidoxim-*Prodrugs* Ximelagatran (Gustafsson *et al.*, 2001) und Upamostat® (Froiep *et al.*, 2013) sowie das Antiprotozoikum Pentamidin (Clement & Raether, 1985) und das Guanidin-*Prodrug* Guanoxabenz (Clement *et al.*, 2005) zu nennen.

1.2.2 mARC1 und mARC2

Wie bereits erwähnt, liegen zwei paraloge Formen mARC1 und mARC2 vor, die durch die beiden Gene *MTARC1* und *MTRAC2* exprimiert werden. Im humanen sowie murinen Genom befinden sich beide Gene in Tandemorientierung auf Chromosom 1 (Gruenewald *et al.*, 2008; Wahl *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit verwendeten Begriffe ‚Orthologie‘ und ‚Paralogie‘ beziehen sich auf die Definition nach Fitch, nach der ‚Orthologe‘ Gene sind, die durch Speziation verwandt sind, während ‚Paraloge‘ durch Genduplikation entstanden sind (1970).

Mit humanen rekombinanten Enzymen konnte gezeigt werden, dass beide mARC-Proteine *in vitro* *N*-hydroxylierte Verbindungen reduzieren. Hierbei konnten jedoch auch Substrate identifiziert werden, die eine ausgeprägte Präferenz für eines der beiden mARC-Paraloga zeigen: *N*-Oxide, wie Nicotinamid-*N*-Oxid, Amitriptylin-*N*-Oxid oder Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO), werden ausschließlich von mARC1, nicht aber von mARC2 reduziert (Jakobs *et al.*, 2014a; Schneider *et al.*, 2018). Auch für Benzhydroxamsäure zeigt rekombinantes mARC1 eine mehr als 4-fach höhere Umsetzungsrate im Vergleich zu mARC2 (Ginsel *et al.*, 2018). Das Zytostatikum *N*-Hydroxyharnstoff wird ebenfalls mit sehr hohen Umsetzungsraten von mARC1, nicht aber von mARC2 abgebaut. Es wird diskutiert, ob der rasche Metabolismus durch mARC ein Grund dafür ist, dass dieses Zytostatikum in recht hohen Dosen verabreicht werden muss (Indorf *et al.*, 2020a). Der toxische Hydroxylamin-Metabolit des Sulfamethoxazol wird hingegen vorwiegend durch humanes mARC2 umgesetzt (Ott *et al.*, 2014a). Diese Beobachtungen deuten auf strukturelle Unterschiede der aktiven Zentren der beiden Enzyme hin.

Die Expression der beiden Molybdoproteine ist nicht gleich stark ausgeprägt, vielmehr gibt es meist eine paraloge Form, die in einer Spezies dominant exprimiert wird, wohingegen die zweite Form in vergleichsweise geringen Mengen vorliegt. So ist in den meisten humanen Geweben (z.B. Fettgewebe, Schilddrüse, Leber) und Zelllinien (z.B. HEK-293) die Expression von mARC1 deutlich erhöht während in murinen Geweben (z.B. Leber, Niere) und Zelllinien (z.B. 3T3-L1-Adipozyten) die mARC2-Expression überwiegt (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.13 – 7.16) (Wu *et al.*, 2016; Neve *et al.*, 2015).

Die speziesübergreifende Nomenklatur von „mARC1“ und „mARC2“ basiert lediglich auf Sequenzalignment zu den humanen Proteinen und könnte daher fehlerbehaftet sein. Ausführliche Studien zur Phylogenie und Orthologie fehlen ebenso wie funktionelle Unterschiede der beiden Proteine. Es ist somit denkbar, dass die abweichende Expression durch eine fehlerhafte Bezeichnung der Proteine zustande kommt.

Obwohl der *N*-reduktive Metabolismus ausgiebig untersucht wurde und die physiologische Funktion von mARC schon lange Gegenstand der Forschung ist, ist sie noch weitestgehend ungeklärt. Als potentielle endogene Substrate werden derzeit die Stickstoffmonoxid-Vorstufe *N*-Hydroxy-L-Arginin (Kotthaus *et al.*, 2011), Nitrit (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014) und der physiologische Metabolit Trimethylamin-*N*-Oxid (Schneider *et al.*, 2018) diskutiert. Viele Studien weisen auf eine Beteiligung am Lipidstoffwechsel (Jakobs *et al.*, 2014b; Neve *et al.*, 2015; Luukkonen *et al.*, 2020; Emdin *et al.*, 2020) sowie auf eine detoxifizierende Funktion von mARC hin (Krompholz *et al.*, 2012). Bislang ist nicht bekannt, ob beide Proteine ausschließlich am

reduktiven Metabolismus beteiligt sind oder ob eines (oder beide) zusätzliche Funktionen haben.

1.2.3 mARC im Energiestoffwechsel

Bereits 2007 konnte eine Verbindung zwischen mARC und Diabetes mellitus Typ 2 gezeigt werden. So wurde gesehen, dass in einem Typ-2-Diabetes Tiermodell die Expression von mARC2 erhöht ist (Malik *et al.*, 2007). 2010 wurde von Chen *et al.* eine Variation des humanen *MTARC2*-Gens entdeckt, die mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 1 und 2 einhergeht (2010). 2010 gab es erste Hinweise auf eine Verknüpfung mit dem Lipidstoffwechsel. Teslovich *et al.* zeigten einen SNP im *MTARC1*-Locus, der mit veränderten Plasmakonzentrationen für Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin im Menschen einhergeht (2010). Newton *et al.* und Neve *et al.* konnten unabhängig voneinander eine gesteigerte Expression von mARC2 bei der Differenzierung und Reifung muriner 3T3-L1-Adipozyten zeigen. Interessanterweise ändern sich die Expressionslevel von CYB5B und CYB5R3 nicht mit der Differenzierung (2012; 2011). 2014 konnten Jakobs *et al.* hieran anknüpfen und zeigen, dass in einem Mausmodell Nahrungskarenz zu einer Herunterregulation des *N*-reduktiven Systems führt, wohingegen hochfettthaltige Diäten zur Induktion von murinen mARC2 und *N*-reduktiver Aktivität führt. Diese Trends waren besonders bei jüngeren Tieren, die noch Fettdepots ausbildeten, zu erkennen (2014b). Ebenfalls 2014 wurde beobachtet, dass *MTRAC2*-mRNA mit Fettleibigkeit bei Schweinen in Verbindung steht (Kogelman *et al.*, 2014). 2015 wurde dann beim Menschen gezeigt, dass die hepatischen mARC2-Spiegel mit dem Ernährungsstatus korrelieren, wobei eine Diät mit Kalorienrestriktion zu niedrigeren mARC2-Spiegeln führten (Neve *et al.*, 2015). Ein weiterer und eindeutiger Zusammenhang konnte dann anhand der *MTARC2-Knockout* (KO) Maus gesehen werden. Eine Reihe von Mausmutantenlinien wurden bereits hergestellt und in Hochdurchsatz-Screenings phänotypisiert. Neben einem erhöhten Schreckreflex und einer verminderten Präpulshehmung war ein vermindertes Körpergewicht ein deutliches und signifikantes Merkmal der KO Maus im Vergleich zu ihrem Wildtyp (WT) (Dickinson *et al.*, 2016).

Aktuell werden immer mehr Studien veröffentlicht, die diesen Zusammenhang unterstützen. Genomweite Assoziationsstudien wurden durchgeführt und ergaben, dass eine relativ häufige Mutation des *MTARC1*-Gens (rs2642438) mit einem verringerten Risiko für eine NAFLD assoziiert ist (Emdin *et al.*, 2020, Haas *et al.*, 2020). Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Punktmutation, bei der ein Alanin gegen ein Threonin ausgetauscht ist. Das dazugehörige Protein heißt A165T. Bei den Patienten, die diese

Mutation tragen, wurden darüber hinaus geringere Werte für Leberlipide, niedrigere Alanin-Aminotransferase (ALT)-Serumspiegel, Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterin-Spiegel nachgewiesen (Emdin *et al.*, 2020). Eine weitere genomweite Assoziationsstudie identifizierte eine Korrelation genau derselben *MTARC1*-Mutation mit einem verminderten Risiko für eine alkoholbedingte Leberzirrhose (Innes *et al.*, 2020). Haas *et al.* brachten diese Mutation mit hepatischer Steatose in Verbindung (2020). Miner *et al.* beschreiben, dass die Expression von *MTARC1* in Kupfferzellen von Patienten mit NALFD um das 4-fache erhöht ist (2020). Eine weitere Studie brachte *MTARC1* mit NASH in Verbindung (Parisinos *et al.*, 2020). Die A165T-Variante und weitere Varianten der mARC1- und mARC2-Proteine, die bei gesunden Kaukasiern vorkommen, wurden bereits 2014 von Ott *et al.* charakterisiert. Hierbei konnte für rekombinant hergestelltes A165T kein signifikanter Unterschied in der Benzamidoxim-Reduktion oder Sulfamethoxazol-Hydroxylamin-Reduktion gesehen werden. Dies ist ein erstes Indiz dafür, dass die *N*-Reduktion dieser Variante unbeeinflusst bleibt und der Phänotyp auf eine weitere, davon unabhängige Reaktion oder Interaktion zurückzuführen ist (2014b). Hudert *et al.* konnten durch Proteomik-Analysen keine veränderte Expression der mARC1-Variante in Leberbiopsie-Proben von Kindern mit NAFLD sehen (2020).

Weitere Studien zeigen einen Zusammenhang von mARC und Membranlipiden auf. Luukkonen *et al.* konnten höhere Konzentrationen von mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholinen bei Patienten mit der A165T Variante detektieren und damit eine protektive Wirkung dieser Variante gegen NAFLD (2020). Hudert *et al.* berichteten ebenfalls über Veränderungen der Phosphatidylcholine im Plasmalipidom (2020). Während diese neuen Erkenntnisse deutlich machen, dass mARC an Lipidstoffwechselprozessen beteiligt ist und eine offenbar protektive Wirkung auf NAFLD und weitere Lebererkrankungen hat, ist der genaue Mechanismus noch völlig unklar. Es bleibt zu zeigen, ob mARC hierbei auch an reduktiven Prozessen beteiligt ist oder ob ein ganz anderer Mechanismus zugrunde liegt.

Erwähnenswert und bemerkenswert ist hierbei auch, dass bei humanen Studien nach aktuellem Stand fast ausschließlich das *MTARC1*-Gen eine entscheidende Rolle im Lipidstoffwechsel spielt während es in Tierstudien in der Regel das *MTARC2*-Gen ist. Hier ist erneut zu sagen, dass eine genaue Zuordnung der Bezeichnung mARC1 und mARC2 in verschiedenen Spezies lediglich auf Sequenzalignment beruht und ein direkter Vergleich dadurch nicht zu machen ist. Es ist außerdem möglich, dass *MTARC1* in genomweiten Assoziationsstudien als relevant identifiziert wird, weil dieses Enzym beim Menschen das dominant exprimierte ist, während die starken phänotypischen Veränderungen, die mit einem *MTARC2*-KO im Mausmodell assoziiert sind, darauf zurückzuführen sind, dass mARC2 in Mäusen häufiger vorkommt.

Zwei weitere endogene Substrate sind ebenfalls in der Diskussion und damit einhergehend eine Beteiligung von mARC an kardiovaskulären Vorgängen. Zum einem konnten Schneider *et al.* eine Reduktion des Metaboliten TMAO zu Trimethylamin (TMA) durch das mARC-haltige Enzymsystem detektieren (2018). TMA entsteht bei dem Abbau von Phosphatidylcholin und cholinhaltigen Lebensmitteln durch Bakterien im Gastrointestinaltrakt. Es wird absorbiert und in der Leber durch flavinhaltige Monooxygenasen (FMOs) zu TMAO oxidiert. Dieses gebildete TMAO weist proatherosklerotische Effekte auf und trägt damit einem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei (Wang *et al.*, 2011). Zum anderen wurde von Sparacino-Watkins *et al.* die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Nitrit unter anaeroben Bedingungen beschrieben (2014). Stickstoffmonoxid wirkt physiologisch als Vasodilatator und wird von intakten Endothelzellen sezerniert (Furchgott *et al.*, 1984). Bei einer endothelialen Dysfunktion wird diese NO-Freisetzung gestört und es kommt zu einer Beeinträchtigung der endothelgesteuerten Vasodilatation. Zudem entsteht ein proinflammatorisches und prokoagulatorisches Milieu, welches ebenfalls der Progression von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beiträgt (Hadi *et al.*, 2005; Moncada & Higgs, 2006). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass mARC in Verbindung mit CYB5B und der CYB5R den NO-Vorläufer *N*^ω-Hydroxy-L-Arginin (NOHA) zu L-Arginin reduziert (Kotthaus *et al.*, 2011). NOHA ist ein Intermediat, welches aus Arginin mittels NO-Synthase (NOS) gebildet wird. Die NOS katalysiert anschließend die Reaktion von NOHA zu NO und Citrullin. NOHA ist jedoch nicht nur ein Intermediat, sondern reguliert die NO-Synthese über die Hemmung der Arginase. Diese konkurriert mit der NOS um Arginin. Somit ist mARC möglicherweise ein Regulator der NO-Synthese.

1.2.4 mARC als detoxifizierendes Enzym

Neben der Beteiligung an Stoffwechselprozessen wird seit langem auch über die Teilnahme von mARC an detoxifizierenden Prozessen diskutiert.

2008 ergaben erste Studien von Kozmin *et al.*, dass Mutationen der prokaryotischen MOSC-Proteine YiiM und YcbX, die als prokaryotische mARC Analoga gelten und ebenfalls am *N*-reduktiven Metabolismus beteiligt sind, zu Aktivitätseinbußen und erhöhter Sensitivität gegenüber *N*-hydroxylierten Basenanaloga führen (2008). Diese *N*-hydroxylierten Nukleobasen haben sich als mutagen für prokaryotische und eukaryotische Zellen erwiesen (Khromov-Borisov, 1997; Negishi *et al.*, 1994). Sie können, nach Umwandlung in die entsprechenden Nukleosidtriphosphate, Replikationsfehler durch tautomere Übergangszustände sowie Inkorporationsfehler durch Fehlpaarung induzieren (Brovarets' & Hovorun, 2019). 2011 wurde von Mikula *et al.* eine verminderte Expression

von mARC2 in humanen Kolonkarzinomzellen beschrieben (2011). 2012 wurde an die Ergebnisse von Kozmin *et al.* angeknüpft. Krompholz *et al.* konnten im rekombinanten Enzymsystem zeigen, dass beide mARC-Enzyme an der Detoxifizierung von mutagenen *N*-hydroxylierten Basenanaloga zu ihren entsprechenden Nukleobasen bzw. Nukleosiden beteiligt sind (2012). Plitzko *et al.* konnten hierauf aufbauen und mittels siRNA-vermittelten mARC2-*Knockdown* (KD) Studien auch im komplexen zellulären System eine erhöhte Sensitivität von HeLa Zellen gegenüber *N*-Hydroxyaminopurin (HAP) zeigen. Eine für mARC2 beschriebene HAP-induzierte Apoptose konnte für mARC1 nicht beobachtet werden (2015). Es wird vermutet, dass die Entstehung dieser mutagenen Verbindung auf die Monooxygenase Cytochrom P450 (CYP) zurückzuführen ist, die auch die Oxidation vieler Xenobiotika katalysiert (Clement & Kunze, 1990). Die dadurch entstehenden Metabolite haben zum Teil ebenfalls eine mutagene bzw. toxische Wirkung (z.B. Sulfamethoxazol-Hydroxylamin) (Ott *et al.*, 2014a). mARC reagiert also als Counterpart von CYP.

2018 wurde eine Studie von Liu *et al.* veröffentlicht, bei der die Expression von *Enhancer*-RNA von *MTARC1* mit Blasenkrebs assoziiert ist. So sehen sie eine deutliche Steigerung der Expression sowohl *in cellulo* als auch *in vivo* und diskutieren über mARC1 als einen Biomarker für Blasenkrebs (2018). In diesem Zusammenhang ist außerdem eine aktuelle Studie zu erwähnen, bei der eine Beteiligung von mARC2 am hepatozellulären Karzinom beschrieben wird. Wu *et al.* fanden heraus, dass die Expression von mARC2 die Proliferation von hepatozellulären Karzinomzellen reduziert. Interessanterweise wird hierbei ein Mechanismus beschrieben, der nicht mit der *N*-reduktiven Aktivität von mARC assoziiert ist. mARC2 hemmt den Abbau des Tumorsuppressorproteins p27, indem es um die Bindung an die E3-Ubiquitin-Proteinligase RNF123 konkurriert (2020). Dieser Mechanismus stellt eine echte *Moonlighting*-Funktion dar.

Von *Moonlighting* wird gesprochen, sobald ein Protein mehr als eine physiologisch relevante biochemische oder biophysikalische Funktion erfüllt (Jeffery, 2018).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Seit der Identifizierung der mitochondrialen Amidoxim-reduzierende Komponente mARC 2006 konnten große Fortschritte bei der Charakterisierung dieses bis *dato* unbekannten Molybdoenzyms gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist und dort mit den Elektronentransportproteinen CYB5B und der CYB5R3 ein breites Spektrum oxygenierter Verbindungen und funktioneller Gruppen reduziert (Havemeyer *et al.*, 2006; Indorf *et al.*, 2020a; Plitzko *et al.*, 2016). Hierunter zählen neben Arzneistoffen auch einige Endobiotika, durch deren Identifizierung Aufschlüsse über die physiologische Funktion von mARC erlangt werden sollten. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass durch die Reduktion des Risikomarkers TMAO zu TMA eine Beteiligung von mARC an kardiovaskulären Ereignissen denkbar ist, mARC in der Lage ist, hydroxylierte mutagene Basenanloga zu detoxifizieren und mARC einen Beitrag in der NO-Homöostase leisten kann (Schneider *et al.*, 2018; Plitzko *et al.*, 2015; Kotthaus *et al.*, 2011). Einige Studien deuten auf eine Beteiligung an Lipidstoffwechselprozessen sowie der Progression von Krebs hin (Mikula *et al.*, 2011; Jakobs *et al.*, 2014b; Wu *et al.*, 2020; Innes *et al.*, 2020). Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche humane und murine biologische Testsysteme etabliert und genutzt werden, um die Funktion der orthologen und paralogen mARC-Proteine näher zu untersuchen.

Die speziesübergreifende Zuordnung und Nomenklatur der beiden Proteine als ‚mARC1‘ und ‚mARC2‘ beruht nach aktuellem Stand ausschließlich auf Sequenzalignment (Wahl *et al.*, 2010). *MTARC2* weist eine ca. 88 %ige, *MTARC1* eine fast 89 %ige Nukleotidsequenz-Ähnlichkeit zwischen Mensch und Maus auf (identische Sequenzen: *MTARC2*: 74% / *MTARC1*: 80%) (Altschul & Gish, 1996). Interessant ist hierbei, dass Expressionsanalysen auf mRNA und Proteinebene zeigen, dass je Spezies eines der beiden paralogen Proteine dominant exprimiert wird. Während in humanen Zellen eine überwiegende *MTARC1*-Expression beschrieben ist, weisen Mäuse hohe *MTARC2*- und niedrige *MTARC1*-Genexpressionslevel auf (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.13 – 7.16) (Wu *et al.*, 2016). Ein Ziel dieser Arbeit war es diese Nomenklatur funktionell zu überprüfen. *N*-reduktive Metabolismus-Studien stellen aktuell noch immer die Schlüsselkomponente bei der Charakterisierung des mARC-Enzymsystems dar. Hierfür standen humane und murine rekombinante Proteine sowie Gewebehomogenate mARC-defizienter Mäuse zur Verfügung, die es anhand ihrer Substratspezifität zu analysieren galt. Diese Charakterisierung kann zudem als Grundlage genutzt werden, um das murine Tiermodell in zukünftigen Studien zu verwenden und um Funktionen von mARC im Menschen zu imitieren.

Das mARC-defiziente Mausmodell sollte im Weiteren genutzt werden, um die Auswirkung eines *MTARC*-KOs auf den Lipidstoffwechsel zu untersuchen. In *in vivo* Studien sollte der Einfluss einer normokalorischen und einer hochkalorischen Diät auf mARC-defiziente Mäuse im Vergleich zu ihrem WT untersucht werden und die Mäuse anhand diagnostischer Merkmale wie Körpergewicht, Serumparameter und histologischer Schnitte analysiert werden. Auf diesem Weg sollte ein tieferer Einblick in die physiologische Funktion von mARC erhalten werden.

Aktuelle Studien beschreiben eine mARC1-Variante (A165T), die mit einem verringertem Risiko für eine alkoholische und nicht-alkoholische Fettlebererkrankung assoziiert ist (Innes *et al.*, 2020; Emdin *et al.*, 2020). Da diese Daten lediglich auf genomweiten Assoziationsstudien beruhen, bleibt ungeklärt, ob es sich bei dieser, zumindest in Anbetracht der Lebererkrankungen, günstigen mARC1-Variante um ein *nonsense* oder *missense* Protein handelt, das sowohl im Fettstoffwechsel als auch in der *N*-Reduktion keine, eine reduzierte oder sogar eine gesteigerte Aktivität aufweist. In Anbetracht des Mangels an pharmazeutischen Optionen bei der Behandlung der alkoholischen und nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung, ist die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten von hohem Interesse. Der zugrundeliegende Mechanismus, der Patienten mit der mARC1-Variante A165T vor der Progression einer solchen Erkrankung schützt, ist ein vielversprechender Ansatz bei der Entwicklung neuer Therapieansätze. In vorherigen Studien konnten Ott *et al.* im rekonstituierten System zeigen, dass die *N*-Reduktion von BAO und Sulfamethoxazol-Hydroxylamin durch diese Variante unbeeinflusst blieb (2014b). Dies ließe die Vermutung zu, dass der *N*-reduktive Metabolismus von der physiologischen Funktion im Fettstoffwechsel losgelöst ist. Der Beleg würde eine *Moonlighting*-Funktion von mARC befürworten. Dies galt es im Rahmen dieser Arbeit mit humanem Gewebe zu überprüfen.

Im Bereich der humanen Zellkultur war es in vergangenen Studien möglich, die Expression von mARC durch einen siRNA-bedingten KD zu vermindern. Die CRISPR/Cas9-vermittelte Genmanipulation stellt im Vergleich zu siRNA-Experimenten die deutlich effizientere Methode dar und sollte daher erstmalig in humanen Zellen zur Generierung eines stabilen *MTARC*-KOs angewendet werden (Wang *et al.*, 2018). Der Phänotyp der humanen *MTARC1*-KO Zellen sollte im direkten Vergleich zu WT-Zellen charakterisiert werden. Hierbei sollte nicht nur die Auswirkung auf den *N*-reduktiven Metabolismus untersucht werden, sondern auch ein besonderes Augenmerk auf Lipidstoffwechselprozesse sowie die Toleranz gegenüber toxischer, potenzieller mARC-Substrate gelegt werden.

2 Materialien und Geräte

2.1 Medien und Mediensupplemente

Medien und Mediensupplemente	Firma
DMEM	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
DMEM ohne Phenolrot	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
DPBS	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
FBS	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>HEPES Buffer Solution 1 M</i>	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamin	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
Lipofectamine® 2000	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
OptiMEM	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA (0,05%)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA

2.2 Reagenzien

Substanz	Firma
10x FastDigest Puffer	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt
10x Ligase-Puffer	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt
2,2,2-Trichlorethanol	Alfa Aesar, Ward Hill, USA
5X Q5 <i>Reaction Buffer</i>	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt
6- <i>N</i> -Hydroxyaminopurin	eigene Herstellung
Acetonitril, <i>hplc grade</i>	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Acrylamid Rotiphorese®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Amitriptylin	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Antimycin A	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
<i>Aqua bidest.</i>	houseigene Herstellung
Benzamid	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Benzamidin	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Benzamidoxim	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Benzhydroxamsäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Buthioninsulfoximin	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Cytidin	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dATP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dCTP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dGTP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dinatriummethylenediamintetraessigsäure- dihydrat (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dTTP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ECL-Reagenz	houseigene Herstellung
Fructose	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Glucose	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Guanabenz, G110-25MG	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Luminol-Natrium	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Methanol, 99%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NADH, 54YSC-HF	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>N</i> -Hydroxycytidin	von Dr. Schinazi (Veterans Affairs Medical Center, Decatur, USA) zur Verfügung gestellt

Nicotinamid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Nicotinamid- <i>N</i> -Oxid	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
<i>Nile Red</i>	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Nonidet P-40	BioChemica AppliChem GmbH, Darmstadt
Octylsulfonat	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Palmitat-BSA	Biomol GmbH, Hamburg
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Puromycin	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
Resazurin	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
TRIS-aminomethan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.3 Assay Kits

Assay Kit	Firma
<i>BCA-Protein-Assay Kit®</i>	Pierce, Rockford, USA
<i>BCA-Working Reagent®</i>	Pierce, Rockford, USA
<i>CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assays</i>	Promega, Fitchburg, USA
<i>Compat-Able Kit®</i>	Pierce, Rockford, USA
<i>DCFDA/H₂DCFDA – Cellular ROS Assay Kit®</i>	abcam, Cambridge, UK
<i>Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit®</i>	Merck, Darmstadt
<i>NucleoSpin® Gel and PCR clean up</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin® Plasmid DNA Purification</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>peqGOLD MicroSpin Tissue DNA Kit®</i>	VWR International, Pennsylvania, USA
<i>Urea Assay Kit®</i>	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim

2.4 Materialien

Material	Firma
24-Well-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
6-Well-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Mikrotiterplatten, schwarz, transparenter Boden	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Mikrotiterplatten, Stan- dard, F	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Cryovials, Cryo.s.™	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Falcon CELLSTAR® Tubes	greiner bio-one, Frickenhausen
Filter Tips, Biosphere®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
HPLC-Trennsäule, LiChrospher® 60 RP-select B, 5 µm, 125·4 mm	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
HPLC-Trennsäule, LiChrospher® 60 RP-select B, 5 µm, 250·4 mm	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
HPLC-Trennsäule, Pheno- menex® Gemini 5 µm, NX C18, 110 Å, 150·4,6 mm	Phenomenex Deutschland, Aschaffenburg
HPLC-Vorsäule, LiChroCART®, LiChrospher® 60 RP-select B, 5 µm	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
HPLC-Vorsäule, Phenomenex C18, 4·3,0 mm	Phenomenex Deutschland, Aschaffenburg
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Pipettenspitzen Biosphere®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen COMBITIPS®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg
Polyamidmembranfilter	Whatman, Dassel
Polypropylen Vial 700 µl	Restek® GmbH, Bad Homburg
PVDF-Membran, Hybond®-P	GE Healthcare Amersham, Chalfont St Giles, UK
Reaktionsgefäße 0,65 ml, 0,5 ml, 0,2 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Serologische Pipetten, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SpotChem II Kenshin-2 Objekt-trägern	Arkray, Kyoto, Japan
<i>Whatman® Paper</i>	GE Healthcare Amersham, Chalfont St Giles, UK
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

2.5 Oligonukleotide, Plasmide und Enzyme

Oligonukleotide, Primer und Enzyme	Firma
FastAP (Alkalische Phosphatase)	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt
kompetente <i>E. coli</i> (NEB® <i>Stable</i>)	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt
Ligase <i>mCherry</i>	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt von dem Arbeitskreis Prof. Schade zur Verfügung gestellt
Oligonukleotide	Merck, Darmstadt
Plasmid plentiCRISPRv2	Addgene, Watertown, USA
<i>Primer</i>	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
<i>Q5® High-Fidelity DNA Polymerase</i> (#M04915)	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt
Restriktionsenzym <i>EspI</i>	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt

2.6 Geräte und Softwares

Gerät und Softwares	Firma
Breeze 3.30 (Software)	Waters Corporation, Milford, USA
Canon EOS2000D	Canon Europa N.V., Amsterdam, Niederlande
<i>ChemoStar Touch ECL & Fluorescence Imager</i>	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
<i>ChemoStar Touch ECL & Fluorescence Imager</i>	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Digitales Schüttel-Trockenbad	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® Tetra Sys- tem	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA USA
<i>EZ Chemical Analyzer</i>	Arkray, Kyoto, Japan
Gefriertrocknung: CHRIST Alpha 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
HPLC-Geräte/-Zubehör	Waters GmbH, Eschborn
ImageXpress®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
KPG-Rührer IKA-RW 015/1	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Kühlzentrifuge Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mehrfachinkubationsständer, Metall, Platz für 8 x 10 0,2 ml-Eppendorfgefäße	eigene Herstellung
MetaXpress®	Molecular Devices, San José, USA
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
NanoPhotometer® P 300	Implen GmbH, München, Deutschland
PeqPower 300	VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Meter Schott CG840	Schott AG, Mainz
Pipetten Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten LLG Labware, Digi- tale Einkanal- Mikroliterpipetten	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim
Potter-Elvehjem-Homogeni- sator Kontes all glass Co. Dual® 21 (3 ml)	Kimble Chase Life Science and Research Products, Vineland, USA
Rüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Schüttelinkubator Elmi Sky Line Orbital Shaker DTS-4	ELMI SIA, Riga, Lettland
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
SigmaPlot 11 (Software)	Systat Software GmbH, Frankfurt
<i>Spark® Multimode Microplate Reader</i>	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Tischzentrifuge Hettich Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Vortexer <i>lab dancer</i>	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Vortexer Vortex-Genie 2 G560E	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY USA

Waage KERN EW2200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage Sartorius CP225D	Sartorius AG, Göttingen
Waters 1525 (Pumpe)	Waters Corporation, Milford, USA
Waters 2487 (Detektor)	Waters Corporation, Milford, USA
Waters 717plus (Autosampler)	Waters Corporation, Milford, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Group, Hanau

2.7 Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper

Antikörper	Firma
anti-COX4 Wirt: Kaninchen Art. Nr. AC0194	Elabscience; Houston, USA
anti-GAPDH Wirt: Kaninchen Art. Nr. AP9754c	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim
anti-Kaninchen-IgG-Antikörper; horseradish peroxidase (HRP)-gekoppelt Wirt: Ziege Art. Nr. 111-035-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
anti-mARC1 Wirt: Kaninchen Art. Nr. AP 9754	Abgent, San Diego, USA
anti-mARC2 Wirt: Kaninchen Art. Nr. HPA015085	Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Arbeiten: *Knockout* von *MTARC1* mittels CRISPR/Cas9

3.1.1 Vorarbeiten: *Target*-Auswahl, sgRNA-Design und Plasmid-Auswahl

Um einen stabilen Gen-*Knockout* von *MTARC1*, welches für die mARC1-Expression verantwortlich ist, in humanen Zellen zu erzeugen, wurde das Exon 2 von *MTARC1* und damit der codierende Bereich adressiert. Eine Sequenz im Anfangsbereich des Genoms zu adressieren wird deswegen empfohlen, um den hierbei induzierten *Frameshift* in seiner Auswirkung zu erhöhen. Zur Erzeugung eines Doppelstrangbruches wurde in dieser Arbeit der *Single-Cut*-Mechanismus verfolgt (Ran *et al.*, 2013).

Berücksichtigt wurden bei der Auswahl geeigneter sgRNA vor allem zwei Punkte: Zum einen musste, damit die Cas9 binden kann, unmittelbar am 5'-Ende der adressierten 20 Basenpaare (*Spacer*-Sequenz) eine sogenannte PAM-Sequenz (*Protospacer Adjacent Motif*) anschließen. Diese Sequenz besteht aus 3 Basen: einer beliebigen Base und zwei weiteren Guanin-Basen (5'-N-G-G), vorausgesetzt man bedient sich der Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*. Der Vorteil hierbei liegt darin, dass diese PAM-Sequenz nicht im bakteriellen Genom vorkommt, im humane Genom aber durchschnittlich alle 8-12 Basenpaare auftritt (Hsu *et al.*, 2013; Le Cong *et al.*, 2013). Zum anderen mussten *Off-Target*-Ereignisse minimiert werden, d.h. DNA-Strangbrüche und damit Mutationen an ungewollten Stellen im humanen Genom. Zur Ermittlung einer geeigneten Zielsequenz der sgRNA wurde ein online CRISPR Design *Tool* des Zhang Lab verwendet (Ran *et al.*, 2013). Dieses *Tool* ermittelt nach Eingabe der gesamten Exon-Sequenz mögliche *Target*-Sequenzen, die anhand eines „*Quality Score*“ und anhand von „*Off-Target-Sites*“ bewertet und eingeteilt werden.

Mithilfe dieses *Tools* wurden folgende Sequenz ausgewählt, die PAM-Sequenz ist unterstrichen:

Genomische Zielsequenz	5' GTTTTGGCTTGTGATCAACC <u>AGG</u> AGGG 3'
designte Zielsequenz (sense)	5' CACCGGTTTTGGCTTGTGATCAACC 3'
designte Zielsequenz (antisense)	5' AAACGGTTGATCACAAAGCCAAAACC 3'

Die genomische Zielsequenz wurde zusätzlich etwas modifiziert (grau). An das 5'-Ende wurde ein Guanin herangehängt, wodurch diese Sequenz vom U6 *Promoter* bevorzugt wird. Des Weiteren wurde ans 5'-Ende des *sense*-Stranges eine CACC-Sequenz und ans 5'-Ende des *antisense*-Stranges eine AAAC-Sequenz, sowie ans 3'-Ende ein Cytosin (Partner des Guanins) hinzugefügt. Diese Modifikation erleichtert den Einbau in die *Multiple Cloning Site* nach erfolgtem Restriktionsverdau (Ran *et al.*, 2013).

Diese designten Oligonukleotide wurden anschließend kommerziell erworben.

Als Plasmid für die Expression der sgRNA und von Cas9 wurde „plentiCRISPRv2“ verwendet. „plentiCRISPRv2“ trägt ein intaktes Gen für Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*. Diese Endonuklease erzeugt an dem Ort einen DNA-Doppelstrangbruch, der durch die sgRNA erkannt wird. Dieses Plasmid wird daher als Transferplasmid für den *Single-Cut* genutzt (Ran *et al.*, 2013).

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieses Plasmids ist eine sgRNA-Matrize, welche mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und die gewünschten Oligonukleotide inseriert werden können. Das Plasmid trägt zudem einen U6 *Promoter* direkt vor der sgRNA-Matrize. Dieser reguliert die Expression der Proteine und wird mit den entsprechenden *Primern* für die Sequenzierung und PCR der nach erfolgter Klonierung entstandenen Konstrukte genutzt. Ebenfalls enthält das Plasmid zur Selektion ein Ampicillin-Resistenz-Gen und für die Selektion der humanen Zellen ein Puromycin-Resistenzgen. Das Plasmid wurde als Glycerol-Stock in Stbl3-kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) geliefert.

Für den Restriktionsverdau wurde das Enzym „EspI“ verwendet. Die Klonierung erfolgte nach dem folgenden Protokoll.

3.1.2 Klonierung

Es wurde nach einem modifizierten Protokoll des Zhang Lab gearbeitet (Ran *et al.*, 2013). Zuerst wurden die Plasmide verdaut und dephosphoryliert.

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 µg	Plasmide
2 µl	<i>FastAP</i> (Alkalische Phosphatase)
3 µl	10x <i>FastDigest</i> Puffer
3 µl	Restriktionsenzym (Esp3I)
ad 30 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Die Bestandteile wurden gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Plasmide mittels *NucleoSpin® Gel and PCR clean up* gereinigt und die Konzentration mittels NanoPhotometer® P 300 bestimmt.

Parallel erfolgte die Phosphorylierung und *Annealing* der Oligonukleotide.

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl	Oligonukleotid <i>sense</i> (100 µM)
1 µl	Oligonukleotid <i>antisense</i> (100 µM)
1 µl	10x Ligationspuffer
6,5 µl	<i>Aqua bidest.</i>
0,5 µl	T4 Polynukleotidkinase

Der 10 µl-Ansatz wurde dann für 30 min bei 37 °C inkubiert, in Anschluss für 10 min bei 95 °C inkubiert und zum Schluss mit 3 °C/min heruntergekühlt auf 25 °C.

Nach einer 1:50-Verdünnung dieses Ansatzes erfolgte die Ligation.

Ligationsansatz:

100 ng	verdautes Plasmid
1 µl	verdünntes Oligopaar
1 µl	10x Ligase-Puffer
6 µl	<i>Aqua bidest.</i>
1 µl	Ligase

Die Bestandteile wurden gemischt und über Nacht bei 18 °C inkubiert.

3.1.3 Transformation und Selektion

Im Anschluss an die Klonierung wurden die Plasmide zur Vervielfältigung in kompetente *E. coli* (New England Biolabs® (NEB®) *Stable*) transformiert: 50 µl NEB® *Stable*-Suspension wurden mit 5 µl Ligations-Ansatz versetzt, für 10 min auf Eis, für 90 sec bei 42 °C und dann erneut für 2-3 min auf Eis gelagert. Nach Hinzufügen von 1 ml LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,0) wurde der Ansatz für 60 min bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agar-Platten (2 %) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden zuvor gegossen und enthielten zur Selektion 130 µg/ml Ampicillin. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die entstandenen Kolonien gepickt und in flüssigem LB Medium mit 130 µg/ml Ampicillin weitere 16-18 h bei 37°C vermehrt. Die Lyse der Bakterien und Isolierung der Plasmide erfolgte mittels *NucleoSpin® Plasmid*

DNA Purification. Die Konzentration der Plasmide wurde erneut mittels NanoPhotometer® P 300 bestimmt.

Zur Überprüfung, ob die Plasmide die entsprechenden *Inserts* enthielten, wurden diese zuerst mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Plasmide mit einer Bande bei ca. 1800 bp sequenziert. Dies erfolgte durch den Dienstleister Eurofins Scientific. Hierfür wurde ein Standard *U6 Promoter-Primer* verwendet.

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Zur Generierung eines stabilen *MTARC1*-KO (*MTARC1*^{-/-}) in humanen Zellen wurde die Zelllinie HEK-293T verwendet. HEK-293T Zellen sind das Transfektionsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5, die eine mutierte Version des SV40 *large* T-Antigens exprimieren und dadurch sehr effizient mit DNA zu transfizieren sind (Pear *et al.*, 1993). Darüber hinaus weisen HEK-293T Zellen eine deutlich höhere mARC1-Expression als eine mARC2-Expression auf (Plitzko *et al.*, 2013). HEK-293T Zellen wurden mittels SNP-Analyse verifiziert und als mykoplasmenfrei bestätigt.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte als adhärenter *Monolayer* in Kulturflaschen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit in 5 % CO₂. Es wurde folgendes Nährmedium verwendet: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) supplementiert mit 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS), 2 mM L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose. Die Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit vortemperiertem DPBS gewaschen und anschließend durch 5-minütige Inkubation mit vortemperiertem Trypsin/EDTA (0,05 %) von dem Kulturflaschenboden gelöst. Die Zellen wurden mit vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in Kulturmedium resuspendiert und im gewünschten Splitverhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Zelllinien wurden maximal 20 Passagen oder 2 Monate in Kultur gehalten. Kryokonserviert wurden die Zellen in einer Konzentration von 3 - 4 x 10⁶ Zellen/ml in gekühltem Einfriermedium mithilfe von Einfriercontainern, die mit einer konstanten Rate von 1 °C/min auf -80 °C herunterkühlen. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssig Stickstoff umgelagert.

Einfriermedium:

70 % DMEM mit 2 mM L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose

20 % FBS

10 % DMSO

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

3.2.3 Transfektion

Plasmide, die durch Sequenzierung nachweislich das *Insert* trugen, wurden in die Zellen transfiziert. Hierfür wurden die Zellen in 6-Well-Plates, in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/Well, ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und anschließend mit 2,5 ml 2 % FBS in DMEM überschichtet. Die 6-Well-Plate wurde zur Vorinkubation zurück in den Inkubator gestellt und in der Zwischenzeit der Transfektionsansatz hergestellt. Hierfür wurden zunächst die Plasmide auf 1 µg/µl verdünnt. In einem Eppi wurden 100 µl OptiMEM vorgelegt und mit 3 µl Transfektionsreagenz (Lipofectamine 2000®) versetzt. Dieser Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde 1 µl Plasmid-DNA hinzugegeben und erneut durch auf- und abpipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert, sodass ein Liposomen-DNA-Komplex entstand. Tröpfchenweise wurde der gesamte Transfektionsansatz über das Well gegeben und für weitere 6 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch Kulturmedium ersetzt und über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde ebenfalls ein Ansatz ohne DNA hergestellt und einer, welcher ein Plasmid für das fluoreszierende Protein *mCherry* enthielt.

3.2.4 Selektion

Am nächsten Tag wurde das Medium zur Selektion durch DMEM supplementiert mit 10 % FBS und 2,5 µg/ml Puromycin ersetzt. Die Zellen wurden 6 Tage in puromycinhaltigem Medium kultiviert, das Medium dabei jeden zweiten Tag erneuert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen mit vortemperiertem DPBS gewaschen und anschließend mit vortemperiertem Trypsin/EDTA (0,05 %) abgelöst. Das Trypsin wurden mit FBS-haltigem Kulturmedium inaktiviert und die Suspension bei 600 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und vereinzelt, indem sie auf 96-Well-Plates mit

0,5 Zellen/*Well* ausgesät wurden. Über zwei Wochen wurde mikroskopisch das Wachstum überprüft und die *Wells* verworfen, in denen bei Aussaat mehr als eine Zelle pro *Well* vorlag. Nach zwei Wochen wurden die einzelnen Kolonien von ausgewählten *Wells* in T25-Flaschen expandiert und schließlich in T75-Flaschen kultiviert. Ein Teil der Zellen wurden zum Sequenzieren aufbereitet, der andere Teil wie bereits beschrieben (vgl. 3.2.1) kryokonserviert.

3.2.5 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der eukaryotischen DNA wurden die adhärenenten Zellen zuerst mit vortemperiertem DPBS gewaschen und anschließend mit vortemperiertem Trypsin/EDTA (0,05 %) abgelöst. Das Trypsin wurden mit FBS-haltigem Kulturmedium inaktiviert und die Suspension bei 600 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden einem erneuten Waschschrift mit DPBS unterzogen und erneut zentrifugiert. Die DNA aus dem entstandenen Pellet wurde mit dem *peqGOLD MicroSpin Tissue DNA Kit*[®] isoliert, hierfür wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die relevante Region wurde mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den folgenden *Primern* erhalten: vorwärts 5'-CAAA-GATACAACAGTGTCTAATTG und rückwärts 5'-AATTGCATGACTATTCATTACAC.

Der PCR-Ansatz war wie folg zusammengesetzt:

2,5 µl	<i>Primer</i> vorwärts (10 µM)	
2,5 µl	<i>Primer</i> rückwärts (10 µM)	
10 – 20 µl	<i>DNA Template</i>	
0,5 µl	Q5 [®] <i>High-Fidelity</i> DNA Polymerase	
10 µl	5X Q5 <i>Reaction Buffer</i>	
1 µl	10 mM dNTPs:	1/10 dATP
		1/10 dTTP
		1/10 dCTP
		1/10 dGTP
ad 50 µl	<i>Aqua bidest.</i>	

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

	95 °C	10 min
30x	95 °C	30 sec
	55 °C	30 sec
	72 °C	2 min

langsam herunterkühlen auf 4 °C (1 °C/min).

Die Vektoren wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die PCR-Produkte anschließend durch einen Dienstleister sequenziert (Eurofins).

3.2.6 Gewinnung der zellulären Proteine

Zur Extraktion von zellulärem Gesamtprotein wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen vorsichtig einmal mit vortemperiertem DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05 %) abgelöst. Die Zellen wurden mit Kulturmedium resuspendiert, bei 600 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit DPBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 50-200 µl eisgekühltem NP-40 Lysepuffer versetzt. Die Lyse erfolgte dann durch 30-minütiges Schütteln bei 4 °C. Nicht-lösliche Zellbestandteile wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm vom Zelllysats abgetrennt und der Überstand direkt verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

Zusammensetzung NP-40 Lysisbuffer:

1 % (v/v) Nonidet P-40

150 mM NaCl

50 mM Tris, pH 8,0

Complete Protease Inhibitor Cocktail

3.2.7 Zellviabilitäts-Assays

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines Resazurin-Assays bzw. des *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assays* gemessen. Die optimale Zellzahl wurde mittels Zelltitration ermittelt.

3.2.7.1 Zelltitration

Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl für Viabilitäts-Assays und um je nach Auslesungs-Assay ein Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzsignal im linearen Bereich mit gutem

Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erhalten, wurde vorab eine Zelltitration durchgeführt. Als höchste Zellkonzentration wurden 10^5 Zellen/*Well* in eine 96-*Well*-Mikrotiterplatte ausgesät. Insgesamt 11 verschiedene Zellkonzentrationen wurden in einer seriellen 1:2-Verdünnungsreihe angesetzt und jeweils in 6 Kavitäten vorgelegt. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurden zusätzlich 6 Kavitäten mit reinem Kulturmedium versehen. Nach ca. 24 h Inkubation wurde die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay (vgl. 3.2.7.2) oder *CellTiter-Glo*® Assay (vgl. 3.2.7.3) quantifiziert.

Zur Überprüfung, ob DMSO, das zur Lösungsvermittlung hinzugesetzt wird, einen Einfluss auf die Zellviabilität hat, wurde die Hälfte der Kavitäten zusätzlich mit 1 % DMSO versetzt und die Zellviabilität wie beschrieben quantifiziert. Die Konzentration von 1 % DMSO im Endansatz wurde bei keinem Assay überschritten.

3.2.7.2 Resazurin

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde eine 0,01 %ige Resazurinelösung in DPBS hergestellt, steril filtriert und bei 2-8 °C lichtgeschützt gelagert. Die Resazurinelösung wurde dann in einer 1:10-Verdünnung auf die Zellen gegeben (96 *Well*-Plate: 90 µl Zellkulturmedium + 10 µl Resazurinelösung) und der Ansatz für 120 min bei 37 °C inkubiert. Für die Viabilitäts-Bestimmung wurde die Reduktion des Resazurins (blau, nichtfluoreszierend) zu Resorufin (pink, fluoreszierend) durch die viablen Zellen genutzt (O'Brien *et al.*, 2000). Die Konzentration des gebildeten Resorufin ist proportional zur Anzahl lebender Zellen und konnte fluorimetrisch gemessen werden ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$; *Spark*® *Multimode Microplate Reader*). Unter diesen Bedingungen lag für HEK-293T Zellen die Nachweisgrenze bei 391 Zellen/*Well* und Linearität war bis 25.000 Zellen/*Well* gegeben.

3.2.7.3 *CellTiter Glo*®

Im Lumineszenz-basierten *CellTiter-Glo*® Assay wird die ATP-Menge über eine Luciferin/Luciferase Reaktion detektiert. Die Luciferase katalysiert die Monooxygenierung von Luciferin in Anwesenheit von Mg^{2+} , ATP und molekularem Sauerstoff. Die dabei entstehende Lumineszenz ist proportional zur vorliegenden ATP-Menge und diese ist wiederum proportional zur Anzahl lebender Zellen (Butzler, *et al.*, 2014). Verwendet wurde dieses Assay entsprechend der Herstellerangaben. Pro Kavität einer schwarzen 96-*Well*-Mikrotiterplatte mit transparentem Boden wurden 100 µl des rekonstituierten *CellTiter-Glo*® Reagenz direkt zum Zellmedium gegeben. Die Platte wurde für 2 min auf einem Schüttelinkubator geschüttelt, um die Zellyse zu induzieren. Danach folgten mind. 10 min Inkubation bei RT. Abschließend wurde die Lumineszenz (*Spark*® *Multimode Microplate Reader*) gemessen.

Unter diesen Bedingungen lag für HEK-293T Zellen die Nachweisgrenze bei 98 Zellen/*Well* und Linearität war bis 25.000 Zellen/*Well* gegeben.

3.2.8 Hoechst-Färbung

Für die Hoechst-Färbung wurde eine 0,1 %ige Hoechst 33342 Stammlösung in *Aqua bidest.* hergestellt und lichtgeschützt gelagert. Nach entsprechenden Inkubationsbedingungen und Inkubationsdauer (vgl. 3.2.10.1; 3.2.10.2) wurden 50 µl des Kulturmediums entnommen und durch 50 µl einer Lösung von 8 % Paraformaldehyd (PFA) und 0,002 % Hoechst 33342 in DPBS ersetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und dann mit DPBS überschichtet. Apoptotische Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch bei 40-facher Objektivvergrößerung am Olympus CK2 Mikroskop ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) detektiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl pro *Well* wurden die Platten an der *ImageXpress*® ausgelesen (λ_{ex} : 358, λ_{em} : 461) und ausgewertet.

3.2.9 Proliferations-Assay

Zur Bestimmung des Zellwachstums und des Einflusses unterschiedlicher Reagenzien auf die Zellentwicklung (vgl. 3.2.10.1; 3.2.10.2) der HEK-293T *MTARC1*-KO im Vergleich zum HEK-293T WT, wurden 2.500 HEK-293T WT-Zellen/*Well* und 3.000 HEK-293T *MTARC1*-KO Zellen/*Well* in schwarze 96-*Well*-Mikrotiterplatten mit transparentem Boden ausgesät. Die KO- und WT-Zellen wurden nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit 100 µM, 250 µM und 500 µM Palmitat als Palmitat-BSA-Komplex, 10 µM, 20 µM und 30 µM H_2O_2 , 0,01 mM, 0,1 mM und 1 mM HAP fixiert und mit Hoechst 33342 angefärbt. Hierfür wurden 50 µl des 100 µl Kulturmediums entnommen und durch 50 µl einer 8 %ige PFA-Lösung sowie 0,002 % Hoechst 33342 in DPBS ersetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde der Überstand vollständig entnommen und jedes *Well* zwei- bis dreimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS überschichtet und an der *ImageXpress*® (λ_{ex} : 358, λ_{em} : 461) vermessen und ausgewertet. Im Falle von H_2O_2 wurde dem Medium bei einem Teil der Zellen 24 h nach der Aussaat 0,3 mM Buthioninsulfoximin (BSO) zugesetzt und für weitere 16 h inkubiert, erst dann erfolgte die Inkubation mit H_2O_2 .

3.2.10 Toleranz-Studien

3.2.10.1 6-*N*-Hydroxyaminopurin-Toleranzanalyse

Für die Untersuchung der Sensibilität von HEK-293T *MTARC1*-KO Zellen gegenüber der mutagenen *N*-Hydroxylierten Nukleobase 6-*N*-Hydroxyaminopurin (HAP), wurden 3.000 KO sowie WT Zellen pro *Well* auf 96-*Well*-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 24 h Wachstum im Inkubator wurden die Zellen mit Zellkulturmedium, supplementiert mit unterschiedlichen Konzentrationen HAP (0,001 – 2 mM), behandelt. Zur Lösungsvermittlung wurde 1 % DMSO hinzugesetzt. Proliferation und Viabilität wurden nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht (vgl. 3.2.7.2; 3.2.9). Darüber hinaus wurde die Zellen mittels Hoechst 333426-Färbung fluoreszenzmikroskopisch betrachtet, um so apoptotische Zellen zu detektieren (vgl. 3.2.8). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden sowohl KO Zellen als auch WT Zellen auf derselben Platte vermessen. Als Kontrollen dienten Kavitäten mit Zellen und 1 % DMSO in Medium, sowie Kavitäten mit ausschließlich Medium ohne Zellen.

3.2.10.2 Wasserstoffperoxid-Toleranzanalyse

Die reduktive Detoxifizierung von O-O-Bindungen durch das mARC-Enzymsystem wurde im komplexen zellulären System näher untersucht. Hierfür wurden HEK-293T *MTARC1*-KO sowie WT Zellen in einer Konzentration von 3.000 Zellen pro *Well* auf 96-*Well*-Mikrotiterplatten ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurde ein Teil der adhärenenten Zellen mit Zellkulturmedium, dem 0,3 mM BSO zugesetzt war, für weitere 16 h inkubiert. Hierauf folgte die Inkubation mit H₂O₂ in Kulturmedium in folgenden Konzentrationen: 0, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM, 80 µM und 100 µM. Inkubiert wurde für 8 h, 24 h, 48 h und 72 h. Im Anschluss wurde die Zellviabilität mittels Resazurin-Assay (vgl. 3.2.7.2) analysiert. Auf einer Platte wurden zur besseren Vergleichbarkeit sowohl KO Zellen als auch WT Zellen vermessen. Als Kontrollen dienten Kavitäten mit Zellen und Medium, sowie Kavitäten mit Medium ohne Zellen.

3.2.10.3 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies

Um eine Beteiligung von mARC am Stoffwechsel von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im physiologischen Kontext zu untersuchen, wurden KO und WT Zellen hinsichtlich der intrazellulären Konzentration von ROS charakterisiert. Hierfür wurde das DCFDA/H₂DCFDA – *Cellular ROS Assay Kit*[®] entsprechend der Herstelleranweisung verwendet. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCFDA) passiert biologische

Membranen und wird anschließend in der Zelle durch Esterasen deacetyliert. ROS oxidieren diese deacetylierte Verbindung dann zu dem stark fluoreszierende 2',7'-Dichloro-fluorescein (DCF), das dann fluorimetrisch detektiert werden kann. Die Konzentration an fluoreszierenden DCF ist direkt proportional zu der Konzentration der ROS in der Zelle (Kelley *et al.*, 2002). Es wurden zuerst 6.250 Zellen/*Well* in eine schwarzen 96-*Well*-Multititerplatte mit klarem Boden ausgesät und für 24 h kultiviert. Dabei wurden zur besseren Vergleichbarkeit KO Zellen und WT Zellen auf derselben Platte ausgesät. Das hier verwendete Zellkulturmedium war DMEM supplementiert mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose ohne Phenolrot. Es erfolgte eine Vermessung vor der Mediumabnahme. Im Anschluss wurde dem Zellkulturmedium jeweils 8 Kavitäten 20 μM H_2O_2 , 50 mM Glucose, 10 μM Antimycin A gelöst in Zellkulturmedium, oder reines Zellkulturmedium hinzugegeben. Nach 23 h Exposition wurde dem Medium 40 μM DCFDA hinzugegeben und für weiter 45 min inkubiert. Als Kontrollen dienten Kavitäten ohne Zellen, mit Medium und Substrat, sowie Kavitäten mit Zellen ohne DCFDA. Vermessen wurde fluorimetrisch mittels *Plate Reader* ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$; *Spark® Multimode Microplate Reader*). Anschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung mithilfe von Hoechst 33342, welches die Zellkerne anfärbt (vgl. 3.2.8; 3.2.9). Die Fluoreszenzintensität wurde dann zur besseren Vergleichbarkeit auf die Zellzahl normalisiert.

3.2.10.4 Messung von Lipidperoxiden (LPO)

Neben den ROS wurde auch expliziter das Vorkommen von LPO analysiert. Hierfür wurde das *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit®* entsprechend der Herstelleranweisung verwendet. Malondialdehyd (MDA) gilt als Lipidperoxidations-Marker, da es ein Endprodukt der Lipidperoxidation darstellt (Ayala *et al.*, 2014). MDA reagiert mit Dithiobarbitursäure (TBH) zu einem pink fluoreszierendem Produkt, das dann fluorimetrisch vermessen werden kann ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$; *Spark® Multimode Microplate Reader*) (Asakawa & Matsushita, 1979; Janero, 1990).

Es wurden jeweils 250.000 KO bzw. WT Zellen/*Well* in einer 6-*Well*-Plate ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit temperiertem Medium überschichtet. Es wurden immer zwei *Wells* gleichermaßen behandelt, eines für die LPO-Messung, das andere um mittels BCA-Methode den Proteingehalt eines *Wells* zu bestimmen (vgl. 3.5), um eine Vergleichbarkeit zwischen KO und WT Zellen zu schaffen. Es wurden 2 *Wells* mit Medium und 2 *Wells* mit 20 μM H_2O_2 behandelt. Nach 24 h Inkubation wurde entsprechend Herstellerangaben eine Kalibrierung von 0 – 2 nmol/*Well* MDA hergestellt. Ca. 1.000.000 Zellen/*Well* wurden mit eiskaltem DPBS abgelöst und resuspendiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für die Proteingehaltsbestimmung mit NP-40 Lysepuffer lysiert (vgl. 3.2.6; 3.5), der andere Teil wurde mit 300 ml MDA-

Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Als nächstes wurde der Ansatz, der zuvor mit MDA-Lysepuffer versetzt wurde, 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. 200 ml des Überstandes wurden mit 600 µl TBA-Lösung versetzt und für 60 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem Boden gefüllt und fluorimetrisch vermessen.

3.2.10.5 Untersuchung der Toleranz gegenüber Substanzen im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel

Makronährstoffe können in einem Zustand des metabolischen Ungleichgewichts ebenfalls die Bildung von ROS fördern oder durch eine vermittelte Lipotoxizität die Gesundheit des Organismus oder einzelner Zellen beeinflussen (Brownlee, 2001; Nishikawa *et al.*, 2000; Ly *et al.*, 2017; Softic *et al.*, 2016; Othman *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss von Monosacchariden wie Glucose und Fructose, der Einfluss von Fettsäuren wie Palmitinsäure und der Einfluss des anabolen Hormons Insulin untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen in einer Konzentration von 3.000 Zellen/Well in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium dann mit 500 µM, 250 µM und 100 µM Palmitat als Palmitat-BSA-Komplex, 100 mM Fructose, 50 mM Glucose und 1 µM Insulin in jeder Kombination supplementiert und der Einfluss dieser Verbindungen auf die Zellviabilität (vgl. 3.2.7.2) untersucht. Auf einer Platte wurden zur besseren Vergleichbarkeit sowohl KO Zellen als auch WT Zellen vermessen. Zur Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit Medium behandelt wurden, sowie Kavitäten mit BSA ohne Palmitat und Kavitäten ohne Zellen.

3.2.11 Nile Red-Färbung

Die Nile Red-Färbung dient dem Anfärben zellulärer Lipide. Zuerst wurde eine Nile Red-Stammlösung hergestellt. Hierfür wurde Nile Red in DMSO in einer Konzentration von 1mg/ml gelöst und aliquotiert weggefroren. Für die Nile Red-Färbung wurden dann 2.500 HEK-293T WT Zellen/Well und 3.000 HEK-293T MTARC1-KO Zellen/Well in schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit transparentem Boden ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit 100 µM, 250 µM und 500 µM Palmitat als Palmitat-BSA-Komplex. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen dann fixiert und mit Nile Red gefärbt. Hierfür wurde zuerst 50 µl Medium aus den Kavitäten entnommen und durch 50 µl einer Lösung von 8 % PFA und 0,002 % Hoechst 33342 in DPBS ersetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DPBS

gewaschen und mit einer Lösung aus 1 μ l *Nile Red*-Stammlösung auf 10 ml autoklavierter 150 mM NaCl-Lösung überschichtet. Anschließend wurde erneut 10 min bei RT inkubiert, zweimal mit DPBS gewaschen und mit DPBS überschichtet. Danach konnte die 96-Well-Mikrotiterplatte fluoreszenzmikroskopisch bei 10-facher Objektivergrößerung an der *ImageXpress*® vermessen und mit der entsprechenden Software ausgewertet werden. Als Kontrolle wurden Kavitäten mit Zellen ohne Farbstoff mitvermessen.

3.3 Tierstudien mit *MTARC1*- und *MTARC2*-KO Mäusen

MTARC1-KO (*MTARC1*^{-/-}) Mäuse wurden durch die *Mouse Genome Engineering Facility*, einem Dienstleister, generiert und kommerziell erworben. *MTARC2*-KO (*MTARC2*^{-/-}) Mäuse wurden von dem *European Mouse Mutant Archive* (EMMA) zur Verfügung gestellt.

Die KO Mäuse wurden aus dem C57BL/6-Stamm entwickelt. Es wurden sowohl homozygote KO Mäuse als auch homozygote WT Mäuse desselben Wurfs für diese Versuche verwendet.

Die Haltung und Züchtung der Mäuse sowie die Durchführung der Tierversuche fand im *Maria Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center* / Institut für Onkologie, Abteilung onkologische Genetik in der Arbeitsgruppe von Professor Jerzy Ostrowski und Assoc. Prof. Dr. Michal Mikula in Warschau, Polen statt. Die Genomsequenzierung wurde am Institut *Clinique de la Souris*, Illkirch Cedex, Frankreich durchgeführt.

Die Mäuse waren in der Abteilung für Genetik und Labortierhaltung im *Department of Genetics, Maria Sklodowska-Curie Institute - Cancer Center* untergebracht. Alle Mäuse wurden gemäß den Empfehlungen im *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* des *Institute of Laboratory Animal Resources* (ILAR) gehalten, der Versuchsantrag wurde vom 2. Lokalen Ethischen Komitee für Tierforschung in Warschau, Polen, genehmigt.

3.3.1 Messung der Körpertemperatur

Die Messung wurde mit einem kontaktlosen Infrarot-Thermometer um den Anus herum an 13 WT Mäusen und 10 *MTARC2*-KO Mäusen beider Geschlechter durchgeführt.

3.3.2 Studie zur Körpergewichtszunahme unter hochkalorischer und normokalorischer Diät

In den vorliegenden *in vivo* Studien wurden männlichen *MTARC1*^{-/-} und *MTARC2*^{-/-} Mäuse verwendet, die ein Alter von ca. 10 Wochen hatten. Es wurden zwei unterschiedliche Studien durchgeführt. Für die Charakterisierung der *MTARC2*^{-/-} Mäuse wurden 4 Gruppen von je 8 Mäusen über einen Zeitraum von 23 Wochen gefüttert, zwei Gruppen (WT und *MTARC2*^{-/-}) erhielten normokalorische Nahrung (ND) (10 % der Kalorien aus Fett) mit 19,2 % Protein, 67,3 % Kohlenhydraten und 4,3 % Fett (entspricht D12450B, *Research Diets*, New Brunswick, USA), zwei Gruppen (WT und *MTARC2*^{-/-}) erhielten eine hochkalorische Diät (60 % der Kalorien aus Fett) mit 26,2 % Protein, 26,3 % Kohlenhydraten und 34,9 % Fett (HFD) (entspricht D12492, *Research Diets*, New Brunswick, USA). Das Körpergewicht wurde wöchentlich gemessen. Zur Charakterisierung der *MTARC1*^{-/-} Mäuse wurden 4 Gruppen von mind. 7 Mäusen über einen Zeitraum von 22 Wochen gefüttert. Es wurden 2 Gruppen (*MTARC1*^{-/-} und WT) eine ND gefüttert (s.o.) und zwei Gruppen (*MTARC1*^{-/-} und WT) einer *Western Diet* (WD) (42 % der Kalorien aus Fett) mit 35 % Sucrose, 0,2 % Cholesterin, 19,8 % Protein und 21 % Fett (entspricht D12079B, *Research Diets*, New Brunswick, USA). Wöchentlich wurde das Körpergewicht gemessen.

3.3.3 Untersuchung des Serums auf biochemische Marker

Die Serumcholesterin-, Glucose-, Triglycerid-, HDL-, Gamma-Glutamyltransferase- (γGT) und Alanin-Aminotransferase-Werte (ALT) wurden im Anschluss an die HFD-Studie in *MTARC2*-KO Mäusen und WT Mäusen mit einem SpotChem EZ *Chemical Analyzer* unter der Verwendung von gebrauchsfertigen SpotChem II Kenshin-2 Objektträgern bestimmt. Diese Untersuchungen wurden im *Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center* durch die Arbeitsgruppe von Assoc. Prof. Dr. Michal Mikula durchgeführt.

3.3.4 Histologische Untersuchung der murinen Leber

Fragmente von frischem Lebergewebe von *MTARC2*-KO Mäusen und WT Mäusen wurden im Anschluss an die HFD-Studie wie zuvor durch Hennig *et al.* beschrieben in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und einer histopathologischen Untersuchung unterzogen (2014). Diese Untersuchungen wurden im *Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center* durch die Arbeitsgruppe von Assoc. Prof. Dr. Michal Mikula durchgeführt.

3.4 Homogenisation von murinem und humanem Fettgewebe

Die Homogenisation der Gewebe erfolgte mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators. Hierfür wurde zuerst das aufgetaute, unzerkleinerte Organ in den Glaszylinder gegeben und mit 500 - 1500 µl eisgekühltem Standardpuffer nach Krischkowski aufgefüllt (2014). Mit dem Glaspistill, der an einem KPG-Rührer angeschlossen ist, wurde dann durch manuelles auf- und abbewegen des Glaszylinders homogenisiert. Zum Schluss wurde das Homogenat in Aliquots à 200 µl in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80 °C gelagert. Im Falle des humanen Fettgewebes wurde noch ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt eingefügt. Hier wurde das auf Eis gelagerte Homogenat für 10 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert, um die wässrige Phase von den freigesetzten Lipiden und größeren Bindegewebsteilen abzutrennen.

Zusammensetzung Standardpuffer:

0,25 M	Saccharose
1 mM	EDTA
10 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4 (4 °C)	

3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Homogenats (vgl. 3.4) und des Zelllysats (vgl. 3.2.6) wurde mittels BCA-Methode nach Smith *et al.* durchgeführt (1985). Hierzu wurde das BCA-Protein-Assay *Kit* gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Um störende Begleitsubstanzen zu entfernen, wurden die Proteine zuerst mithilfe des *Compat-Able Kits* gefällt, bei 10000 g abzentrifugiert, in BCA-*Working* Reagenz gelöst und nach einer 20-minütigen Inkubation bei 562 nm in einer 96-*Well* Plate vermessen. Parallel wurde eine Kalibriergerade aus Rinderserumalbumin-Standard mitvermessen ($R^2 > 0,98$). Die Messwerte innerhalb des kalibrierten Bereichs (Abs. = 0,2 – 0,8) wurden gewertet.

3.6 Bestimmung der Proteinexpression

Die Proteinexpression wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot bestimmt.

3.6.1 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der aus lysierten Zellen und homogenisierten Organen gewonnenen Proteine nach ihrer Größe wurde eine diskontinuierliche denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Hierfür wurde Homogenat oder Zelllysate auf einen bestimmten Proteingehalt verdünnt und anschließend mit 4x-Ladepuffer bei 95 °C für 5 min bis zur vollständigen Denaturierung erhitzt. Von den hergestellten Auftragslösungen wurden 10 - 15 µl in die Geltaschen gefüllt und somit pro Gel konstante Proteinkonzentrationen (32 – 64 µg/Tasche) aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte in 12,5 %igen Acrylamidgelen. Hierfür wurden die Proteinbanden zuerst im 4,5 %igen Sammelgel bei 120 V fokussiert und im Anschluss im 12,5 %igen Trenngel bei 180 V aufgetrennt.

Zusammensetzung der Puffer und Gele:

Elektrophoresepuffer (10x), pH 8,2 - 8,3	Ladepuffer (4x) (Laemmli-Puffer)
0,25 M TRIS	32 % (v/v) 0,2 M TRIS
1,92 M Glycin	8 % (m/v) SDS
1 % (m/v) SDS	40 % (v/v) Glycerin
	20 % (v/v) β-Mercaptoethanol
	0,02 % (v/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer (4x), pH 6,8	Trenngelpuffer (4x), pH 8,8
0,25 M TRIS	0,75 M TRIS
0,4 % (m/v) SDS	0,4 % (m/v) SDS
Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (12,5 %)
2,4 ml <i>Aqua dem.</i>	3,94 ml <i>Aqua dem.</i>
1 ml Sammelgelpuffer (4x)	3 ml Trenngelpuffer (4x)
0,6 ml Acrylamid	5 ml Acrylamid
6 µl TEMED	10 µl TEMED
25 µl APS-Lösung	80 µl APS-Lösung
	60 µl TCE

Zur Detektion der gesamten Proteine im Gel wurde dem Trenngel vor der Polymerisation TCE in einer Konzentration von 0,5 % (v/v) hinzugesetzt. TCE reagiert unter 5-minütiger UV-Bestrahlung mit den Tryptophan-Resten der Proteine zu einem fluoreszierenden Produkt, sodass die Protein-Banden anschließend sichtbar gemacht werden können.

Dies erfolgte mithilfe des *ChemoStar Touch ECL & Fluorescence Imager* (Ladner *et al.*, 2004).

3.6.2 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Nassblotverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dies erfolgte in einer Elektrophoresekammer in Transferpuffer bei 90 - 110 V für 90 – 120 min unter Kühlung. Im Anschluss erfolgte die immunologische Detektion. Hierfür wurde die Membran zuerst für eine Stunde in MTBST (5 % Milchpulver in TBST-Puffer) unspezifisch geblockt. Im Anschluss wurde dann für 1 h bei RT mit dem Primär-Antikörper in MTBST inkubiert, sodass dieser spezifisch binden konnte.

Es wurden folgende Antikörper in folgender Verdünnungen eingesetzt:

anti-mARC2: 1:1000

anti-GAPDH: 1:1000

anti-mARC1: 1:1000

anti-COX4: 1:1000

Anschließend wurde die Membran dreimal mit 10 ml TBST-Puffer für 10 min gewaschen und mit HRP-gekoppeltem Zweitantikörper (1:10.000) in MTBST für 1 h bei RT inkubiert.

Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion. Hierfür wurde das ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*) verwendet, welches durch eine an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase in ein fluoreszierendes Substrat umgewandelt wird. Die Vermessung erfolgte mittels *ChemoStar Touch ECL & Fluorescence Imager*.

Für das *Stripping* wurde ein eigens hergestellter *Stripping*-Puffer verwendet (Alegria-Schaffer *et al.*, 2009).

Zusammensetzung *Stripping*-Puffer:

200 mM Glycin

3,5 mM SDS

900 mM Tween® 20

pH 2,2

Die Membran wurde hierfür zweimal mit vortemperiertem *Stripping*-Puffer (60 °C) für 10 min gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen mit DPBS-Puffer für 10 min und anschließend zweimaligen Waschen mit TBST-Puffer für 10 min.

Zusammensetzung der Puffer:

TBST-Puffer, pH 7,6	Transferpuffer
20 mM TRIS	25 mM TRIS
140 mM NaCl	192 mM Glycin
0,1 % (v/v) Tween® 20	20 % (v/v) MeOH

Die Bandenintensität des gesuchten Proteins wurde semiquantitativ mithilfe der Software *ImageJ*® bestimmt und mithilfe der Bandenintensität der Ladekontrolle normalisiert.

3.7 Inkubationsstudien zur Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität

3.7.1 Synthese von Amitriptylin-*N*-Oxid

Amitriptylin-*N*-oxid (3-(10,11-Dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]-Cyclohepten-5-yliden)-*N,N*-dimethyl-1-propanamin-*N*-oxid) wurde nach der Methode von Günther synthetisiert (1982). Zuerst wurde Amitriptylin aus Amitriptylin-Hydrochlorid freigesetzt. Die resultierende freie Base wurde auf 50 °C erwärmt und über 20 min mit 1 g einer 30 %igen (v/v) H₂O₂-Lösung versetzt. Nach 1 h Rühren bei 50 °C wurden 3 ml *Aqua bidest.* hinzugegeben, und Amitriptylin-*N*-Oxid als Dihydrat ausgefällt. Der Niederschlag wurde filtriert, gewaschen und getrocknet. Die Reinheit wurde durch LC-MS-Analytik (*m/z* 294 [MH]) und mithilfe des Schmelzpunktes (101 °C, Literaturwert: Günther, 1982) charakterisiert.

3.7.2 Inkubationsstudien mit rekombinanten Proteinen

Die rekombinanten Proteine, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Scheidig, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, exprimiert und zur Verfügung gestellt.

Die *in vitro* *N*-reduktive Aktivität der rekombinanten murinen und humanen mARC1 und mARC2-Proteine wurde anhand der folgenden Substrate bestimmt: Benzamidoxim (BAO), Nicotinamid-*N*-Oxid (NANO), Guanoxabenz (GOB), Benzhydroxamsäure (BHA), *N*-Hydroxycytidin (NHC), HAP. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Konzentration der rekombinanten Enzyme CYB5B und CYB5R richtete sich nach ihrem Cofaktorgehalt. Jeder Inkubationsansatz enthielt 10 pmol FAD der CYb5R, 100 pmol Häm des CYB5B, 5 µg mARC und 3 mM Substrat in insgesamt 80 µl 20 mM MES-Puffer, pH 6,0.

Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l 5 mM NADH gestartet. Nach 15 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zusatz von 100 μ l eiskaltem MeOH gestoppt und für 5 min geschüttelt. Zur Abtrennung der präzipitierten Proteine wurde die Probe dann für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand per HPLC vermessen (vgl. 3.8).

Für jede Einzelprobe und jedes Substrat wurde ein 4-facher Inkubationsansatz pipettiert, der zur Konzentrationsbestimmung des gebildeten Metaboliten in die HPLC injiziert und vermessen wurde. Die Inkubation wurde an einem zweiten Tag wiederholt, wobei an jedem Tag alle Substrate gleichzeitig pipettiert wurden. Es wurden zwei Kontrollansätze mitgeführt, einer ohne mARC und einer ohne NADH.

3.7.3 Inkubationsstudien mit murinen und humanen Gewebehomogenaten

Die Inkubationsansätze mit murinen und humanen Homogenaten waren wie folgt zusammengesetzt: 0,05 - 0,2 mg Protein aus Homogenat (murine Leber, Nieren, Lunge; humanes Fettgewebe), 3 mM Substrat (BAO, BHA, NANO, NHC, GOB, HAP, Amitriptylin-*N*-Oxid (ANO), Hydroxyharnstoff), 1 mM NADH in 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,0). Im Falle von GOB, ANO und HAP wurde dem Ansatz 1 % DMSO zur Lösungsvermittlung zugesetzt. Die Inkubationen wurden in einem 37 °C Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ansatzvolumen betrug 100 μ l, Puffer und Substratlösungen waren auf 37 °C vortemperiert. Nach 5-minütiger Vorinkubation des Substrats mit der jeweiligen Enzymquelle wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Die Proben wurden unterschiedlich lang inkubiert (Leber, Niere: 30 min; Lunge, humanes Fettgewebe: 90 min) und die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l eisgekühltem Methanol abgestoppt. Die Ansätze wurden anschließend 5 min geschüttelt und das präzipitierte Protein bei 10.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC-Analytik vermessen (vgl. 3.8).

Für jede Einzelprobe und Substrat wurde ein doppelter Inkubationsansatz pipettiert, der zur Konzentrationsbestimmung des gebildeten Metaboliten in die HPLC injiziert und vermessen wurde. Die Inkubation wurde an unterschiedlichen Tagen mit jeweils 4 einzelnen Homogenaten (WT bzw. KO) durchgeführt, wobei an jedem Tag alle Substrate gleichzeitig pipettiert wurden. Es wurden zwei Kontrollansätze mitgeführt, einer ohne Protein und einer ohne NADH.

Zusammensetzung Kaliumphosphat-Puffer (100mM):

3,4 g	KH_2PO_4
4,35 g	K_2HPO_4
ad 500 ml	<i>Aqua bidest.</i>
pH 6,0	

3.7.3.1 Detektion von Harnstoff

Hydroxyharnstoff wurde in bisherigen Studien als ein Substrat identifiziert, dass fast ausschließlich durch mARC1 reduziert wird (Indorf *et al.*, 2020a). Homogenat von humanem Fettgewebe wurde hierfür mit Hydroxyharnstoff wie in 3.7.3.1 beschrieben inkubiert, mit dem Unterschied, dass die Reaktion nicht durch Methanol gestoppt wurde, sondern lediglich durch ein schnelles Abkühlen auf 4 °C. Der Ansatz wurde direkt bei 4 °C und 10.000 g für 5 min zentrifugiert und 50 µl dieses Ansatzes mithilfe des *Urea Assay Kits*® entsprechend der Herstellerangaben quantifiziert.

3.7.4 Inkubationsstudien mit humanen Zellen

Experimentell wurde die optimale Substratkonzentration ermittelt. Hierfür wurden 6.000 Zellen/*Well* in eine 96-*Well*-Mikrotiterplatte ausgesät und für 24 h inkubiert, anschließend wurde eine serielle 1:2-Verdünnung der Substrate (BAO, BHA, NANO, NHC, GOB, HAP) in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) hergestellt und die Zellen hiermit inkubiert. Nach 180 min wurde die Zellviabilität wie unter (3.2.6.2) beschrieben mittels Resazurin-Assay bestimmt.

Alle Inkubationsstudien mit humanen Zellen wurden in 24-*Well-Plates* durchgeführt. Hierzu wurde eine definierte Zellzahl (150.000 – 250.000 Zellen) in jedes *Well* gegeben und im Inkubator für 24 h kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen vorsichtig mit 900 µl vorgewärmtem substratfreiem Inkubationsmedium (HBSS mit 10 mM HEPES supplementiert, pH 7,4) 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden den *Wells* 100 µl vorgewärmtes substrathaltiges Inkubationsmedium (3 mM BAO, 0,1 mM HAP, 3 mM BHA, 0,1 mM GOB, 0,1 mM NHC, 3 mM NANO) versetzt und die Zellen für 180 min bei 37 °C inkubiert. Im Falle von BHA, GOB und HAP wurde für die Lösungsvermittlung 1 % DMSO im Endansatz verwendet. Nach 180 min Inkubation wurde der Überstand abgenommen und 1:1 mit eiskaltem Methanol versetzt. Im Anschluss wurde zentrifugiert, um zelluläre Reste und Proteine zu eliminieren. Die Ana-

lyse erfolgte dann per HPLC. Als Negativkontrolle diente zur Bestimmung der chemischen Zersetzung bzw. Verunreinigung jeweils ein entsprechend mitgeführter Ansatz ohne Zellen.

Für jede Einzelprobe und Substrat wurde ein 3-facher Inkubationsansatz pipettiert, der zur Konzentrationsbestimmung des gebildeten Metaboliten in die HPLC injiziert und vermessen wurde. Die Inkubation wurde an 3 unterschiedlichen Tagen mit jeweils 3 *Wells* durchgeführt, wobei an jedem Tag alle Substrate gleichzeitig pipettiert wurden.

3.8 HPLC-Analytik

3.8.1 Trennung und Quantifizierung von Benamidin und Benamidoxim

Zur Trennung und Quantifizierung von Benamidin und Benamidoxim wurde folgende nach Havemeyer *et al.* modifizierte Methode verwendet (2006):

stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B, C8 (5 µm), 250 x 4 mm
Vorsäule	LiChroCART® 4 x 4 mm, LiChrospher® 60 RP-select (5 µm)
mobile Phase	80 % (v/v) 10 mM Octylsulfonat, 20 % (v/v) Acetonitril
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Laufzeit	20 min
Detektion	229 nm
Injektionsvolumen	10 – 50 µl
Retentionszeiten	Benamidin: 5,3 ± 0,2 min Benamidoxim: 12,2 ± 0,4 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (45 µm), der organische Anteil lag in ausreichender Reinheit vor. Die Kalibrierung für Benamidin erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1 – 500 µM in *Aqua bidest.*. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2 \geq 0,9997$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 1 µM. Die mittlere Richtigkeit lag bei 109,1 ± 10 %.

3.8.2 Trennung und Quantifizierung von Nicotinamid und Nicotinamid-N-Oxid

Zur Trennung von Nicotinamid und Nicotinamid-N-Oxid wurde folgende nach Jakobs *et al.* modifizierte Methode verwendet (2014a):

stationäre Phase	Phenomenex® Gemini NX, C18 (5 µm), 150 × 4 mm (110 Å),
Vorsäule	Phenomenex® C 18, 4 × 3 mm

mobile Phase	97 % (v/v) 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 10 mM Teramethylammoniumchlorid, 3 % (v/v) Acetonitril
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Laufzeit	8 min
Detektion	262 nm
Injektionsvolumen	10 µl – 50 µl
Retentionszeiten	Nicotinamid- <i>N</i> -Oxid: 3,5 ± 0,1 min Nicotinamid: 8,7 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (45 µm), der organische Anteil lag in ausreichender Reinheit vor. Die Kalibrierung für Nicotinamid erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1 - 100 µM in *Aqua bidest.*. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2 = 0,9957$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 1 µM. Die mittlere Richtigkeit lag bei 124 ± 25 %.

3.8.3 Trennung und Quantifizierung von Adenin und 6-*N*-Hydroxyaminopurin

Zur Trennung von Adenin und 6-*N*-Hydroxyaminopurin wurde die durch Krompholz *et al.* entwickelte HPLC-Methode verwendet (2012):

stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B, C8 (5 µm), 125 x 4 mm
Vorsäule	LiChroCART® 4 x 4 mm, LiChrospher® 60 RP-select (5 µm)
mobile Phase	82 % (v/v) 20 mM Octylsulfonat, pH 3,0, 18 % (v/v) MeOH
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Laufzeit	18 min
Detektion	262 nm
Injektionsvolumen	10 – 50 µl
Retentionszeiten	6- <i>N</i> -Hydroxyaminopurin: 12 min ± 2 min Adenin: 17,2 min ± 0,3 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (45 µm), der organische Anteil lag in ausreichender Reinheit vor. Die Kalibrierung für Adenin erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1 - 100 µM in *Aqua bidest.*. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2 = 0,996$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 1 µM. Die mittlere Richtigkeit lag bei 104 ± 25 %.

3.8.4 Trennung und Quantifizierung von Benzamid und Benzhydroxamsäure

Zur Trennung von Benzamid und Benzhydroxamsäure wurde die durch Ginsel *et al.* entwickelte HPLC-Methode verwendet (2018):

stationäre Phase	Phenomenex® Gemini NX, C 18 (5 µm), 150 × 4 mm (110 Å),
Vorsäule	Phenomenex® C 18, 4 × 3 mm
mobile Phase	90 % (v/v) 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 10 mM Tetramethylammoniumchlorid, 10 % (v/v) Acetonitril
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Laufzeit	15 min
Detektion	210 nm
Injektionsvolumen	10 – 50 µl
Retentionszeiten	Benzhydroxamsäure: 4,4 ± 0,1 min Benzamid: 6,9 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (45 µm), der organische Anteil lag in ausreichender Reinheit vor. Die Kalibrierung für Benzamid erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 100 µM in *Aqua bidest.* Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2 = 0,9999$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 0,5 µM. Die mittlere Richtigkeit lag bei 100 ± 1,5 %.

3.8.5 Trennung und Quantifizierung von Guanabenz und Guanoxabenz

Zur Trennung von Guanabenz und Guanoxabenz wurde folgende nach Jakobs *et al.* modifizierte HPLC-Methode verwendet (2014a):

stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B, C8 (5 µm), 125 x 4 mm
Vorsäule	LiChroCART® 4 x 4 mm, LiChrospher® 60 RP-select (5 µm)
mobile Phase	70 % (v/v) 100 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 4, 30 % (v/v) Methanol
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Laufzeit	30 min
Detektion	272 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Retentionszeiten	Guanoxabenz: 16,6 ± 0,4 min Guanabenz: 22,9 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (45 µm), der organische Anteil lag in ausreichender Reinheit vor. Die Kalibrierung für Guanabenz erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1 – 100 µM in *Aqua bidest.*

Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2 = 0,998$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 2 μM . Die mittlere Richtigkeit lag bei $105 \pm 14 \%$.

3.8.6 Trennung und Quantifizierung von Cytidin und *N*-Hydroxycytidin

Zur Trennung von Cytidin und *N*-Hydroxycytidin wurde folgende nach Krompholz *et al.* modifizierte HPLC-Methode verwendet (2012):

stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B, C8 (5 μm), 250 x 4 mm
Vorsäule	LiChroCART® 4 x 4 mm, LiChrospher® 60 RP-select (5 μm)
mobile Phase	75 % (v/v) 10 mM Octylsulfonat, pH 2,0, 25 % (v/v) Methanol
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Laufzeit	15 min
Detektion	281 nm
Injektionsvolumen	10 μl
Retentionszeiten	<i>N</i> -Hydroxycytidin: $2,7 \pm 0,1$ min Cytidin: $8 \pm 0,1$ min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (45 μm), der organische Anteil lag in ausreichender Reinheit vor. Die Kalibrierung für Cytidin erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1 - 100 μM in *Aqua bidest.*. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2 = 0,998$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 1 μM . Die mittlere Richtigkeit lag bei $101 \pm 4 \%$.

3.8.7 Trennung und Quantifizierung von Amitriptylin und Amitriptylin-*N*-Oxid

Zur Trennung von Amitriptylin und Amitriptylin-*N*-Oxid wurde die durch Jakobs *et al.* entwickelte HPLC-Methode verwendet (2014a):

stationäre Phase	Phenomenex® Gemini NX, C18 (5 μm), 150 x 4 mm (110 Å), Phenomenex® C 18, 4 x 3 mm
mobile Phase	65 % (v/v) 20 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat, 0,1 % Trifluoressigsäure, pH 2,5 35 % (v/v) Acetonitril
Flussrate	1 ml/min, isokratisch
Laufzeit	17 min
Detektion	245 nm
Injektionsvolumen	10 – 50 μl
Retentionszeiten	Amitriptylin: $6,8 \pm 0,1$ min Amitriptylin- <i>N</i> -Oxid: $8,0 \pm 0,1$ min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Polyamidmembranfilter filtriert (45 μm), der organische Anteil lag in ausreichender Reinheit vor. Die Kalibrierung für Amitriptylin erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1 - 100 μM in *Aqua bidest.*. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2 = 0,997$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 1 μM . Die mittlere Richtigkeit lag bei $105 \pm 16 \%$.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software SigmaPlot 11 durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels *U*-Test und *t*-Test ausgewertet. Ein *p*-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

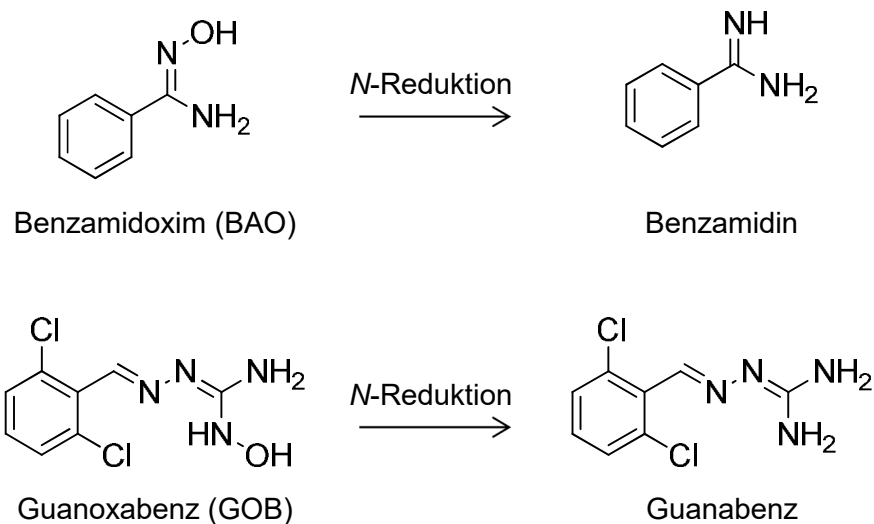
4 Ergebnisse

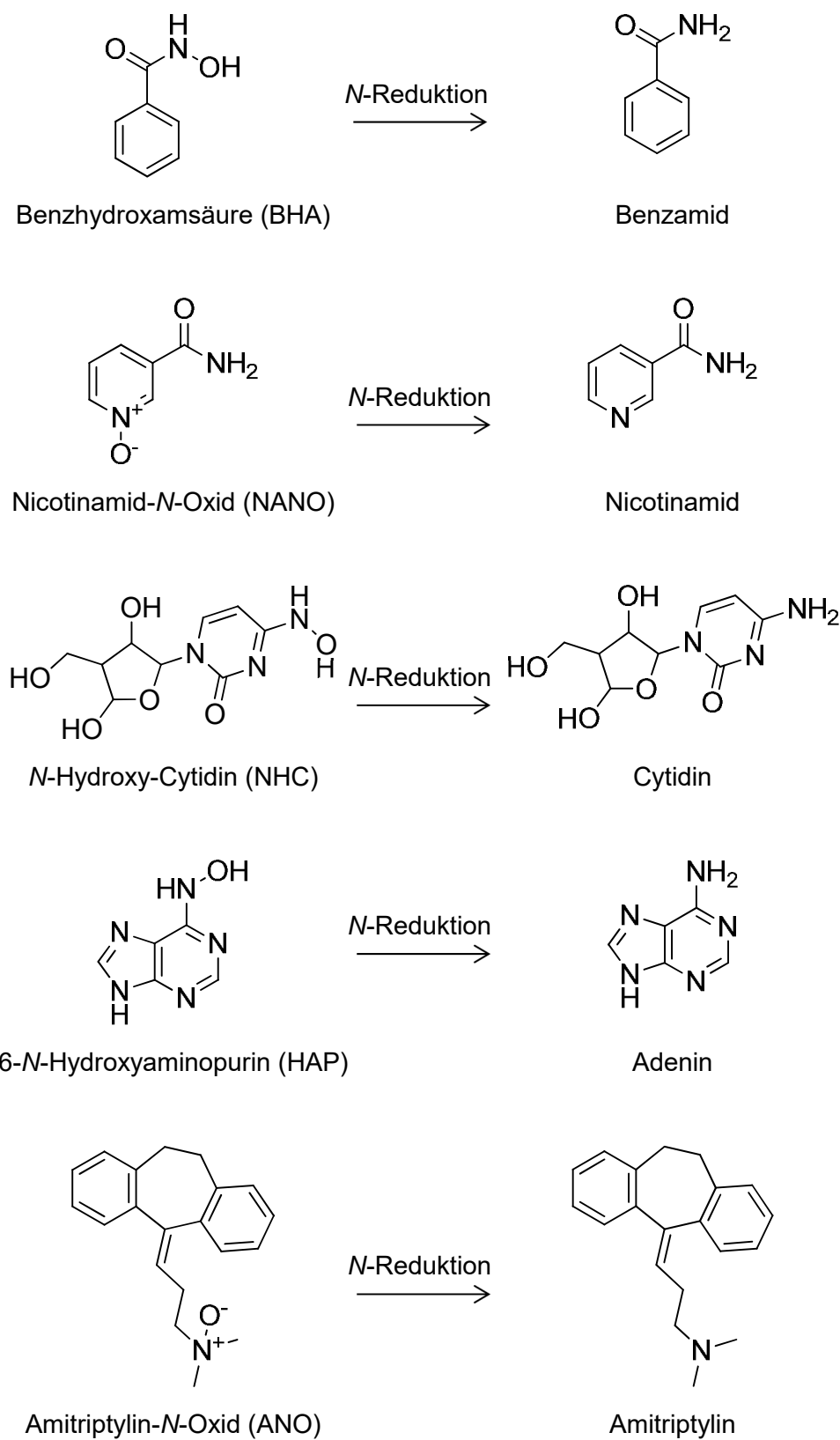
4.1 Untersuchung der Substratspezifität muriner und humaner mARC-Proteine

Eine essentielle Komponente bei der Charakterisierung von mARC stellt die Untersuchung des *N*-reduktive Metabolismus dar. Es ist allgemein anerkannt, dass mARC-Proteine gemeinsam mit den Elektronentransportproteinen CYB5B und CYB5R eine Vielzahl *N*-oxygenierter Verbindungen reduzieren, jedoch ist die Substratspezifität der paralogen (mARC1 vs. mARC2) bzw. orthologen (z.B. human vs. murin) Proteine bisher nicht vollständig geklärt.

Zuerst sollten die murinen und humanen mARC-Proteine anhand ihrer Substratspezifität charakterisiert und verglichen werden. Für die *in vitro* Testungen wurden rekombinante Proteine sowie Homogenate muriner Organe verwendet.

Es wurden 7 Substrate gewählt anhand deren die Reduktion durch die Proteine charakterisiert werden sollten (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: untersuchte *N*-Reduktion ausgewählter Substrate**

4.1.1 *In vitro* Reduktase-Assay mit rekombinanten murinen und humanen Proteinen

Bereits seit 2008 stehen humane rekombinante mARC-Proteine zur Verfügung (Gruenewald *et al.*, 2008). Inkubationsstudien wurden bereits in vorherigen Arbeiten durchgeführt, wurden hier aber zur besseren Vergleichbarkeit wiederholt (Abb. 4.2).

In dieser Studie konnte reproduziert werden, dass NANO in erster Linie durch das humane mARC1 (hmARC1) im rekonstituierten System reduziert wird). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Substrate wie BHA, NHC und HAP vorwiegend durch hmARC1 umgesetzt werden (Krompholz *et al.*, 2012; Ginsel *et al.*, 2018), während GOB mit einer vergleichbaren Umsetzungsrate durch beide humanen Paraloge reduziert wird (Jakobs *et al.*, 2014a).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig rekombinante murine mARC-Proteine (mmARC) untersucht. Es konnte gesehen werden, dass murine mARC-Proteine ebenfalls mit den humanen rekombinanten CYB5B- und CYB5R-Proteinen katalytisch aktiv sind, sodass vorerst darauf verzichtet wurde, murine CYB5B- und CYB5R-Proteine zu exprimieren.

Vergleicht man die Umsetzungsraten (Abb. 4.2) der murinen und humanen Orthologen wurde beobachtet, dass mmARC1 ANO mit einer deutlich höheren Umsetzungsrate reduziert, eine Reduktion von NANO durch murine Proben konnte nicht detektiert werden. Die Substratspezifität gegenüber BAO war ebenfalls vergleichbar, es konnte sowohl für mmARC2 als auch für hmARC2 höhere Umsetzungsraten im Vergleich zu ihren paralogenen Proteinen gesehen werden. Unterschiede stellten sich deutlich bei Inkubationen mit BHA, HAP und NHC heraus. Diese Substrate, die mit einer höheren Umsetzungsrate durch hmARC1 reduziert werden, zeigten im Vergleich höhere Reduktaseaktivitäten durch mmARC2. Auffällig war, dass bei Inkubationen mit GOB, NHC und HAP relativ ähnliche Umsetzungsraten für hmARC2 und mmARC2 detektiert wurden.

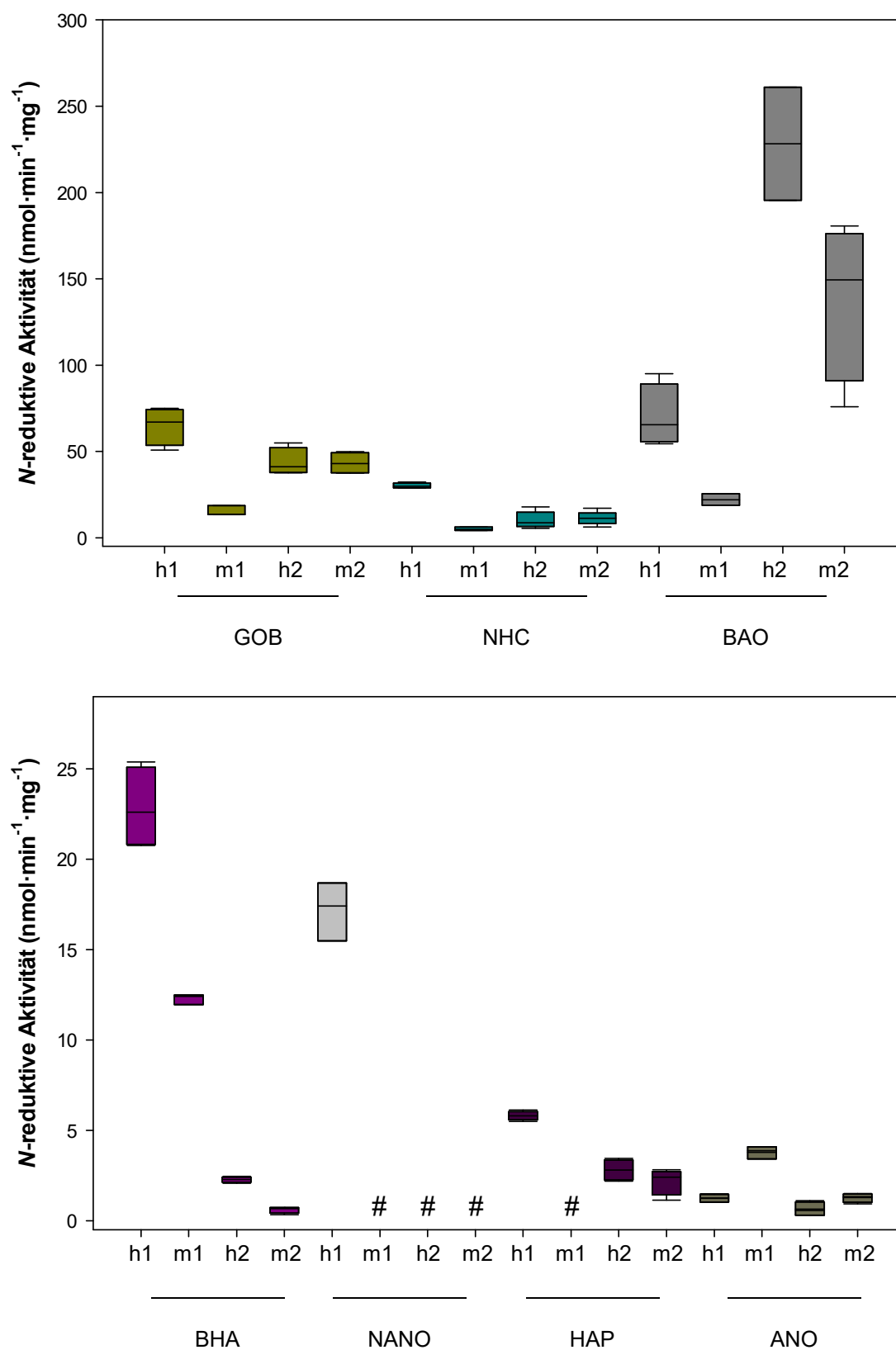


Abb. 4.2: Reduktaseaktivität der rekombinanten Proteine. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$). Die Ansätze wurden wie in 3.7.2 beschrieben inkubiert. Als Kontrolle wurden für jedes Substrat Komplettansätze ohne NADH sowie ohne mARC durchgeführt und der Wert hiermit korrigiert. h1 \triangleq hmARC1; h2 \triangleq hmARC2; m1 \triangleq mmARC1; m2 \triangleq mmARC2; #, unterhalb der LOQ ($0,02 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

4.1.2 *In vitro* Reduktase-Assay mit murinen Gewebehomogenaten

Um den Einfluss einer mARC1- sowie einer mARC2-Defizienz auf die Reduktaseaktivität unterschiedlicher Substrate zu untersuchen, wurde homogenisiertes Lebergewebe als Enzymquelle genutzt. Dieses Testsystem bietet den Vorteil, dass das gesamte Proteom Einfluss auf den Metabolismus der untersuchten Substrate nimmt. Es standen jeweils 5 *MTARC1*^{-/-} Mäuse, 6 homozygote *MTARC2*^{-/-} Mäuse und 11 homozygote WT Mäuse zur Verfügung, die nach 3.4 aufbereitet wurden.

Bevor die Organe in *N*-Reduktions-Assays charakterisiert wurden, wurde zunächst die fehlende Proteinexpression der mARC-Proteine in den entsprechenden Individuen überprüft. Mithilfe von SDS-PAGE und Western Blot war die ausbleibende mARC-Expression klar zu detektieren (Abb. 4.3).

Die Proteinexpression wurde mithilfe eines anti-mARC2-Antikörpers detektiert, da dieser beide murinen mARC-Proteine erkennt. Kommerziell verfügbare anti-mARC1-Antikörper erkennen keines der murinen mARC-Proteine (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der unterschiedlichen molekularen Massen der beiden Proteine sind sie dennoch im Western Blot zu erkennen und zu unterscheiden.

Zudem konnte hier gesehen werden, dass das murine mARC1 die leichtere paraloge Form darstellt.

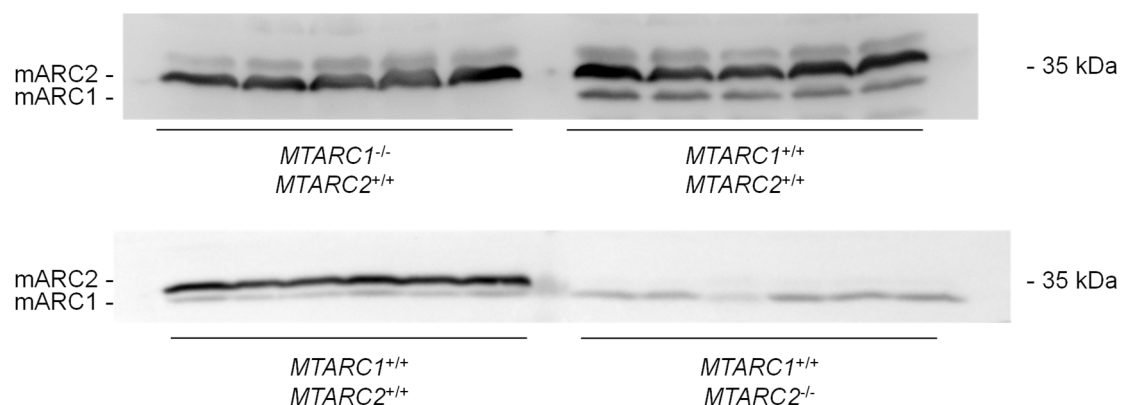


Abb. 4.3: Western Blot muriner Leberproben. Die Proteinexpression individueller *MTARC1*^{-/-} und *MTARC2*^{-/-} Mäusen sowie individueller WT Mäuse wurde immunologisch mittels SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse hinsichtlich ihrer mARC1- und mARC2-Expression untersucht (vgl. 3.6). Verwendet wurde in beiden Fällen der anti-mARC2-Antikörper, der eine Kreuzreaktion für murines mARC1 und mARC2 aufweist. Aufgetragen wurden jeweils 64 µg Protein. Die kompletten Western Blots sowie Ladekontrollen sind im Anhang unter 7.1.1 und 7.1.2 abgebildet.

Die Beteiligung der paralogen mARC-Proteine sowie entsprechender KOs galt es nun anhand ihrer NADH-abhängigen Reduktaseaktivität im Leberhomogenat zu charakterisieren.

Dazu wurden homogenisierte *MTARC1*^{-/-}, *MTARC2*^{-/-} sowie WT Leberproben mit einer Auswahl typischer *N*-oxygenierter Substrate sowie NADH inkubiert und die Umsatzrate ermittelt (Abb. 4.4). Es konnte gesehen werden, dass Leberhomogenate aus WT Mäusen in der Lage waren, alle getesteten Substrate zu reduzieren. Die höchste Umsatzrate erzeugten dabei GOB und BAO. Leberproben aus KO-Mäusen zeigten verminderte Reduktaseaktivitäten. Hervorzuheben ist, dass mARC2-defiziente Proben gegenüber GOB reduktase-inaktiv waren und die mARC1-defizienten Proben keinen Unterschied zum WT zeigten. Auch Inkubationen mit BAO und HAP zeigten vergleichbare Reduktaseaktivität von WT und *MTARC1*^{-/-} Proben, während die Reduktaseaktivität in mARC2-defizienten Proben vermindert war (Effekt bei BAO um ca. 80 % vermindert).

Bei den Substraten NHC, BHA und NANO zeigt sich ein anderes Muster: Proben mit *MTARC1*-KO sind reduktase-inaktiv (gegenüber NHC) oder zeigten eine massiv verminderte reduktive Restaktivität (v.a. bei Inkubationen mit BHA). Bei NHC und NANO zeigten auch *MTARC2*-KO Proben eine verminderte Reduktaseaktivität, während BHA durch Proben des WT bzw. *MTARC2*-KO mit vergleichbarer Umsatzrate reduziert wurde. Inkubationen mit Lungen- und Nierenhomogenat von mARC2-defizienten und WT Mäusen zeigten eine ähnliche verminderte Reduktaseaktivität (Daten nicht gezeigt, vgl. Anhang 7.2, Abb. 7.6).

Daten zur Proteinexpression und *N*-reduktiven Aktivität wurden bisher nur mit porcinen Gewebekomogenaten erhoben und sollten daher in der vorliegenden Arbeit auf murine Gewebe erweitert werden (Krischkowski, 2014).

Die Proteinexpression von mARC konnte in allen untersuchten murinen Geweben nachgewiesen werden (Abb. 4.5 A), dabei war die Proteinexpression in der Niere am höchsten, gefolgt von der Leber. In der Lunge hingegen war die Expression von mARC relativ gering. Bei Inkubationsstudien der unterschiedlichen Gewebe war eine geringe *N*-reduktive Aktivität in Lungenhomogenat gegenüber allen Substraten zu beobachten. Bei Inkubationen mit GOB und ANO war die höchste *N*-reduktive Aktivität entsprechend der Proteinexpression in der Niere zu detektieren. Für BAO und NHC konnten hingegen ähnliche Aktivitäten in Nieren- und Leberhomogenat detektiert werden (Abb. 4.5 B). Proteinexpression und Reduktaseaktivität stimmen somit überein.

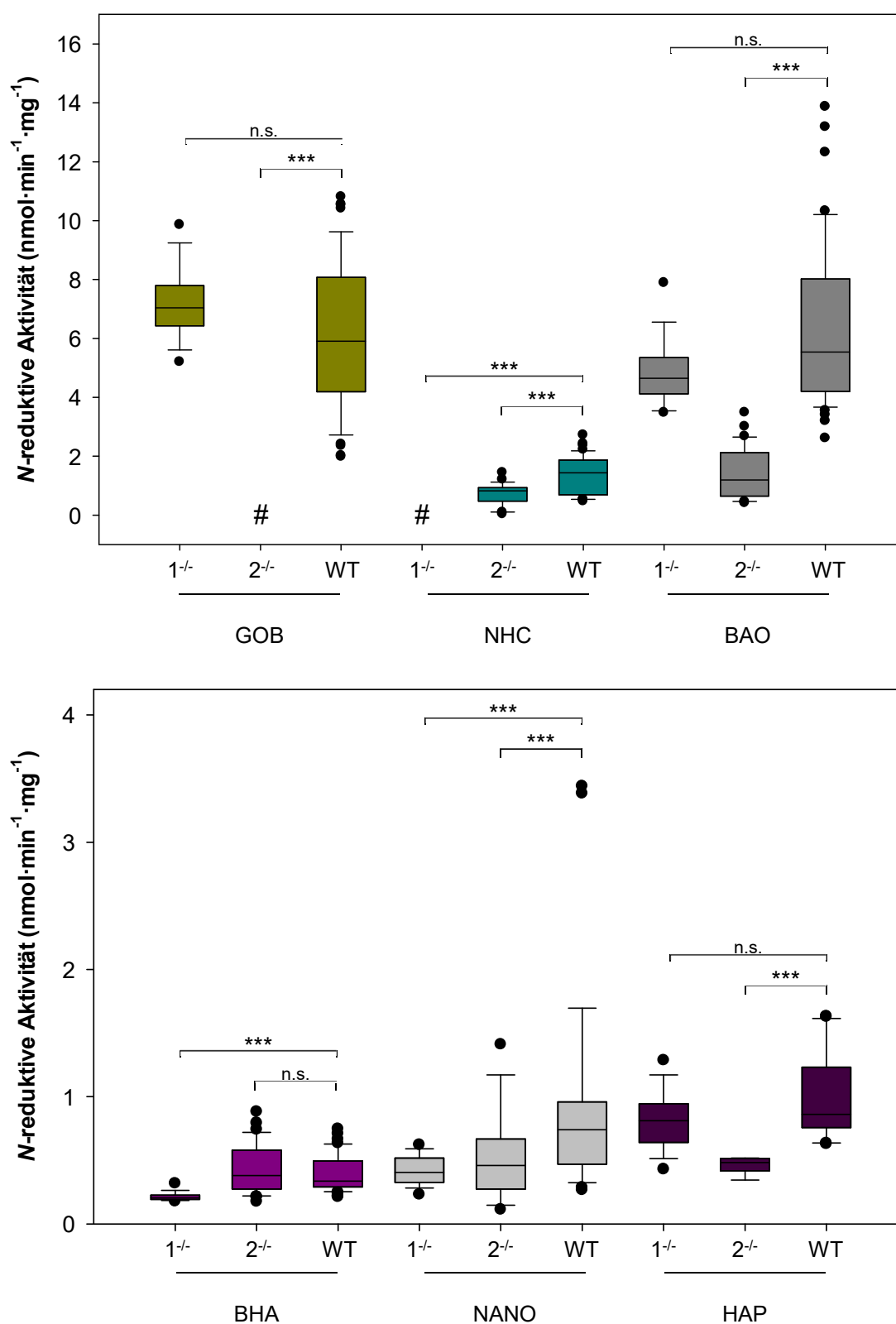
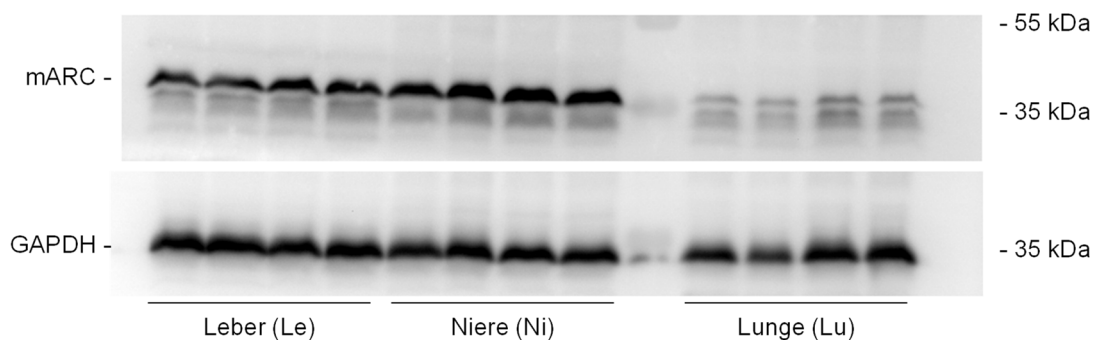


Abb. 4.4: Reduktaseaktivität. Leberhomogenat von individuellen Mäusen wurden separat über eine Zeitspanne von max. 90 min mit unterschiedlichen *N*-oxygenierten Substraten inkubiert ($n \geq 5$) (vgl. 3.7.3). Die Bestimmungsgrenze betrug $0,02 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Die statistische Signifikanz wurde mittels *U*-Test und *t*-Test nachgewiesen. Für jedes Substrat wurden Negativkontrollen ohne NADH und ohne Protein durchgeführt und der Wert hiermit korrigiert. #, unterhalb der LOQ. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant.

A



B

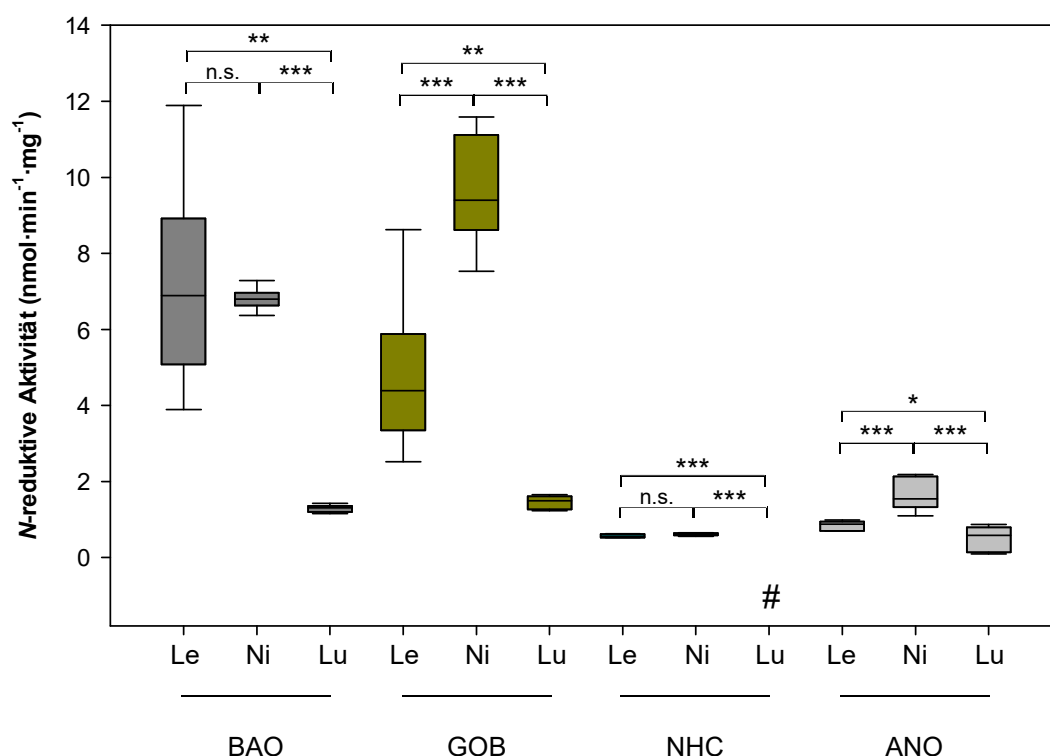


Abb. 4.5: Western Blot und Reduktaseaktivität von murinen Organhomogenaten

(A) Individuelle Organhomogenate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung von anti-mARC2 und anti-GAPDH-Antikörpern untersucht. Pro Bande wurden 64 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die kompletten Western Blots sowie Ladekontrollen sind im Anhang unter 7.1.3 abgebildet. (B) Organe wurden separat homogenisiert und über max. 90 min mit unterschiedlichen Substrate inkubiert (vgl. 3.4; 3.7.3). Die Bestimmungsgrenze betrug 0,1 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ für BAO und GOB und 0,02 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ für NHC und ANO. Die statistische Signifikanz wurde mittels *U*-Test und *t*-Test nachgewiesen. Für jedes Substrat wurden Negativkontrollen ohne NADH und ohne Protein durchgeführt und der Wert hiermit korrigiert. Le, Leber; Ni, Niere; Lu, Lunge; #, unterhalb der LOQ. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant.

4.2 Untersuchung vom humanen *MTARC1* mittels CRISPR/Cas9-vermitteltem KO in HEK-293T Zellen

Die gezielte Veränderung von Genen birgt ein enormes Potential für die Anwendung in der Grundlagenforschung, Medizin und Biotechnologie. Neben den 2003 entwickelten Zink-Finger-Nukleasen und seit 2008 angewendeten *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALEN) gelang 2012 mit der CRISPR/Cas-Methode ein Durchbruch in der Genom-Editierung (Miller *et al.*, 2007; Sander *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2011; Christian *et al.*, 2010). Der zugrundeliegende Mechanismus entstammt dem adaptivem Immunsystem von Prokaryoten und schützt diese unter anderem vor Bakteriophagen (Deveau *et al.*, 2010). Hierbei wird die in die prokaryotische Zelle eingebrachte virale DNA zerschnitten und eine Sequenz hieraus in das bereits bestehende CRISPR-Array des prokaryotischen Genoms eingebaut. CRISPR steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, d.h. gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom-Wiederholungen. Diese Sequenz des Genoms stellt in der Regel keinen kodierenden Bereich dar, dient jedoch häufig als Erkennungssequenz. Die transkribierte und prozessierte crRNA bindet dann durch Watson-Crick-Basenpaarung bei einer Zweitinfektion an die komplementäre Phagen-DNA-Sequenz und induziert die Endonuklease Cas, die durch einen Doppelstrangbruch die virale DNA zerstört (Deveau *et al.*, 2010) (Abb. 4.6). Die wissenschaftlich häufig verwendete Endonuklease ist die Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*. Entscheidend für das Binden der Endonuklease Cas9 und des hierdurch induzierten Doppelstrangbruchs ist die sogenannte PAM-Sequenz (Abb. 4.7). PAM steht für *Protospacer Adjacent Motif* und stellt eine sehr kurze, im bakteriellen Genom nicht vorkommende Sequenz aus ei-

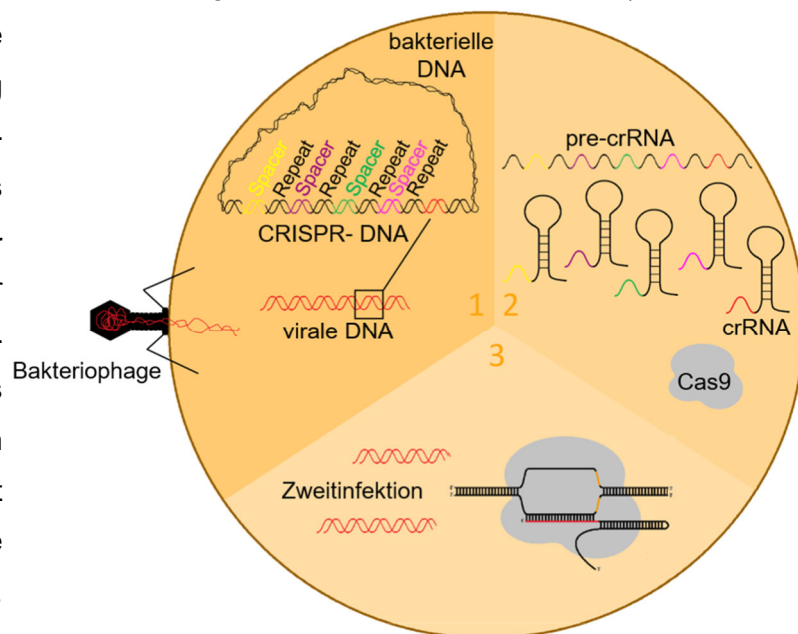


Abb. 4.6: Phasen des adaptiven Immunsystems von Prokaryoten. (1) Phage infiziert Bakterienzelle mit Phagen-DNA, *Protospacer*-Sequenzen werden aus Phagen-DNA herausgeschnitten und in bestehendes CRISPR-Array eingebaut. (2) CRISPR-Array wird in Bakterien transkribiert und prozessiert. (3) Zweitinfektion: crRNA bindet an komplementäre Phagen-DNA, Endonuklease Cas9 bindet und zerstört virale DNA durch Doppelstrangbruch (nach Pflanzenforschung.de [CC BY-SA 3.0 DE] <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>)

ner beliebigen Base gefolgt von zwei Guanin-Basen dar (Ran *et al.*, 2013). Im humanen Genom hingegen kommt diese Basenabfolge ca. alle 8 bis 12 Basenpaare vor, wodurch das Adressieren fast jedes Gens ermöglicht wird (Hsu *et al.*, 2013; Le Cong *et al.*, 2013).

Exakt 3 Basenpaare

oberhalb dieser

PAM-Sequenz wird der

Doppelstrangbruch

herbeigeführt und ist

dadurch genau lokali-

sierbar. Nach erfolg-

tem Doppelstrang-

bruch gibt es zwei vor-

herrschende Repara-

tionsmechanismen,

die dann in der Zelle

ablaufen. Ein Mecha-

nismus wäre die ho-

omologe Rekombination, bei der ein identischer DNA-Strang aus z.B. Schwesterchromatiden durch *Cross-Over*-Bereiche bei der Zellteilung in die DNA eingebaut wird. Diese Reparatur läuft basengenau ab und ohne Mutationen (Le Cong *et al.*, 2013).

Der jedoch häufiger ablaufende Mechanismus ist das nichthomologe *End-Joining*. Hierbei werden DNA-Enden von Endonukleasen erkannt, die diese dann zurechtschneiden, sodass DNA-Ligasen die Enden wieder verknüpfen können. Hierbei entstehen häufig Insertionen und Deletionen, welche eine Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*) und häufig eine *Loss-of-Function* Mutation zur Folge haben (Le Cong *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um das *MTARC1*-Gen in humanen Zellen auszuknocken. Durch das Einbringen eines Plasmids, das die Information für die sogenannte *Single Guide*-RNA (sgRNA), die die komplementäre DNA-Sequenz und die palindromen, sich wiederholenden Sequenzen trägt, sowie die genetische Information zur Expression der Cas9 trägt, sollte das Exon 2 des *MTARC1*-Gens in humanen Zellen adressiert werden (vgl. 3.1).

Diese durch Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier entwickelte Methode, für die es 2020 einen Nobelpreis gab, hat im Vergleich zu den anderen Methoden den Vorteil, dass hierbei Gene sehr präzise mit einer höheren Effizienz adressiert werden können, sie für annähernd jedes Gen angepasst werden kann und auch multiple Genom-Veränderungen erzielt werden können. Aus diesen Gründen bildet CRISPR/Cas seit 2013 den Goldstandard bei der Gen-Veränderung (Ran *et al.*, 2013).

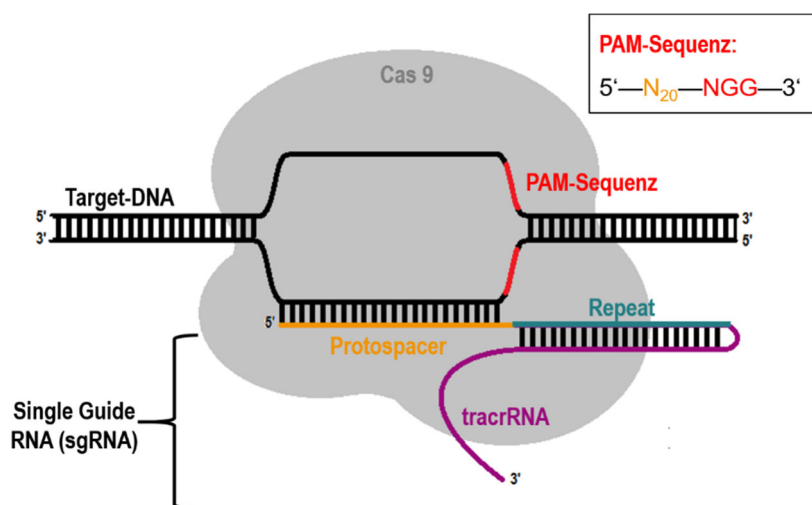
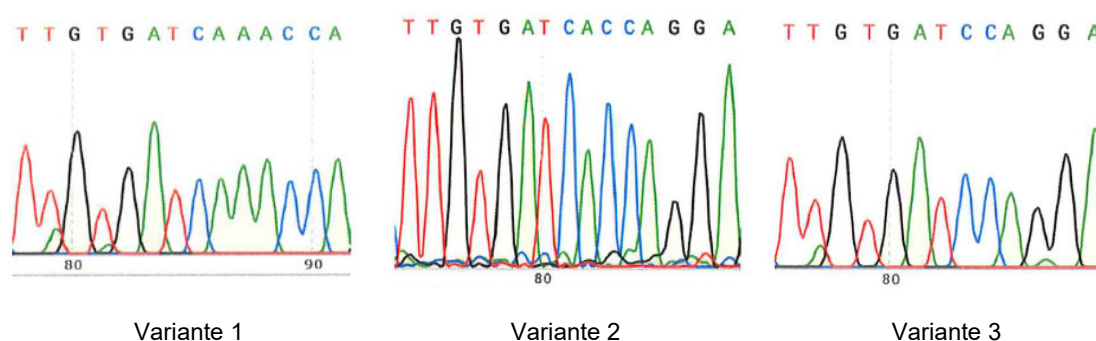


Abb. 4.7: Endonuklease Cas9 bindet über Single Guide RNA (sgRNA) an Ziel-DNA und schneidet 3 Basenpaare oberhalb der PAM-Sequenz nach Open Science - Lebenswissenschaften im Dialog [CC BY-SA 3.0 DE: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>)]

4.2.1 Verifizierung mittels Sequenzierung und Western Blot-Analytik

Die Überprüfung des KOs erfolgte sowohl auf Basis des Genoms durch Sequenzierung sowie auf Basis des Proteoms durch SDS-PAGE und Western Blot Analysen.

Nachdem die Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert, selektiert und anschließend wieder expandiert wurden (vgl. 3.2.3; 3.2.4), wurde die prokaryotische DNA isoliert (vgl. 3.2.5) und zur Sequenzierung durch einen Dienstleister (Eurofin Genomics) versendet. Die Ergebnisse zeigten in allen 3 abgegebenen Proben an der entsprechenden Schnittstelle der Cas9 eine Veränderung der Basensequenz (Abb. 4.8).



MTARC1	511	5'ACCTGCGGGACAGGTTTTGGCTTGTGATCAACCAGGAGGGAAACATGGTT3'
Variante 1	511	5'ACCTGCGGGACAGGTTTTGGCTTGTGATCAAAACCAGGAGGGAAACATGGTT3'
Variante 2	511	5'ACCTGCGGGACAGGTTTTGGCTTGTGATCA__CCAGGAGGGAAACATGGTT3'
Variante 3	511	5'ACCTGCGGGACAGGTTTTGGCTTGTGAT__CCAGGAGGGAAACATGGTT3'

Abb. 4.8: Ausschnitt aus den Sanger-Sequenzierungsdaten 3 unterschiedlicher Proben. Die gesamte Sequenz ist im Anhang unter 7.3 zu finden.

Bei den Zellen der Variante 1 kam es zu einer Insertion einer weiteren Adenin-Base, bei Variante 2 zur Deletion einer Adenin-Base und bei Variante 3 zu einer Deletion eines gesamten Codons (Cytosin-Adenin-Adenin). Die Deletion eines ganzen Codons führt nicht zu dem gewollten *Frameshift*, aus diesem Grund wurden diese Zellen verworfen. Die Klone der Variante 2 wurden dann für weitere Untersuchungen ausgewählt und charakterisiert.

Zur weiteren Überprüfung wurden die HEK-293T Klone erneut expandiert und lysiert, und der *MTARC1*-KO im Western Blot bestätigt (Abb. 4.9).

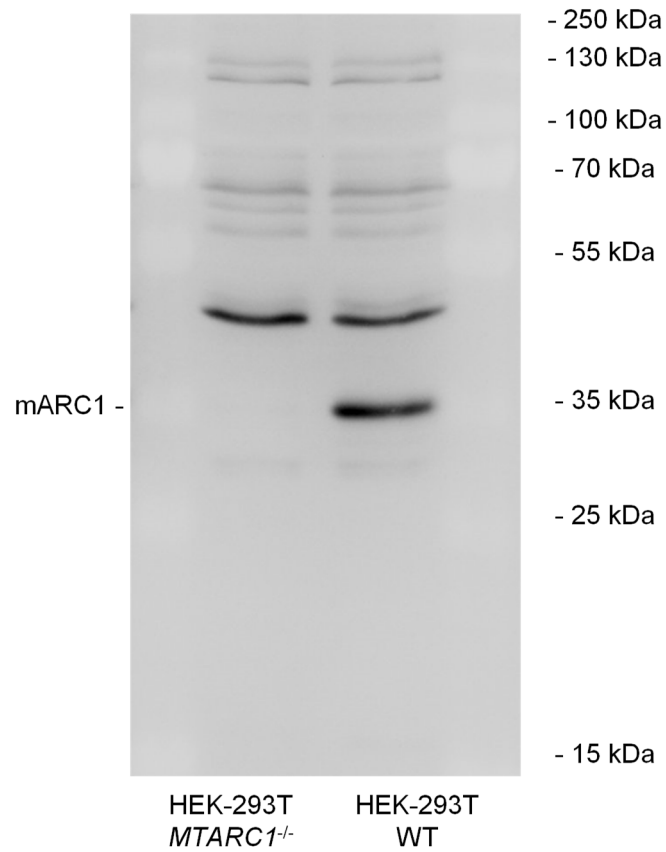


Abb. 4.9: Proteinexpression zur Verifizierung des KOs. *MTARC1*^{-/-} und WT Zellen wurden wie unter 3.2.6 lysiert und (A) Western Blot Analysen unter Verwendung von anti-mARC1-Antikörpern wie unter 3.6 beschrieben durchgeführt. Aufgetragen wurden pro Tasche 36 µg Protein. Die Ladekontrolle ist im Anhang unter 7.1.4 abgebildet.

4.2.2 Auswirkung auf die Zellvitalität

Zur Beurteilung, ob das Fehlen von mARC1 einen Einfluss auf die Zellphysiologie und Zellvitalität hat, wurden die HEK293T *MTARC1*-KO und WT Zellen hinsichtlich ihrer Zellmorphologie, -proliferation und -viabilität untersucht.

Betrachtet man die Zellen unter dem Mikroskop sind rein morphologisch keine Unterschiede zwischen den KO und WT Zellen zu erkennen (Abb. 4.10).

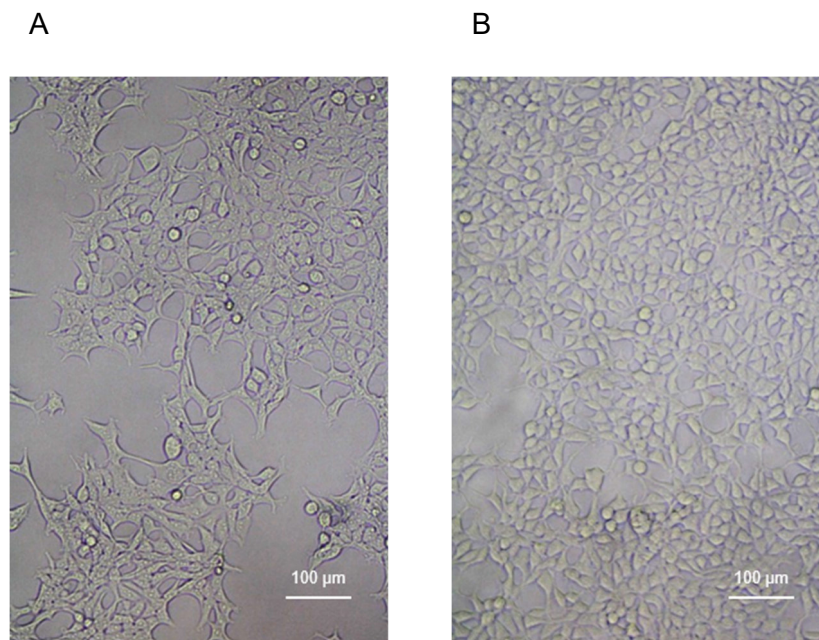


Abbildung 4.10: Zellmorphologie. (A) HEK-293T *MTARC1*^{-/-} Zellen; (B) HEK-293T WT Zellen.

Auffällig hingegen war, dass mARC1-defiziente Zellen ein langsames Wachstum aufzeigten, sodass die Proliferation und Generationszeit genauer untersucht wurde (vgl. 3.2.9). Hierfür wurden die Zellen nach bestimmten Zeitabständen fixiert, die Zellkerne mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33342) angefärbt und anschließend instrumentell gezählt.

HEK-293T *MTARC1*^{-/-} Zellen wiesen eine um den Faktor 1,4 verlangsamte Wachstumsrate auf. Während die KO Zellen eine mittlere Generationszeit von ca. 30 h aufzeigten, lag die berechnete mittlere Generationszeit der WT Zellen bei ca. 22 h (Abb. 4.11).

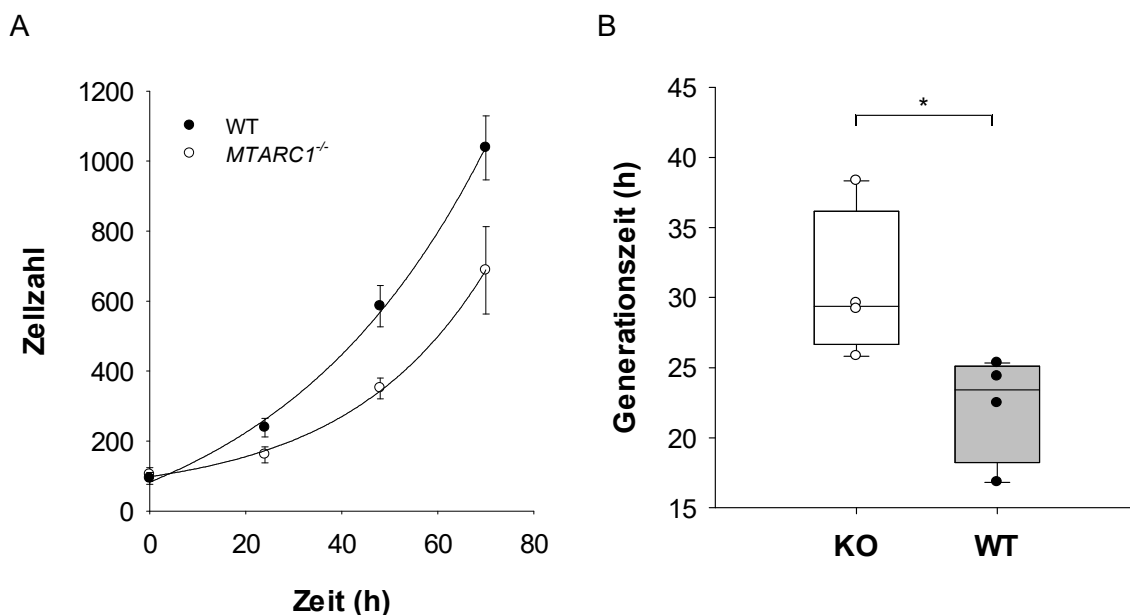


Abb. 4.11: (A) Zellproliferation und (B) berechnete Generationszeit von HEK-293T *MTARC1*-KO (○) und WT (●) Zellen: Die Zellen wurden wie in 3.2.9 beschrieben fixiert, angefärbt und die Zellkerne nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h instrumentell gezählt (vgl. 3.2.9).

Eine weit etablierte Methode zur Bestimmung der Zellviabilität ist das Resazurin-Assay. Dieses Assay beruht auf der Reduktion von Resazurin zu Resorufin, welches dann fluoresziert (vgl. 3.2.7.2). Zum Vergleich wurde zusätzlich das *CellTiter-Glo*[®] Assay verwendet. Dieses beruht auf einer Luciferin/Luciferase-Reaktion und detektiert die vorhandene Menge ATP (vgl. 3.2.7.3). Beide Assays wurden parallel mit derselben Anzahl an *MTARC1*^{-/-} und *MTARC1*^{+/+} Zellen durchgeführt.

Ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Signalintensität war bei beiden Assays bis 25.000 Zellen/Well gegeben, die Nachweisgrenze lag bei 98 Zellen/Well. In folgenden Versuchen wurde daher immer mit einer maximalen Zellzahl von 24.000 Zellen/Well gearbeitet.

Aus den erhaltenen Kurven geht hervor, dass sowohl das Resazurin-, als auch das *CellTiter-Glo*[®]-Assay für die Bestimmung der Zellviabilität in KO und WT Zellen geeignet sind. Bei beiden Assays zeigten die *mARC1*-defizienten Zellen eine annähernd gleiche Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzintensität wie *mARC1*-exprimierende Zellen. Es war demnach klar zu sehen, dass die KO Zellen, neben einer unveränderten Morphologie, auch eine unveränderte Zellviabilität aufweisen.

Bis auf eine verlängerte Generationszeit gibt es also keine Hinweise auf eine beeinträchtigte Zellvitalität durch einen *MTARC1*-KO (Abb. 4.12).

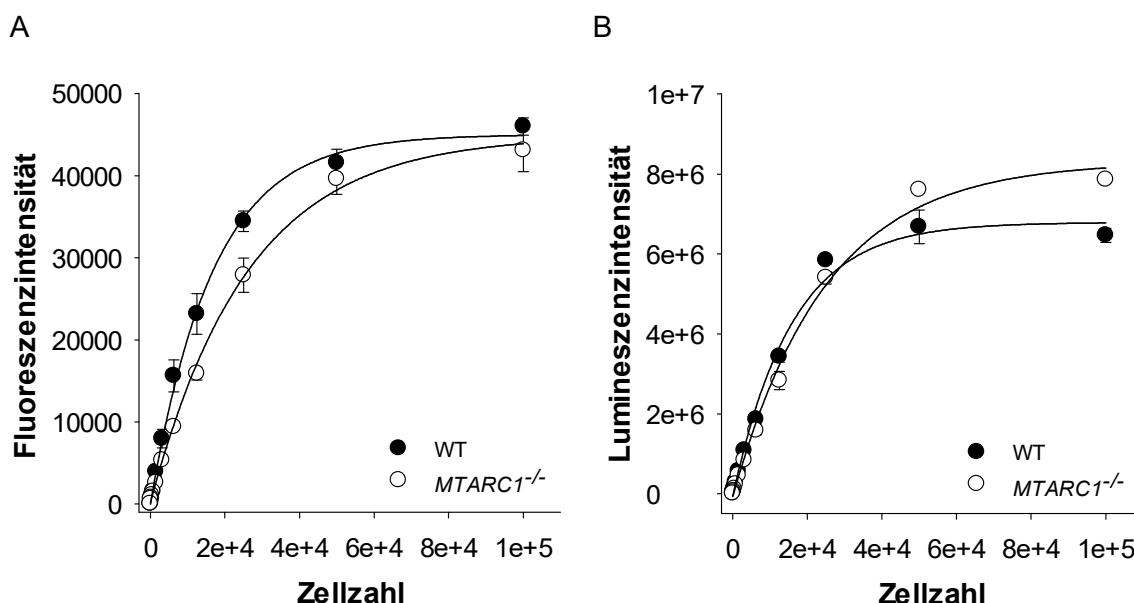


Abb. 4.12: Zelltitration der HEK-293T *MTARC1*-KO (○) und WT (●) Zellen im (A) Resazurin-Assay und (B) CellTiter-Glo®-Assay. Die Assays wurden wie in 3.2.7 beschrieben durchgeführt. Angegeben ist die Zellzahl pro Kavität gegen den die (A) Fluoreszenzintensität bzw. (B) Lumineszenzintensität als Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung.

4.2.3 Auswirkung auf die Reduktaseaktivität

Um die Auswirkung des *MTARC1*-KOs auf die Reduktaseaktivität in HEK-293T Zellen zu überprüfen, wurden Inkubationsstudien mit unterschiedlichen Substraten (Abb. 4.1) durchgeführt.

In Pilotstudien wurde gezeigt, dass eine Konzentration des Lösungsvermittlers DMSO von 1 % keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat (vgl. Anhang 7.4, Abb 7.11). Anschließend wurde die optimale Konzentration der Substrate ermittelt, indem eine serielle 1:2-Verdünnung der Substratlösung für 180 min auf die Zellen gegeben und anschließend die Zellviabilität überprüft wurde. NHC, HAP und GOB haben bereits im μ M-Bereich einen Einfluss auf die Zellviabilität, sodass diese in einer Endkonzentration von 0,1 mM für Reduktase-Assays eingesetzt wurden, BAO, BHA und NANO in durchschnittlichen hohen Endkonzentrationen von 3 mM (vgl. Anhang 7.5). Die Inkubationen wurden dann wie unter 3.7.4 beschrieben durchgeführt. Hierbei konnte gesehen werden, dass alle Substrate durch HEK-293T Zellen reduziert werden. Sehr hohe Umsetzungen konnte bei Inkubationen mit BAO, GOB und NHC gesehen werden, kaum nachzuweisen war eine Reduktion von NANO. Der *MTARC1*-KO führte bei allen Substraten zu einer deutlich verminderten Reduktaseaktivität. Den stärksten Effekt konnte man bei der Reduktion von BAO, NHC und GOB sehen: Inkubationen mit BAO und NANO zeigten keine nachweisbare reduktive Restaktivität. Die gemessenen Umsetzungsraten gegenüber NHC und GOB lagen unter 10 %, die von BHA bei ca. 30 % (Abb. 4.13).

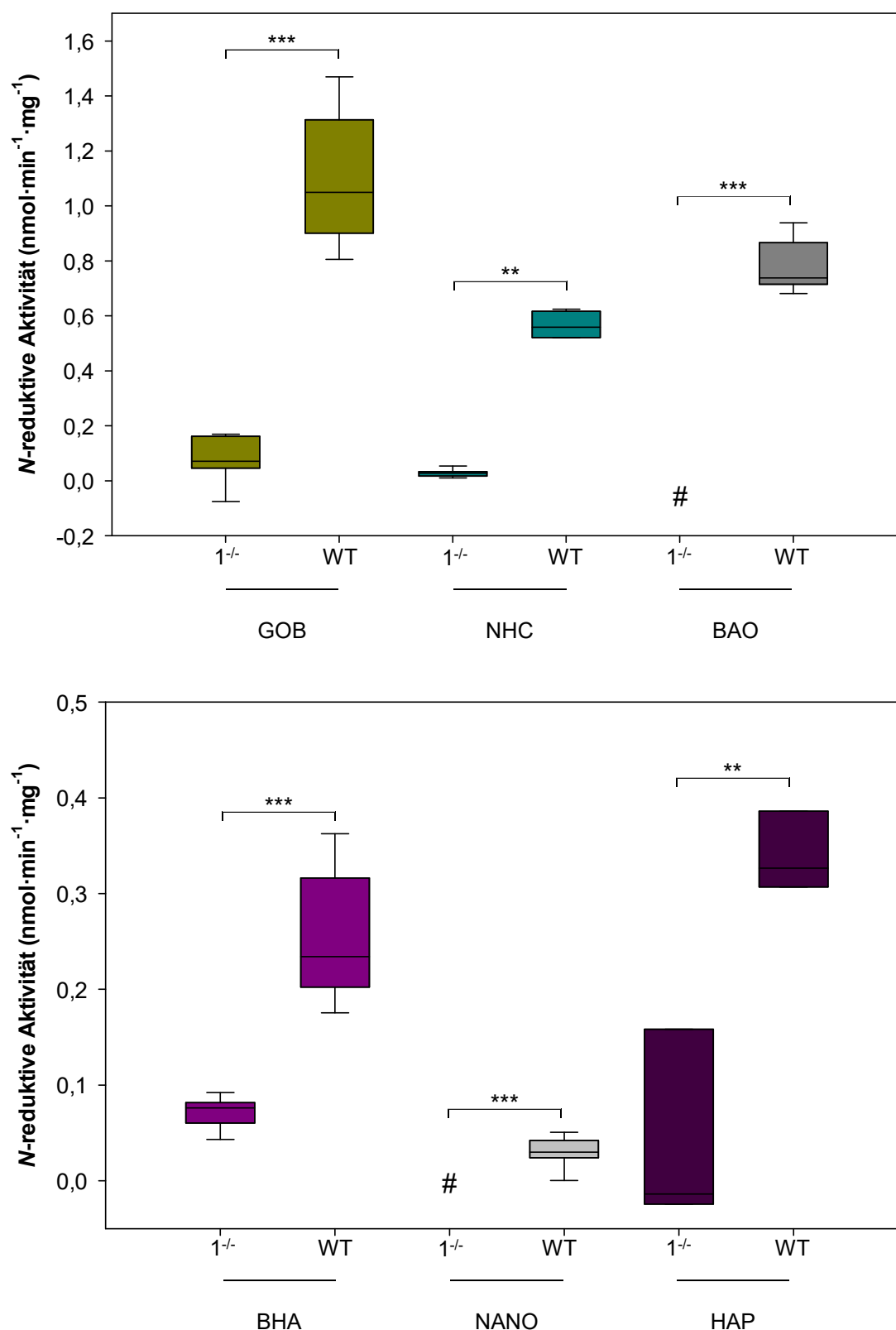


Abb. 4.13: Reduktaseaktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 6$). Die Inkubation wurde wie unter 3.7.4 beschrieben durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels *U*-Test und *t*-Test nachgewiesen. Für jedes Substrat wurden Negativkontrollen ohne Substrat und mit Substrat ohne Zellen durchgeführt und der Wert hiermit korrigiert. #, unterhalb der LOQ ($0,02 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). ***, $p \leq 0,001$; **, $p \leq 0,01$.

4.2.4 Auswirkung auf die Toleranz gegenüber des Mutagens HAP

Um den Einfluss des *MTARC1*-KOs in Hinblick auf die reduktive Detoxifizierung zu untersuchen, wurden die mARC1-defizienten und mARC1-exprimierenden Zellen mit einer *N*-hydroxylierten Nukleobase inkubiert und anhand der Zellmorphologie, -viabilität, -proliferation und -apoptose charakterisiert. Als Substrat wurde HAP ausgewählt, da für dieses die Reduktaseaktivität durch den *MTARC1*-KO auf 12 % reduziert wurde (vgl. 4.2.3).

Mikroskopische Untersuchungen zeigten bereits nach 24 h unter HAP sowohl im WT als auch im KO eine Verminderung der Zell-Zell-Kontakte sowie eine verminderte Konfluenz. In Abb. 4.14 sind repräsentative, mikroskopische Aufnahme von KO und WT Zellen unter 0,5 mM HAP nach unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Zum Vergleich sind ebenfalls Zellen ohne HAP-Behandlung abgebildet, die zur Kontrolle unter gleichen Bedingungen mit ausschließlich DMSO inkubiert wurden.

Die Verminderung der Zell-Zell-Kontakte war in mARC1-defizienten Zellen unter HAP stärker ausgeprägt als in WT Zellen (Abb. 4.14).

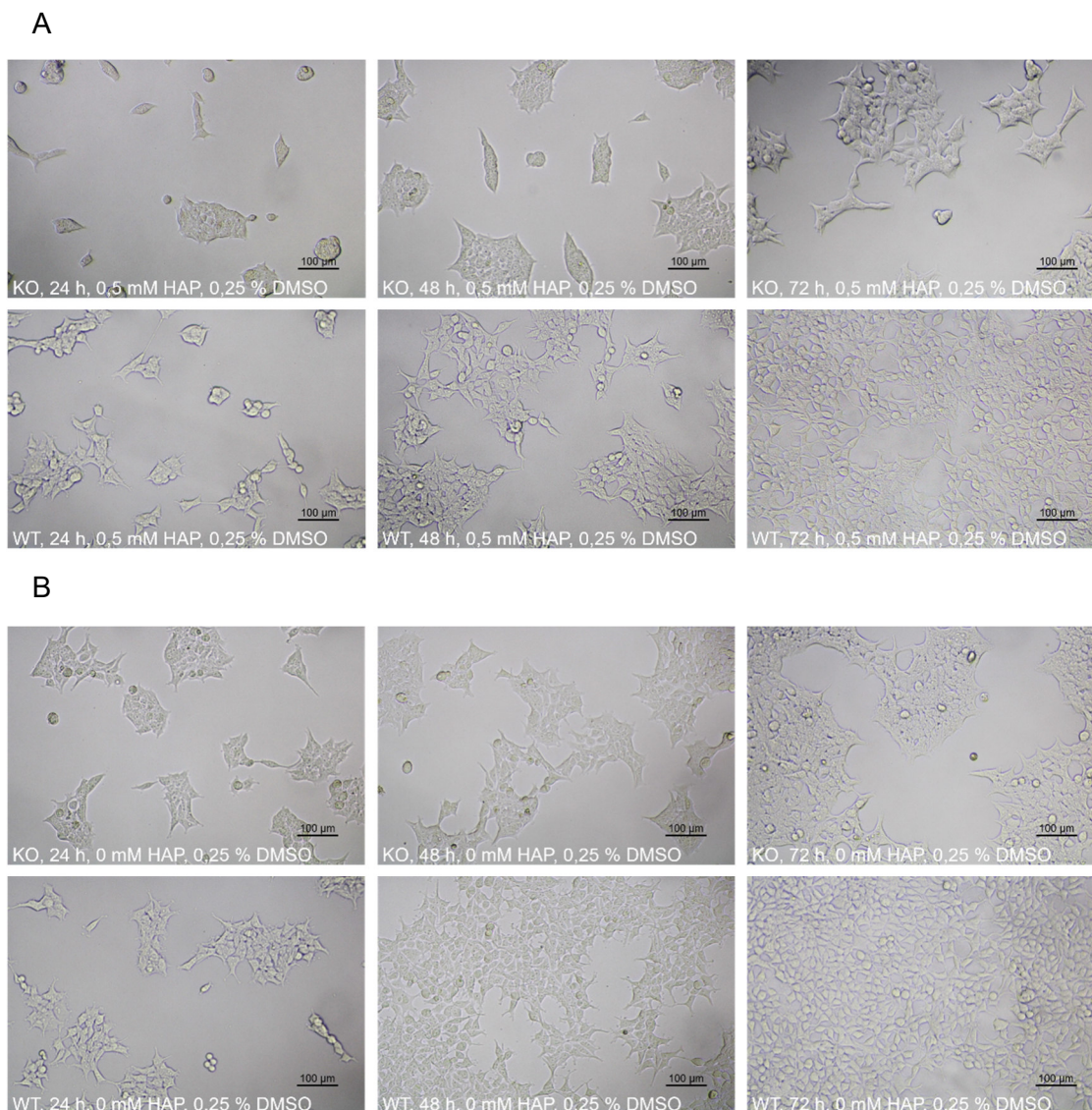


Abb. 4.14: Zellmorphologie von KO und WT Zellen unter HAP. Zellen wurden mit 0 – 2 mM HAP behandelt (vgl. 3.2.10.1) und die Morphologie nach 24 h, 48 h und 72 h mit einem Phasenkontrastmikroskop (20-fache Vergrößerung) beobachtet und fotografiert. (A) KO und WT Zellen unter 0,5 mM HAP; (B) Zellen unter DMSO als Kontrolle.

Die Replikation der DNA ist der entscheidende Schritt bei der Zellteilung. Deshalb sollte untersucht werden, inwiefern die *N*-hydroxylierte Nukleobase HAP als Mutagen die Replikation und damit Zellproliferation stört und ob die mARC1-exprimierenden Zellen einen größeren Schutz gegen dieses Mutagen aufweisen als die mARC1-defizienten Zellen (vgl. 3.2.10.1). Es konnte gezeigt werden, dass die *MTARC1*-KO Zellen bereits bei geringen Konzentrationen HAP im Zellkulturmedium (0,01 mM) eine deutlich verminderte Zellteilungsrate aufwiesen. Dieser Effekt war ebenfalls bei 0,1 mM HAP zu beobachten. Hohe Konzentrationen von HAP führten hingegen dazu, dass das Zellwachstum sowohl der WT als auch der KO Zellen deutlich vermindert war und somit kein Unterschied zu detektieren war (Abb 4.15 A).

Um zusätzlich den Einfluss des Fehlens von mARC1 auf die Viabilität von HEK-293T Zellen gegenüber HAP zu untersuchen, wurden die Zellen unter Behandlung unterschiedlicher Konzentrationen HAP nach 24 h, 48 h und 72 h auf Basis ihrer Fähigkeit, Resazurin zu Resorufin zu reduzieren, verglichen (vgl. 3.2.7.2; 3.2.10.1). Hierbei war erneut ein deutlicher Unterschied zwischen den zwei Zelllinien zu erkennen. Während die HEK-293T WT Zellen erst ab 0,5 mM HAP eine deutlich reduzierte Zellviabilität aufwiesen, war dieser Effekt bei den *MTARC1*-KO Zellen bereits bei 0,01 mM HAP zu beobachten. Erst bei einer Konzentration von 2 mM HAP zeigten beide Zelllinien eine vergleichbare, stark verminderte Zellviabilität (Abb. 4.15 B). Interessant ist hierbei, dass gleichermaßen KO als auch WT Zellen bei einer Konzentration von 0,01 - 0,05 mM HAP eine schlechtere Zellviabilität aufwiesen, als bei höheren Konzentrationen von 0,1 mM bis 1 mM HAP.

Zur Überprüfung des Einflusses von HAP auf die Apoptose der HEK-293T *MTARC1*-KO und WT Zellen wurden die mit HAP behandelten Zellen einer Hoechst 33342-Färbung unterzogen (vgl. 3.2.8). Im Verlaufe der Apoptose kommt es zu einer charakteristischen Kondensation des nukleären Chromatins, gefolgt von einer nukleären Fragmentierung, der Bildung apoptotischen Körperchen und schließlich zu einer zellulären Fragmentierung bzw. Phagozytose der Zelle (Wyllie *et al.*, 1984). Die nukleäre Kondensation ist mittels Hoechst 33342-Farbstoff, der als nicht-interkalierender DNA-Farbstoff an die *Minor Grooves* der Doppelhelix bindet, gut zu detektieren (Watkins *et al.*, 1996). Nach 40 h Inkubation mit 2 mM HAP konnten ebendiese charakteristischen morphologischen Veränderungen detektiert werden. Diese Chromatinkondensation war vermehrt im *MTARC1*-KO zu beobachten, entsprechende Zellen wurden mit weißen Pfeilen markiert (Abb 4.15 C).

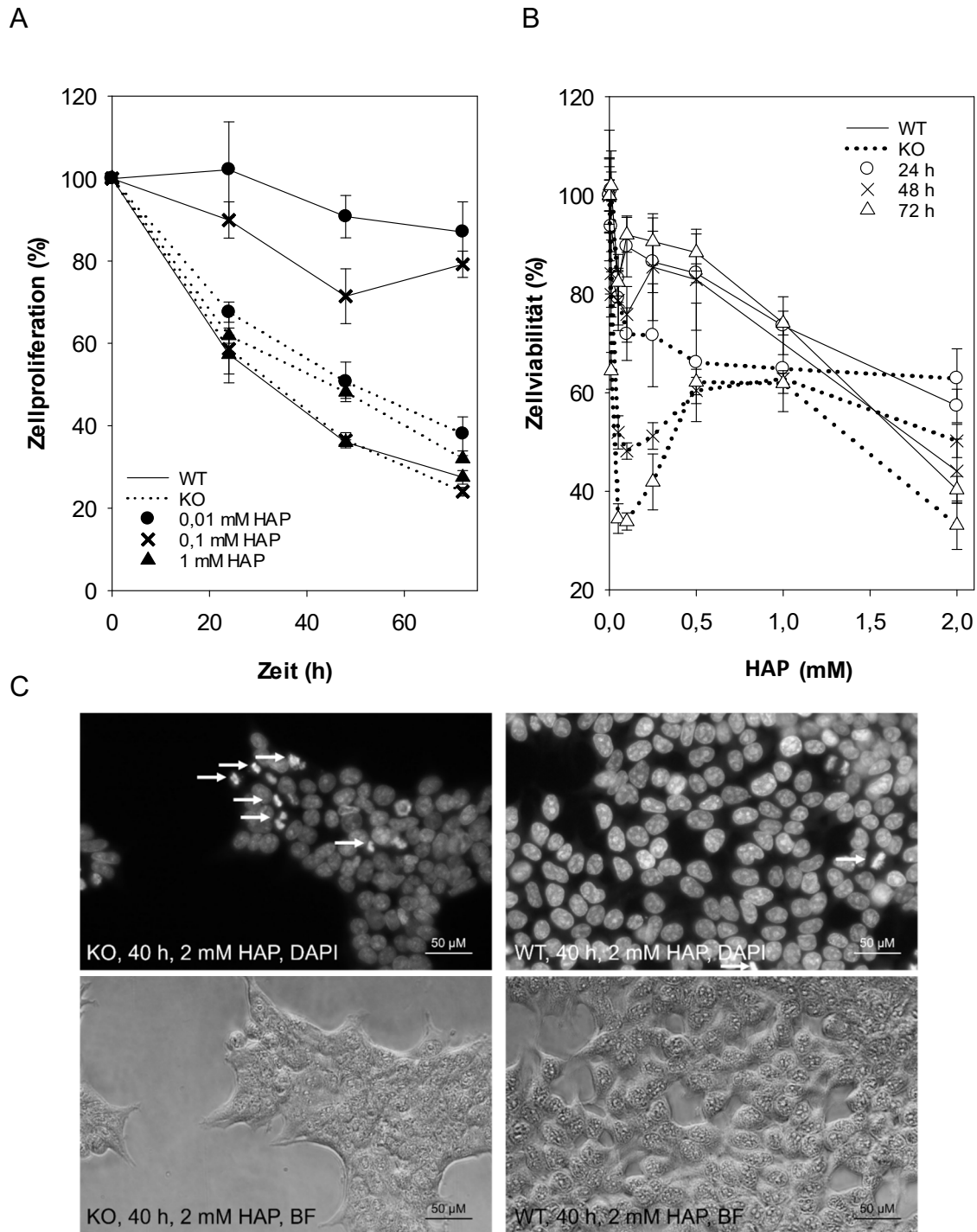


Abb. 4.15: Zellvitalität von KO und WT Zellen unter der Behandlung von HAP
 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen HAP behandelt und nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht (vgl. 3.2.10.1). (A) Zellproliferation. Die Zellzahl wurde wie in 3.2.9 beschrieben nach definierter Zeit bestimmt; (B) Zellviabilität. Viable Zellen wurden mittels Resazurin-Assay bestimmt (vgl. 3.2.7.2); Zellproliferation und -viabilität wurden relativ zu Zellen, die ausschließlich mit entsprechenden Konzentrationen DMSO behandelt wurden betrachtet. (C) Hoechst 33342-Färbung apoptotischer Zellen. Die Färbung und Detektion erfolgte wie in 3.2.8 beschrieben. Dargestellt sind Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung. Die weißen Pfeile markieren beispielhaft Zellkerne mit deutlicher Chromatinkondensation.

4.2.5 Auswirkung auf die Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid

Neben *N*-oxygenierten Substraten konnte 2020 erstmalig die NADH-abhängige Umsetzung von Wasserstoffperoxid durch mARC detektiert werden (Indorf, 2020b). Durch diese Entdeckung wird eine neue physiologische Funktion von mARC diskutiert: Die Beteiligung am antioxidativen Stoffwechsel.

Diese Beteiligung galt es nun *in cellulo*, d.h. unter Berücksichtigung der komplexen Zellphysiologie, zu untersuchen. Eine unterschiedliche Reduktaseaktivität der *MTARC1*^{-/-} und WT Zellen führt, analog zu HAP, zu einer unterschiedlichen H₂O₂-vermittelten Zytotoxizität. KO und WT Zellen wurden daher mit unterschiedlichen Konzentrationen H₂O₂ (10 µM – 100 µM) behandelt (vgl. 3.2.10.2) und die Sensibilität der Zellen gegenüber H₂O₂ hinsichtlich der Zellmorphologie, -viabilität, -proliferation und -apoptose verglichen.

Um eine maximale oxidative Wirkung von H₂O₂ zu erreichen, wurde dem Zellkulturmedium 16 h vor H₂O₂-Exposition 0,3 mM BSO hinzugegeben. BSO ist ein Inhibitor der Glutathionsynthese. Somit wurde der antioxidative Einfluss des GSH-Systems verringert. Lichtmikroskopische Untersuchungen konnten eine veränderte Zellmorphologie und daher eine gesteigerte Sensibilität der *MTARC1*-KO Zellen gegenüber H₂O₂ ab einer Konzentration von 20 µM zeigen. Nach 48 h waren einige KO Zellen bei dieser Konzentration bereits weniger adhärent und konfluent, einige Zellen wirkten apoptotisch. Stärker war dies bei einer extrazellulären H₂O₂ Konzentration von 30 µM zu beobachten. Hier zeigten KO Zellen bereits kaum noch Zell-Zell-Kontakte und Adhärenz auf, während die WT Zellen morphologisch den KO Zellen unter 20 µM H₂O₂ entsprachen (Abb. 4.16).

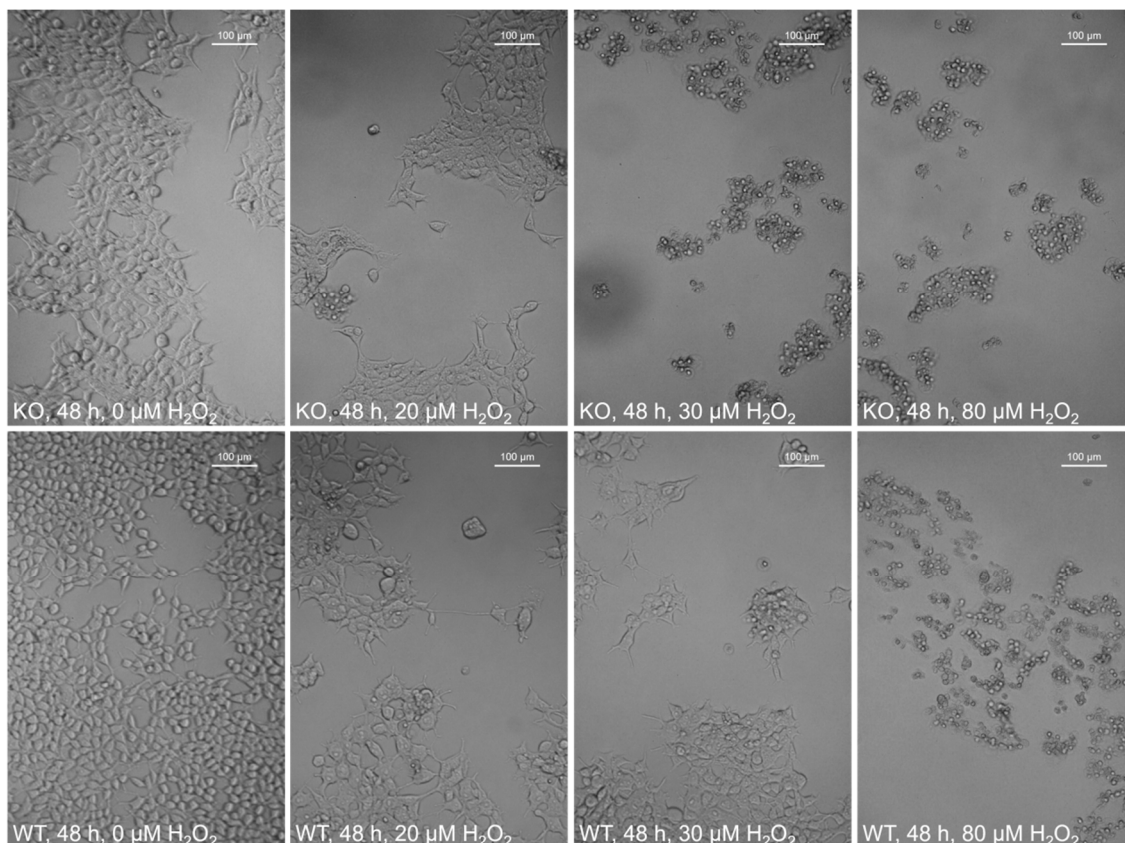


Abb. 4.16: Zellmorphologie unter H_2O_2 . *MTARC1*-KO und WT Zellen wurden 16 h mit 0,3 mM BSO inkubiert, anschließend mit 0 – 2 mM H_2O_2 behandelt (vgl. 3.2.10.2). Die Morphologie wurde nach 48 h mit einem Phasenkontrastmikroskop (20-fache Vergrößerung) beobachtet und fotografiert.

Im Weiteren wurde der Einfluss von H_2O_2 auf die Zellteilung betrachtet. Eine extrazelluläre Konzentration von 10 μM H_2O_2 zeigten keine Beeinträchtigung der Zellproliferation sowohl der KO als auch der WT Zellen. Dies sah bei einer H_2O_2 -Konzentration von 20 μM extrazellulär bereits anders aus. Diese Konzentration führte nach 24 h zu einer messbaren Beeinträchtigung der Proliferation von WT Zellen und KO Zellen im Vergleich zu Kontrollen ohne H_2O_2 -Behandlung. Obgleich eine Beeinträchtigung beider Ziellinien zu detektieren war, konnte ein Unterschied zwischen KO und WT gesehen werden. Die Anzahl der *mARC1*-defizienten Zellen war nach 24 h bei ca. 50 %, die der *mARC1*-exprimierenden Zellen bei ca. 70 % bezogen auf Zellen, die ausschließlich mit Medium behandelt wurden. Nach 72 h waren sowohl WT als auch KO Zellen auf ca. 35 % reduziert.

Bei einer H_2O_2 -Konzentration von 30 μM fand weder bei den KO, noch bei den WT Zellen eine messbare Zellteilung statt (Abb. 4.17).

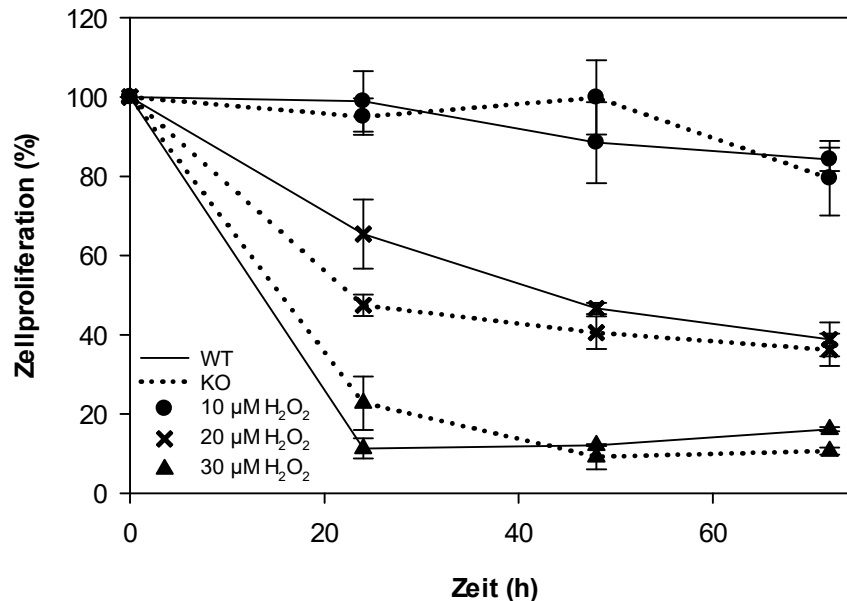


Abb. 4.17: Zellproliferation. Zellen wurden, ohne Vorinkubation mit BSO, mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 µM, 20 µM, 30 µM) H₂O₂ behandelt (vgl. 3.2.10.2). Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die Zellzahl wie in 3.2.9 beschrieben bestimmt.

Diese Beobachtung konnte im Resazurin-basierten Zellviabilitäts-Assay bestätigt werden. Unter dem Einfluss von BSO und bei einer Konzentration von 10 µM H₂O₂ im Medium konnte kein Unterschied zwischen KO und WT, weder nach 8 h, noch nach 24 h oder 48 h, gesehen werden. Bei höheren extrazellulären H₂O₂-Konzentrationen hingegen konnte bereits nach 8 h ein deutlicher Unterschied zwischen *MTARC1*-KO und WT Zelllinien festgestellt werden. Während *mARC1*-exprimierende Zellen bei Inkubationen mit 20 µM H₂O₂ eine nahezu unveränderte Viabilität zeigten, war die Viabilität der KO Zellen nach 8 h bereits auf 80 % reduziert. Zu späteren Zeitpunkten war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt, nach 24 h zeigten KO Zellen eine Viabilität von ca. 65 %, WT hingegen eine von ca. 95 %. Die Anzahl der lebenden *mARC1*-defizienten HEK-293T Zellen nahm über die betrachtete Zeitspanne der Inkubation rapide ab. Nach 48 h konnte ab einer Konzentration von 30 µM keine Zellviabilität der KO Zellen mehr gemessen werden, während WT-Zellen noch ca. 70 % Zellviabilität aufwiesen. Erst ab H₂O₂-Konzentrationen zwischen 70 µM und 80 µM war keinerlei Zellviabilität der *mARC1*-exprimierenden Zellen mehr zu messen (Abb. 4.18 A). Inkubationen ohne BSO konnten einen etwas schwächeren Effekt, dennoch eine verminderte Anzahl viabler KO Zellen unter H₂O₂ im Vergleich zu WT Zellen bestätigen (Abb. 4.18 B).

Mithilfe der Hoechst 33342-Färbung konnte gesehen werden, dass es bei den HEK-293T *MTARC1*-KO Zellen, die mit 30 μM H_2O_2 behandelt wurden, im Vergleich zu den WT Zellen vermehrt zur Chromatinkondensation im Zellkern kam und sich somit mehr Zellen in der Apoptose befanden (Abb. 4.18 C).

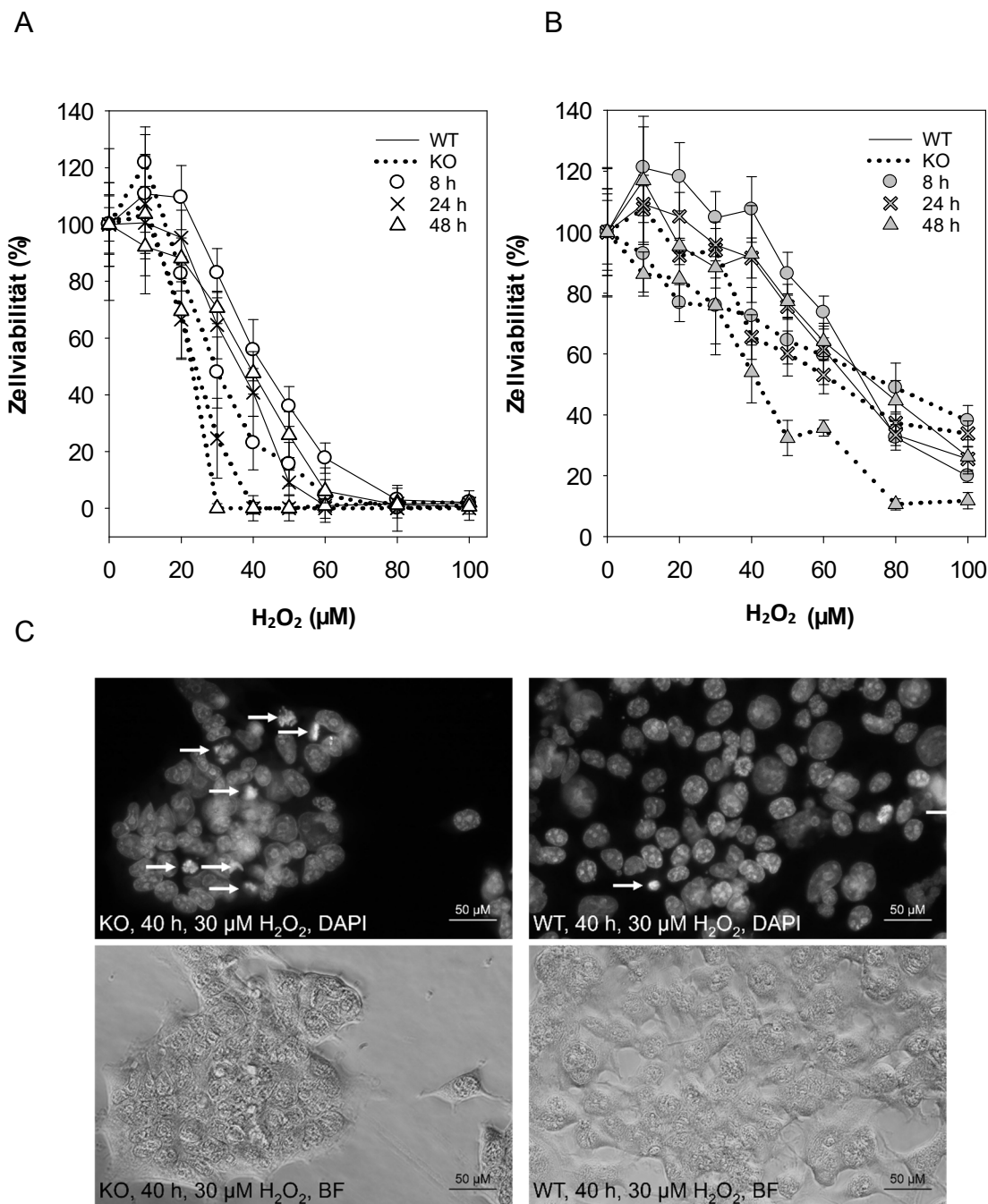


Abb. 4.18: Zellviabilität und Hoechst 33342-Färbung. Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen H_2O_2 behandelt und nach 8 h, 24 h, 48 h und 72 h untersucht (vgl. 3.2.10.2). Viable Zellen wurden mittels Resazurin-Assay bestimmt (vgl. 3.2.7.2), Zellviabilität wurde relativ zu Zellen ohne H_2O_2 -Behandlung betrachtet. (A) Zellviabilität nach vorheriger Behandlung mit 0,3 mM BSO; (B) Zellviabilität ohne vorherige Behandlung mit BSO; (C) Hoechst-Färbung apoptotischer Zellen (vgl. 3.2.8). Dargestellt sind Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung. Die weißen Pfeile markieren beispielhaft Zellkerne mit deutlicher Chromatinkondensation.

4.2.5.1 Auswirkung auf Biomarker des oxidativen Stresses

Da mARC offensichtlich eine protektive Funktion gegenüber H_2O_2 erfüllt, wurde im Weiteren mithilfe eines *Cellular ROS Assay Kits* (vgl. 3.2.10.3) und eines *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit*[®] (vgl. 3.2.10.4) die Konzentration von ROS und LPO in den KO und WT Zellen bestimmt. Hierbei konnte gesehen werden, dass der *MTARC1*-KO unter jeder Bedingung zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen ROS führt. Dieser Effekt konnte auch ohne dem Hinzugeben einer Noxe gesehen werden. Durch den Zusatz von 10 μM Antimycin A, einem Hemmstoff der mitochondrialen Atmungskette, war der ROS-Gehalt in den Zellen am höchsten. Interessanterweise wiesen *MTARC1*^{-/-} und *MTARC1*^{+/+} Zellen, die mit 50 mM Glucose oder 20 μM H_2O_2 über 24 h behandelt wurden, ähnlich hohe Spiegel an ROS auf wie die Kontrollen, die ausschließlich mit Medium behandelt wurden (Abb. 4.19 A). Betrachtet man die Konzentration an LPO in den Zellen, so war kein signifikanter Unterschied unter normalen Kulturbedingungen zu detektieren. Zusätzlich wurden Inkubationen mit 20 μM H_2O_2 durchgeführt, die ebenfalls keinen Unterschied zwischen *MTARC1*^{-/-} und *MTARC1*^{+/+} aufzeigten (vgl. Abb. 4.19 B).

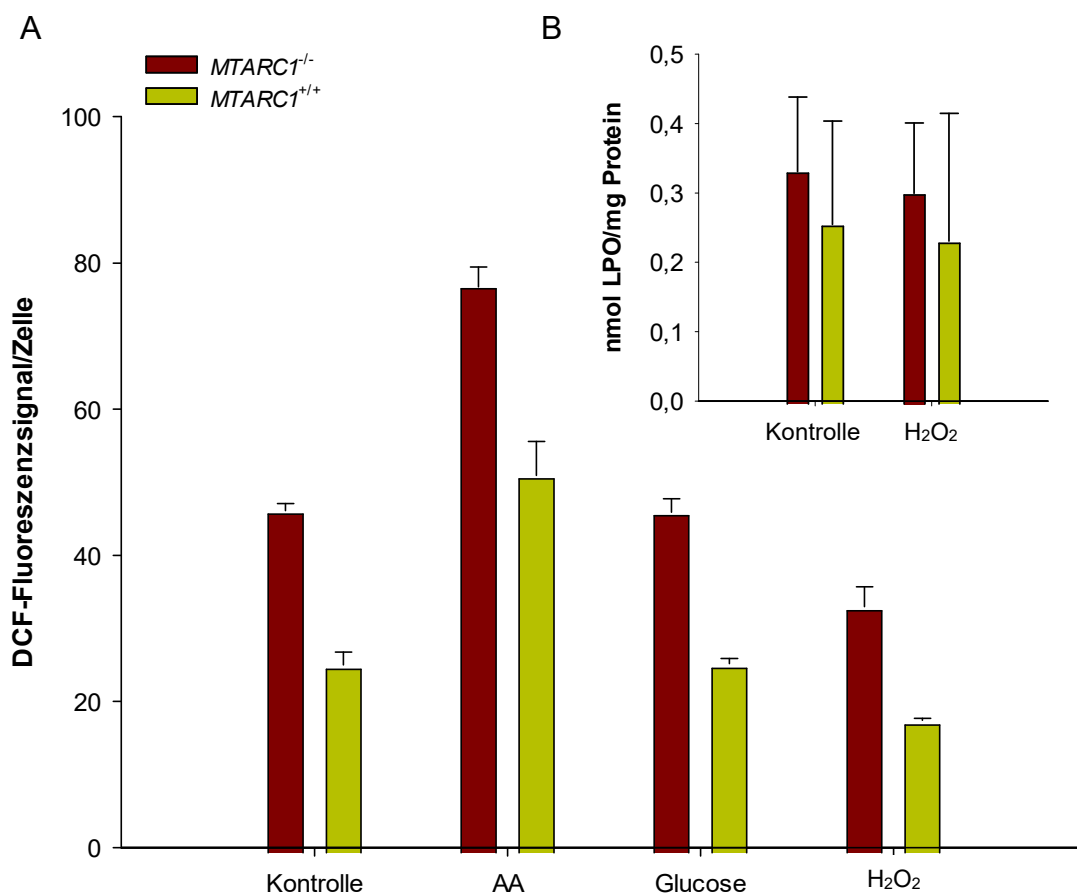


Abb. 4.19: Intrazellulärer ROS und LPO Gehalt. (A) Zur ROS-Konzentration proportionales Fluoreszenzsignal bezogen auf die Zellzahl als Mittelwert \pm Standardabweichung einer Doppelbestimmung (vgl. 3.2.10.3). (B) Bestimmung der LPO-Konzentration bezogen auf die Proteinmenge als Mittelwert \pm Standardabweichung einer Doppelbestimmung (vgl. 3.2.10.4).

4.3 Untersuchung einer hochkalorischen Ernährung in mARC-defizienten Mausmodellen

Das *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC), welches sich zum Ziel gesetzt hat, über den KO eines jeden murinen proteincodierenden Gens die Funktion des jeweiligen Proteins zu ergründen, hat bereits in Hochdurchsatz-Screenings für die *MTARC2*-KO Maus einen erhöhten Schreckreflex, eine verminderte Präpulshehmung sowie ein vermindertes Körpergewicht beobachten können (Dickinson *et al.*, 2016). Entsprechende Daten wurden zu *MTARC1*-KO Mäusen bisher nicht erhoben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mARC1- und mARC2-defiziente Mäuse charakterisiert. *MTARC2*-KO Mäuse wurden gemeinnützig von der EMMA zur Verfügung gestellt, *MTARC1*-KO Mäuse wurden durch einen Dienstleister generiert und kommerziell erworben (vgl. 3.3).

Beide homozygoten Mausstämme waren lebensfähig und fruchtbar und wiesen keine offensichtlichen physiologischen Mängel auf.

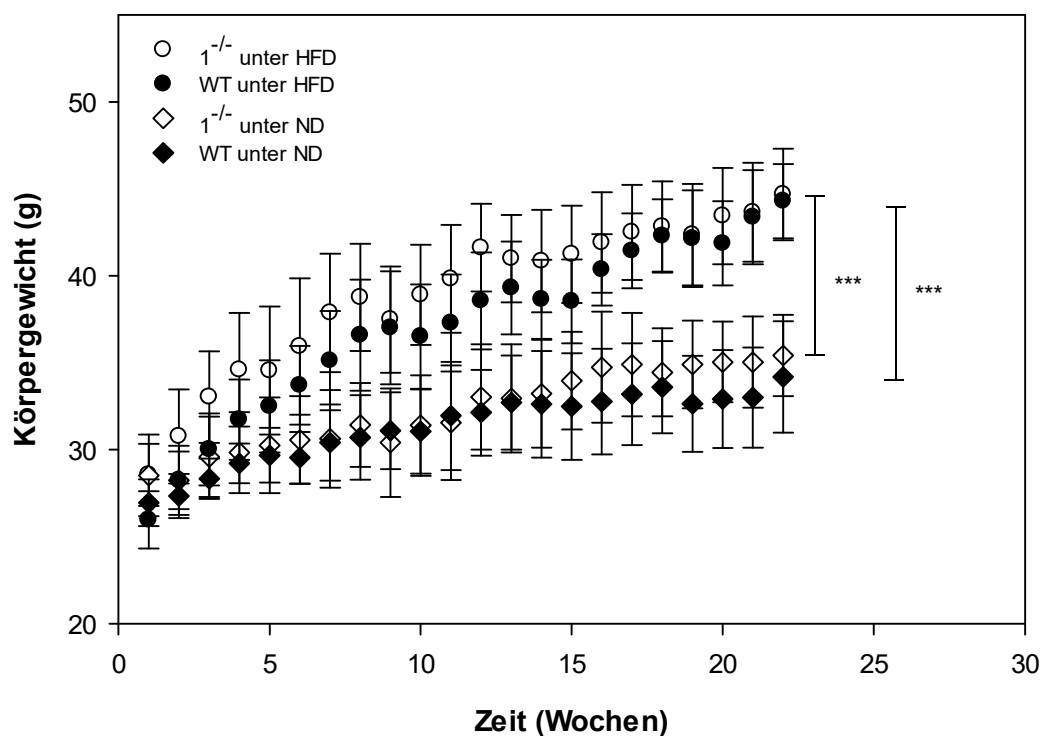
4.3.1 Auswirkung auf das Körpergewicht

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei separate Studien zur Körpergewichtszunahme der KO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen unter normokalorischer und hochkalorischer Diät durchgeführt. Es wurden in einer Studie die *MTARC2*-KO Mäuse über eine *High-Fat Diet*, in einer zweiten die *MTARC1*-KO Mäuse über eine *Western Diet* mit WT Mäusen verglichen (vgl. 3.3.2).

Unter einer hochkalorischen Diät nahmen die Tiere aller Gruppen signifikant an Körpergewicht zu, wenn sie mit den entsprechenden Tieren unter einer normokalorischen Diät verglichen wurden. Die Gewichtszunahme der mARC1-defizienten Mäuse war relativ vergleichbar zu der der WT Mäuse sowohl unter einer normokalorischen Diät als auch unter einer *Western Diet* (Abb. 4.20 A). Bei Betrachtung der mARC2-defizienten Mäuse hingegen war die Gewichtszunahme deutlich schwächer ausgeprägt (WT: + 49 %; *MTARC2*-KO: + 30 %). Es war bereits unter einer ND zu erkennen, dass die *MTARC2*-KO Mäuse über die gesamte Zeit deutlich weniger Körpergewicht aufwiesen als die WT Mäuse.

Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht zwischen *MTARC2*-KO unter HFD und WT Mäusen unter ND detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die *MTARC2*-KO Mäuse resistent gegen eine HFD-induzierte Fettleibigkeit sind (Abb. 4.20 B).

A



B

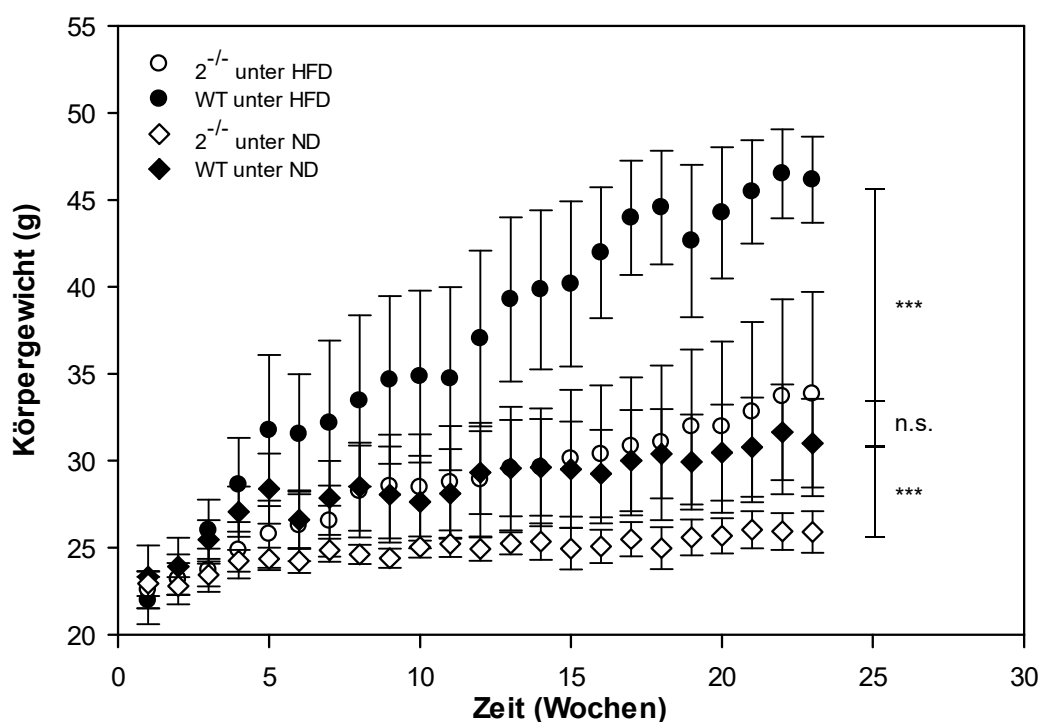


Abb. 4.20: Gewichtszunahme der (A) $MTARC1^{-/-}$ ($1^{-/-}$), (B) $MTARC2^{-/-}$ ($2^{-/-}$) und WT Mäuse. Es wurden männliche Mäuse verwendet, die zu Beginn der Studie ca. 10 Wochen alt waren ($n \geq 7$). Angegeben ist das Körpergewicht als Mittelwert \pm Standardabweichung jeder Behandlungsgruppe über einen Zeitraum von ≥ 22 Wochen (vgl. 3.3.2). Die Signifikanz wurden am Ende des Experiments mittels U -Test überprüft. ***, $p \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant.

Aufgrund dieses ausgeprägten Phänotyps der *MTARC2*-KO Mäuse wurden die weiteren Analysen zunächst mit den *mARC2*-defizienten Mäusen durchgeführt. Entsprechende Daten mit *MTARC1*^{-/-} Mäusen lagen beim Verfassen dieser Arbeit leider noch nicht vor.

4.3.2 Auswirkung auf klinisch-chemische Laborparameter inklusive Körpertemperatur

Serumparameter sind ein häufiges diagnostisches Merkmal, anhand deren der Gesundheitszustand eines Patienten beurteilt und überwacht werden kann. Insbesondere bei Stoffwechselerkrankungen finden sie oft Anwendung. Im Rahmen dieser Tierstudie war vor allem der Lipidstatus sowie der Zustand der Leber von hohem Interesse, sodass die Konzentrationen der Parameter HDL, Triglyceride, Gesamtcholesterin, Glucose, ALT und γ GT in den Seren der Tiere gemessen wurden.

Die klinisch-chemischen Messungen der Seren zeigten, dass die Leberwerte der WT Mäuse unter einer hochkalorischen Diät deutlich anstiegen und auf eine Schädigung des Leberparenchyms hinweisen. Die Serumkonzentrationen von γ GT und ALT waren in Serumproben von WT Mäusen signifikant erhöht. Im Gegensatz hierzu zeigten *mARC2*-defiziente Mäuse keine signifikant erhöhten ALT- und γ GT-Werte in Serumproben und somit eine *MTARC2*-KO-vermittelte hepatoprotektive Wirkung. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das Fehlen von *mARC2* einen Effekt auf den Stoffwechsel der Tiere hat. So konnte in *mARC2*-defizienten Mäusen unabhängig von der Nahrungsquelle (HFD, ND) signifikant erniedrigte Gesamtcholesterinwerte und signifikant erhöhte Glucosekonzentrationen beobachtet werden. Unter ND, jedoch nicht unter HFD, waren die Triglyceride und die HDL in *MTARC2*-KO Mäusen signifikant erniedrigt. Die mithilfe der Friedewaldformel errechnete LDL-Konzentration war ebenfalls in den *mARC2*-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu den *mARC2*-defizienten Mäusen unter HFD signifikant erhöht. Interessanterweise konnte eine Hyperthermie der *MTARC2*^{-/-} Mäuse beobachtet werden, es war eine um durchschnittlich 1 - 2 °C erhöhte Körpertemperatur zu messen (Abb. 4.21).

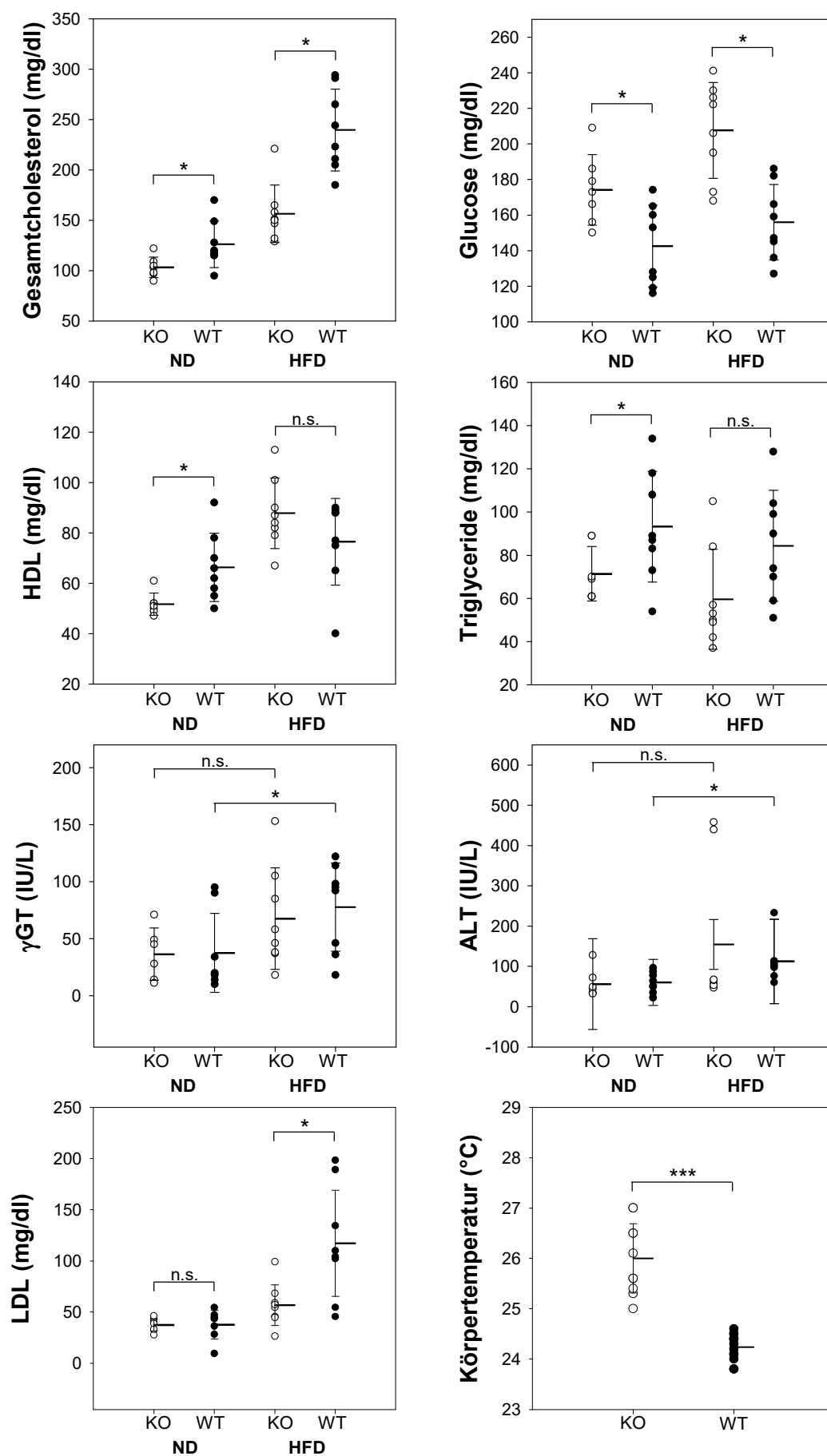


Abb. 4.21: Serumparameter und Körpertemperatur. Serumparameter von männlichen Mäusen nach 23-wöchentlicher HFD/ND-Studie ($n = 8$) (vgl. 3.3.3). LDL-Serumkonzentrationen berechnet nach Friedewald. Körpertemperatur entsprechend 3.3.1 gemessen ($n \geq 10$). Die Signifikanz wurden mittels t -Test überprüft. n.s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

4.3.3 Auswirkung auf die Leberhistologie

Basierend auf den klinisch-chemischen Daten wurde nachfolgend die Leber als zentrales Stoffwechselorgan weiter charakterisiert. Es wurde in jeder Versuchsgruppe eine Leberhistologie durchgeführt (vgl. 3.3.4), die eine mikrovesikuläre Steatose und eine hepatocelluläre Ballonbildung bei WT-Mäusen unter einer hochkalorischen Diät detektierte. Dieses pathologische Bild zeigte sich jedoch nicht im Leberparenchym von *mARC2*-defizienten Mäusen. Somit konnte auch hier eine KO-vermittelte hepatoprotektive Wirkung beobachtet werden (Abb. 4.22).

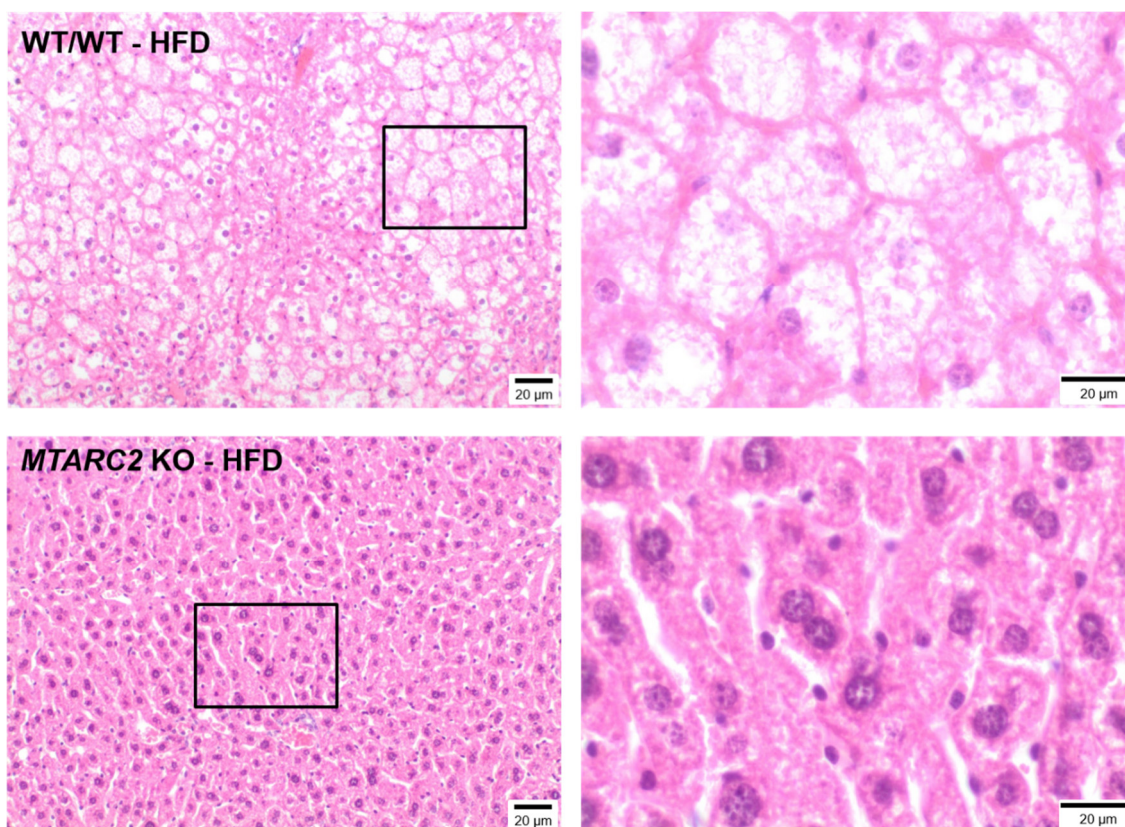


Abb. 4.22: Leberhistologie. Repräsentative Leberhistologie von WT und *MTARC2*-KO Mäusen unter HFD am Ende der 23-wöchigen Studie, gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin (20-fach Vergrößerung).

4.4 Auswirkung des humanen mARC1 auf den Lipidstoffwechsel

4.4.1 Auswirkung der Variante A165T auf die Reduktaseaktivität von Fettgewebekomponenten

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hannele Yki-Järvinen zeigte in einer kürzlich veröffentlichten Studie, bei der 160 fettleibige homo- und heterozygote Träger sowie 209 Nicht-Träger dieser Variante untersucht wurden, dass sie mit einem geringeren Schweregrad einer NAFLD assoziiert ist (Luukkonen *et al.*, 2020).

Im Rahmen einer Kooperation wurden von ebendieser Arbeitsgruppe humane Proben zur Verfügung gestellt, um zu überprüfen, ob die Variante eine beeinträchtigte enzymatische Reduktaseaktivität aufweist. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von humanem Gewebe konnte nur Fettgewebe und nicht Lebergewebe untersucht werden.

Mithilfe von SDS-PAGE und Western Blot konnte eine mARC1-Expression eindeutig in allen überprüften individuellen Fettgeweben detektiert werden. Dabei konnte eine sehr heterogene Proteinexpression beobachtet werden, ohne jedoch einen Hinweis auf eine verminderte oder erhöhte Expression der A165T Variante im Vergleich zum WT aufzuzeigen (Abb. 4.23).

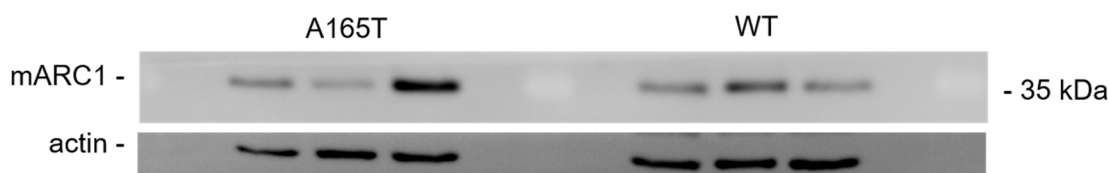


Abb. 4.23: Proteinexpression von mARC1 in humanem Fettgewebe. Die Proteinexpression von jeweils 3 individuellen Fettgewebeproben wurde immunologisch mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse unter Verwendung des anti-mARC1-Antikörpers untersucht (vgl. 3.6). Aufgetragen wurden jeweils 14,4 µg Protein. Die kompletten Western Blots sowie Ladekontrollen sind im Anhang unter 7.1.4 abgebildet. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit wurde auf eine quantitative Bestimmung verzichtet.

Für die Untersuchung der *N*-reduktive Aktivität der Gewebeproben wurden, neben dem Modells substrat BAO, Substrate verwendet, die z.T. exklusiv durch mARC1 umgesetzt werden, wie ANO und Hydroxyharnstoff (HU), oder Substrate, die dominant durch hmARC1 umgesetzt werden, wie NHC und BHA.

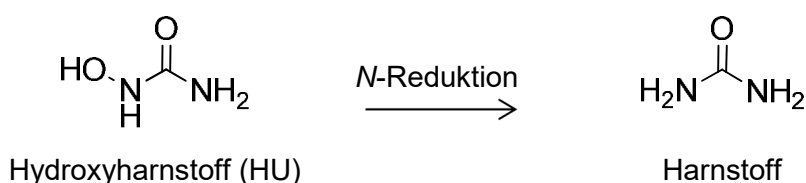


Abb. 4.24: Reduktion von Hydroxyharnstoff zu Harnstoff (Indorf *et al.*, 2020)

Die Inkubationen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Umsetzungsrate des A165T Fettgewebes zum WT Fettgewebe. Somit konnte keine Beeinträchtigung der Reduktaseaktivität durch den SNP detektiert werden. Interessanterweise waren ungewöhnlich hohe Umsetzungsraten des *N*-Oxids ANO zu beobachten. Bisherige *in vitro* Testungen mit rekombinanten Enzymen und murinem Leber-, Nieren- und Lungengewebe zeigten vielfach höhere Umsetzungsraten für BAO im Vergleich zu ANO (vgl. Abb. 4.2; Abb. 7.6).

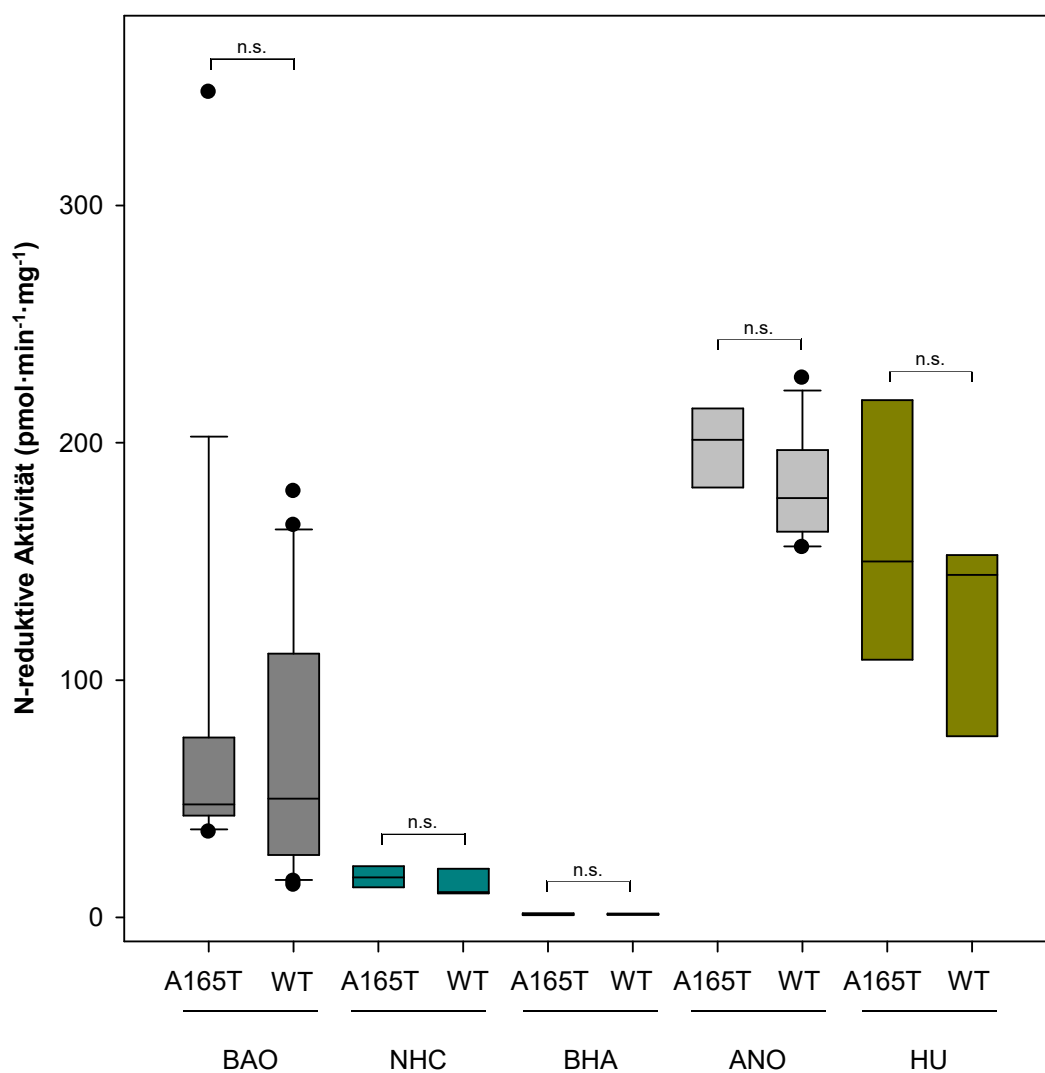


Abb. 4.25: Reduktaseaktivität von A165T- und WT Fettgewebe. Gewebe von WT- und A165T Proben wurde separat homogenisiert und über eine Zeitspanne von 60 - 120 min inkubiert ($n \geq 10$) (vgl. 3.7.3). Die Bestimmungsgrenze betrug $0,02 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Die statistische Signifikanz wurde mittels *U*-Test und *t*-Test überprüft. Für jedes Substrat wurden Negativkontrollen ohne NADH und ohne Protein durchgeführt und das Ergebnis hiermit korrigiert. n.s., nicht signifikant.

4.4.2 Auswirkung des *MTARC1*-KOs auf die Lipidakkumulation in der Zellkultur

Neben humanem Fettgewebe wurden ebenfalls mARC1-defiziente humane Zellen untersucht.

HEK-293T *MTARC1*^{-/-} und *MTARC1*^{+/+} Zellen wurden zur Charakterisierung mit *Nile Red*, einem lipophilen fluoreszierenden Farbstoff, angefärbt (vgl. 3.2.11). Die Fluoreszenz ist hierbei von den Lipiden und ihrer Hydrophobizität abhängig, d.h. amphiphile Lipide wie Phospholipide, die häufig in der Membran zu finden sind, fluoreszieren rot (λ_{ex} : 554, λ_{em} : 638), wohingegen intrazelluläre Fettakkumulationen, die vor allem aus sehr hydrophoben Triglyceriden und Cholesterinestern bestehen, bei einer kürzeren Wellenlänge fluoreszieren (λ_{ex} : 515, λ_{em} : 585) (Diaz *et al.*, 2008).

Um Effekte besser beurteilen zu können, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Palmitat als BSA-Komplex inkubiert (vgl. 3.2.11). Es konnte mikroskopisch gesehen werden, dass in den mARC1-defizienten Zellen deutlich weniger intrazelluläre Lipidakkumulationen vorhanden sind. Dieser beobachtete Effekt wurde wie erwartet durch Palmitat-Zusatz konzentrationsabhängig verstärkt. Unter 500 μM Palmitat waren in WT Zellen viele Lipidtröpfchen zu sehen, jedoch führten diese hohe Konzentration zu morphologischen Veränderungen der Zellen (Abb. 4.26).

Interessant ist, dass eine signifikant stärkere Färbung der mARC1-defizienten Zellen ohne Behandlung sowie unter 100 μM Palmitat bei längerer Wellenlänge (λ_{ex} : 554, λ_{em} : 638) mikroskopisch zu sehen ist und gemessen werden konnte (Abb. 4.26 + 4.27 A).

Betrachtet man das Fluoreszenzsignal bei der kürzeren Anregungswellenlänge (λ_{ex} : 515, λ_{em} : 585), bei der v.a. die angefärbten neutralen, intrazellulären Lipidakkumulationen fluoreszieren, konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Signal, das von mARC1-exprimierenden Zellen ausgeht zu dem der mARC1-defizienten Zellen detektiert werden (Abb. 4.27 B). Ein vermehrtes Vorliegen der neutralen Lipidtröpfchen war somit mikroskopisch zu erkennen, jedoch nicht über die Fluoreszenzintensität instrumentell messbar.

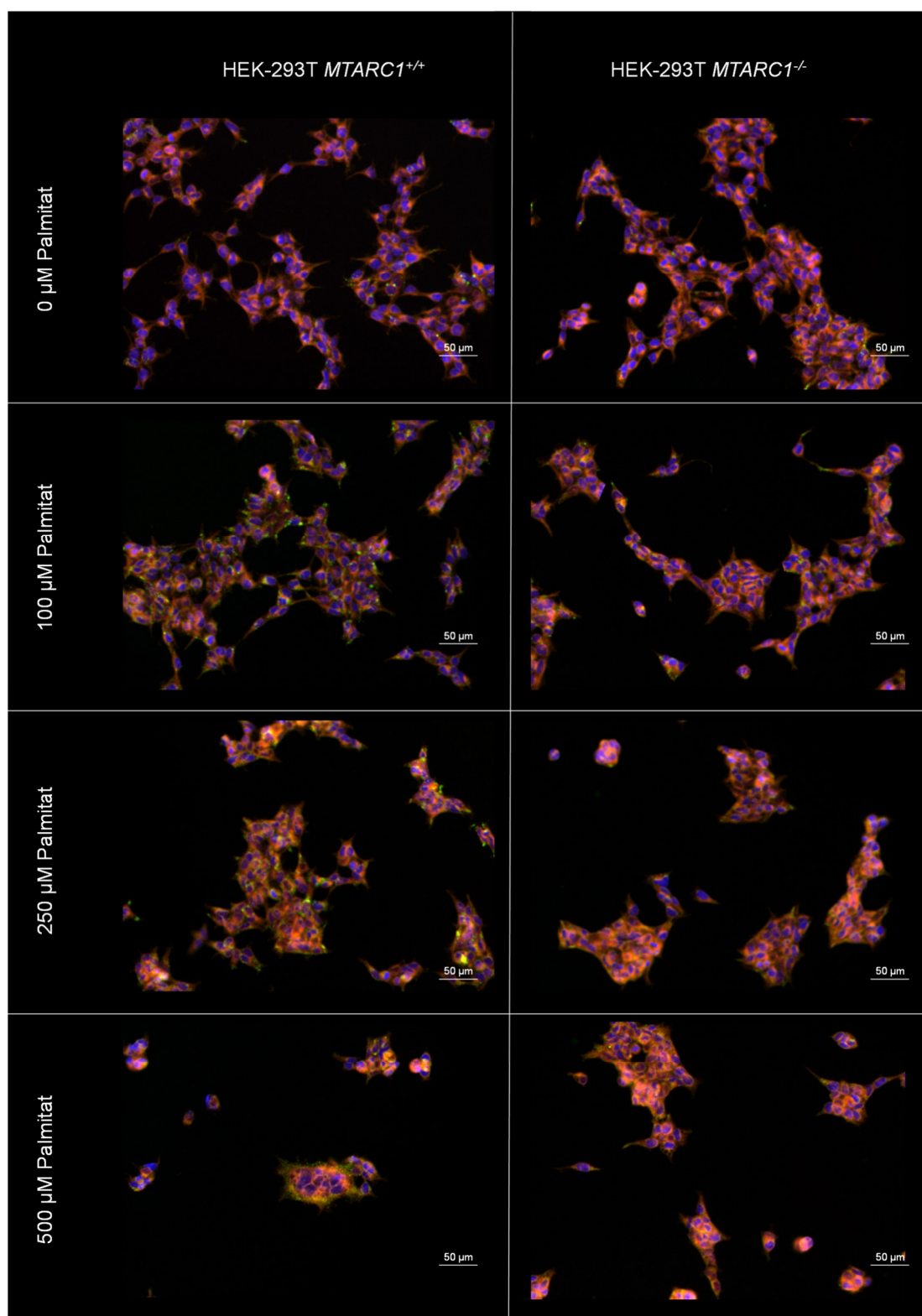
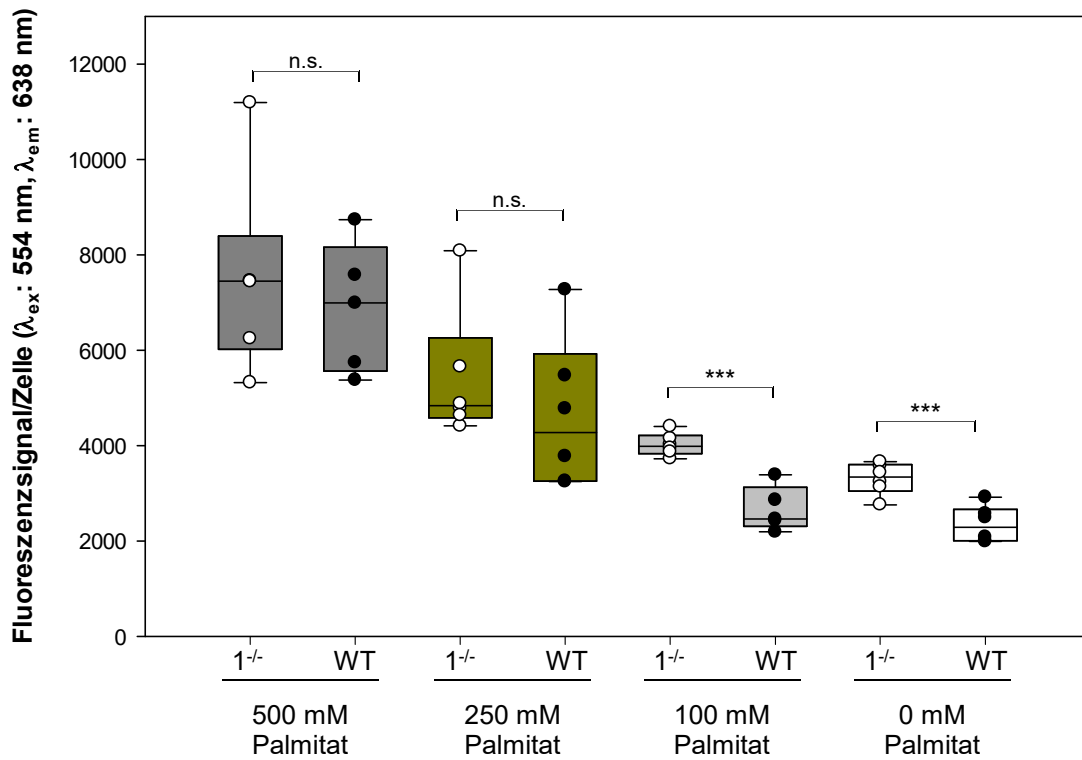


Abb. 4.26: Nile Red Färbung. Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT- und *MTARC1*^{-/-} Zellen 24 h nach Behandlung mit 500 μM, 250 μM oder 100 μM Palmitat als BSA-Komplex in 10-facher Vergrößerung. Die Färbung und Detektion erfolgte wie in 3.2.11 beschrieben. Die Bilder wurden auf 3 unterschiedlichen Kanälen aufgenommen und übereinandergelegt: Texas Red λ_{ex} : 554, λ_{em} : 638; Texas Yellow λ_{ex} : 515, λ_{em} : 585; DAPI λ_{ex} : 358, λ_{em} : 461.

A



B

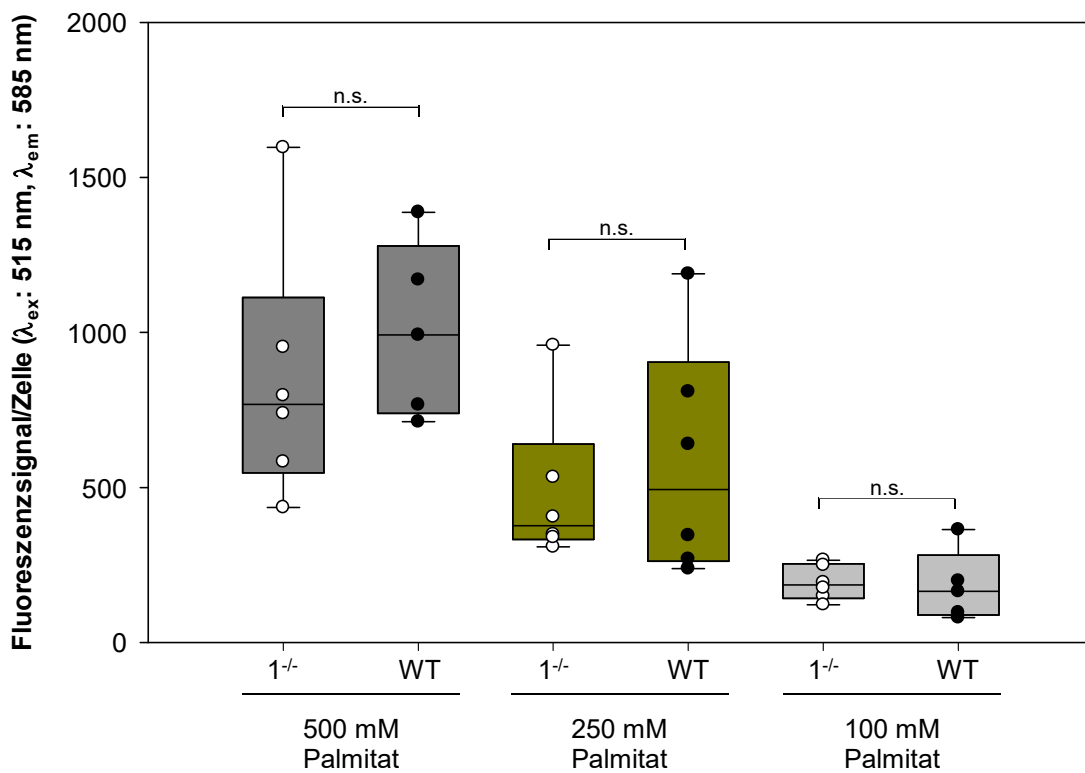


Abb. 4.27: Fluoreszenzintensität/Zelle nach Nile Red-Färbung von *MTARC1*^{+/+} (●) und *MTARC1*^{-/-} (1^{-/-}, ○) Zellen nach der Inkubation mit 500 μM, 250 μM oder 100 μM Palmitat über 24 h (vgl. 3.2.11). Das Fluoreszenzsignal wurde auf die Zellzahl normalisiert. (A) amphiphile Lipide (λ_{ex} : 554 nm, λ_{em} : 638 nm); (B) lipophile Lipide (λ_{ex} : 515 nm, λ_{em} : 585 nm), korrigiert durch Hintergrundsignal der Zellen. Die statistische Signifikanz wurde mittels U-Test und t-Test überprüft. ***, $p \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant.

4.4.3 Auswirkung des *MTARC1*-KOs auf die Toleranz gegenüber Substanzen im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel

Bei der Behandlung von mARC1-exprimierenden und -defizienten HEK-293T Zellen mit Palmitat, konnte beobachtet werden, dass WT Zellen eine veränderte Morphologie unter der Behandlung mit 500 μ M Palmitat aufwiesen (vgl. 4.26). Im Weiteren sollte die Palmitat-induzierte Lipotoxizität anhand der Zellviabilität und Zellproliferation näher untersucht werden. Zudem sollte auch der Einfluss weiterer Makronährstoffe (Glucose, Fructose) sowie Insulin auf die Zellen untersucht werden (vgl. 3.2.10.5).

Es konnte bestätigt werden, dass die mARC1-defizienten Zellen eine höhere Resistenz gegen eine Palmitat-induzierte Lipotoxizität aufweisen. Dieses Phänomen war jedoch nur bei sehr hohen Palmitat-Konzentrationen von 500 μ M zu beobachten, bei Inkubationen mit 100 μ M und 250 μ M Palmitat konnte kein merklicher Unterschied detektiert werden (Abb. 4.28 A). Auch Untersuchungen der Zellviabilität unter 500 μ M Palmitat bestätigten dieses Ergebnis und zeigten einen deutlich verminderten Lebendzellanteil. mARC1-defiziente Zellen zeigten eine um ca. 10 % höhere Zellviabilität als entsprechende WT Zellen (Abb. 4.28. B). Die durch Palmitat induzierte Lipotoxizität hat demnach einen größeren Einfluss auf WT Zellen als auf KO Zellen.

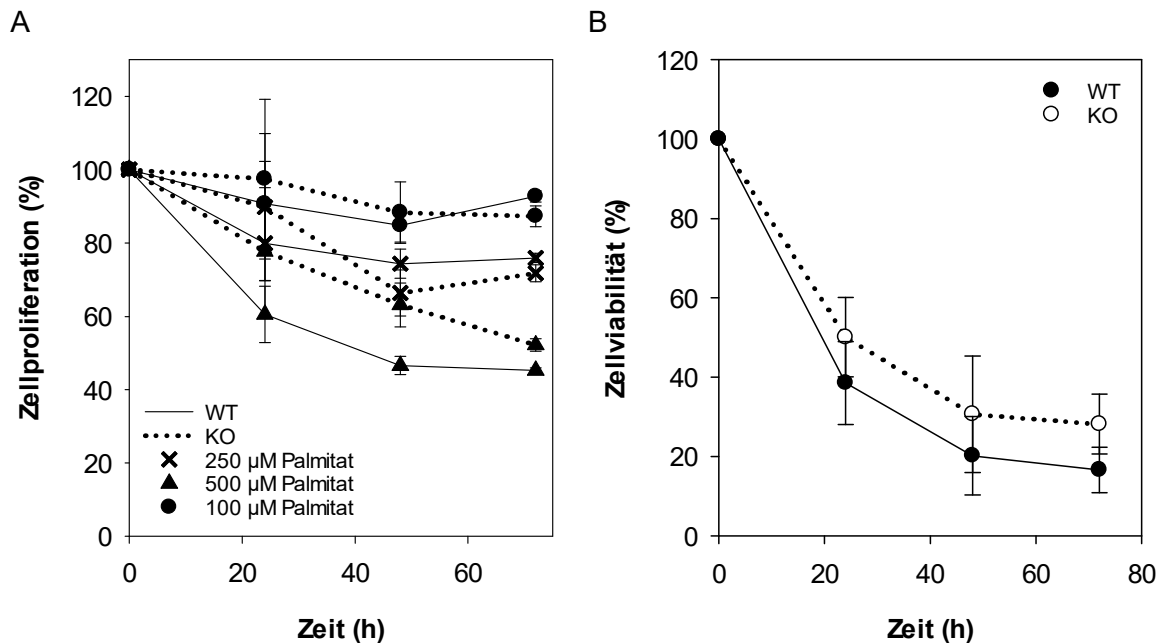
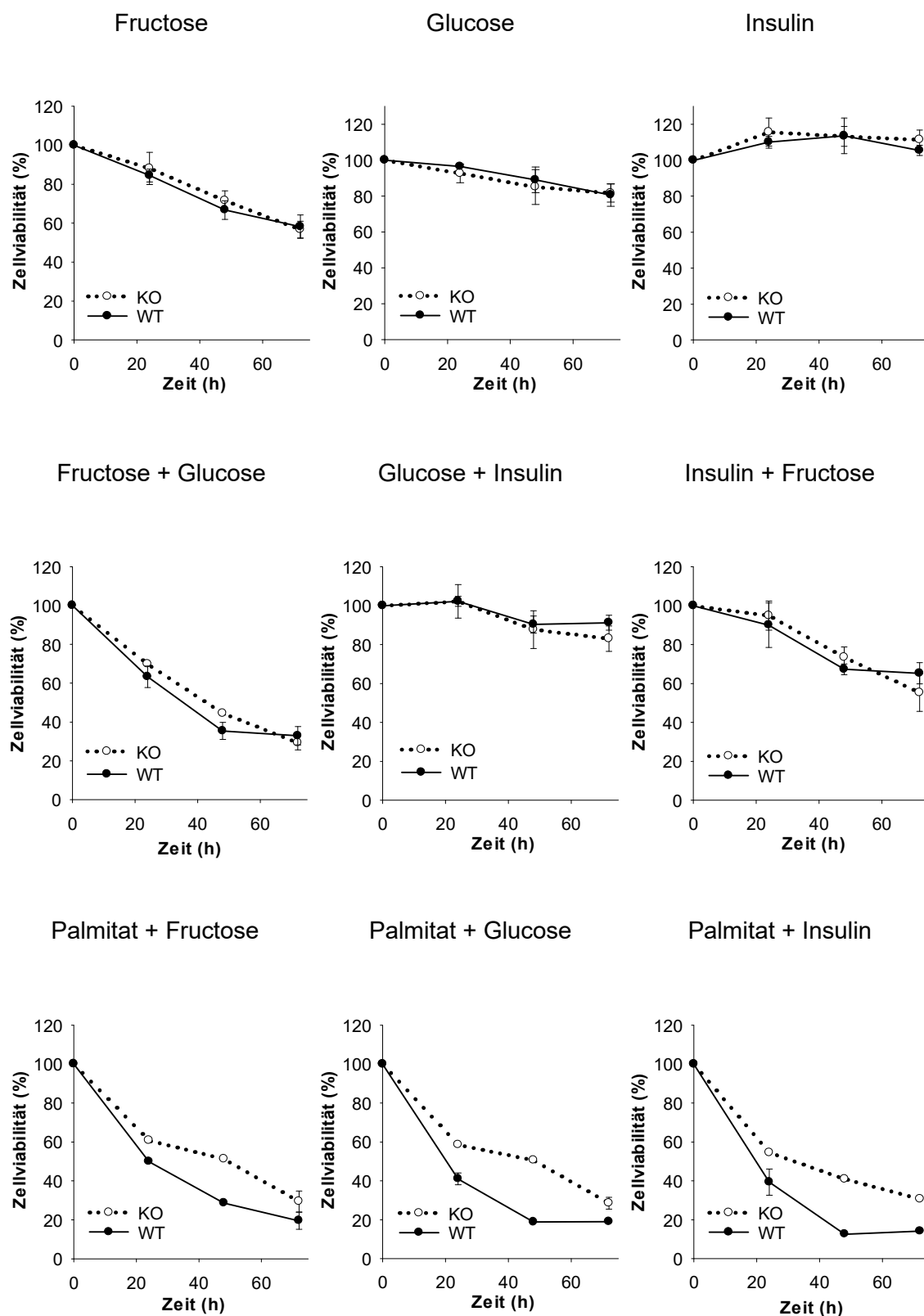
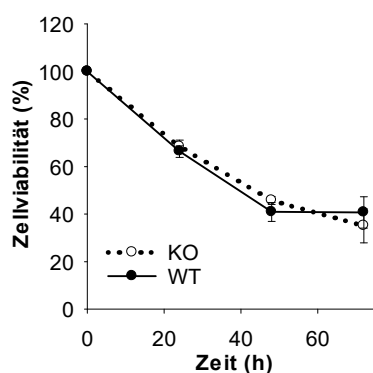


Abb. 4.28: Zellproliferation und Zellviabilität. Zellen wurden entsprechend 3.2.10.5 mit Palmitat behandelt. (A) Mittlere Zellzahl \pm Standardabweichung über 72 h (vgl. 3.2.9). (B) Mittlere Zellviabilität \pm Standardabweichung über 72 h nach Behandlung mit 500 μ M Palmitat (vgl. 3.2.7.2).

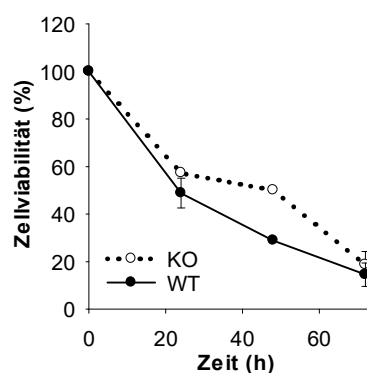
Bei Inkubationen mit Glucose, Fructose, Insulin und Palmitat konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Inkubationen, die Palmitat als Bestandteil enthielten, einen eindeutigen Unterschied in der Zellviabilität von HEK-293T *MTARC1*^{-/-} und *MTARC1*^{+/+} Zellen aufzeigen, wobei die Zellviabilität der KO Zellen hier immer höher war.



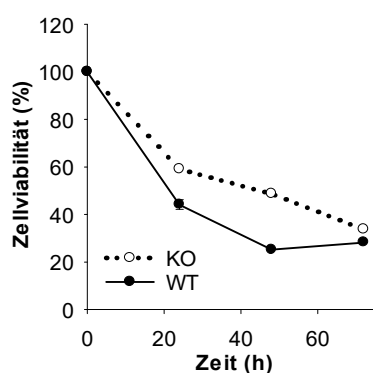
Glucose + Fructose + Insulin



Glucose + Fructose + Palmitat



Glucose + Insulin + Palmitat



Fructose + Insulin + Palmitat

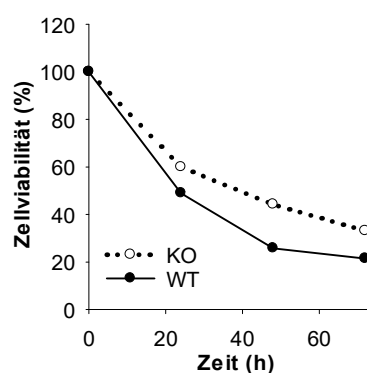


Abb. 4.29: Zellviabilität nach Behandlung mit 500 μ M Palmitat, 50 mM Glucose, 100 mM Fructose und 1 μ M Insulin. Angegeben ist die Mittlere Zellviabilität von KO und WT Zellen \pm Standardabweichung über 72 h (vgl. 3.2.10.5; 3.2.7.2).

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Untersuchung der Substratspezifität muriner und humaner mARC-Proteine

mARC spielt eine entscheidende Rolle im *N*-reduktiven Endobiotika-, Xenobiotika- und Arzneistoffmetabolismus. In vorherigen Studien konnte für eine Vielzahl unterschiedlicher oxygenierter Substrate eine Schlüsselrolle von mARC bei ihrer Reduktion gezeigt werden (Ott *et al.*, 2015). Der *N*-reduktive Metabolismus ist jedoch nicht zwangsläufig mit dem Abbau einer Verbindung verknüpft, vielmehr ist die *N*-Reduktion eine pharmazeutische Möglichkeit, einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen und damit Therapiemöglichkeiten und Compliance von Patienten zu nehmen. So kann durch das Einfügen einer Hydroxygruppe an eine basische Funktion die Absorption nach oraler Gabe deutlich verbessert werden, sodass eine perorale Gabe ermöglicht werden kann, was einen wichtigen Beitrag zur Lebensqualität der Patienten haben kann. Im Pfortader-Blut und vor allem bei der primären Leberpassage wird die Verbindung dann durch das mARC-haltige Enzymsystem reduziert und in die Wirkform überführt (Clement, 2002). Es ist essenziell bei der Entwicklung eines jeden Arzneistoffs, den Metabolismus zu untersuchen. So sollen nicht nur der Abbau und damit das Deaktivieren des Arzneistoffs sowie die entsprechende Geschwindigkeit untersucht werden, auch das Wissen über das Entstehen von toxischen Abbauprodukten ist unerlässlich. Der Metabolismus von Arzneistoffen wird aktuell noch durch CYP Enzyme dominiert, die als Monooxygenasen Arzneistoffe oxygenieren (Sadler *et al.*, 2016). Bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe werden Strategien und Verbindungen entwickelt, um diesen Metabolismus durch CYP zu umgehen, da Polymorphismen und Interaktionen mit weiteren Arzneistoffen oder Lebensmitteln den Abbau eines Xenobiotikums durch CYP beschleunigen, verlangsamen oder verhindern können. Aufgrund dessen gewinnen andere Arzneistoff-metabolisierende Enzyme wie mARC immer mehr an Bedeutung.

Aus all diesen Gründen ist es essentiell, den *N*-reduktiven Metabolismus intensiv zu studieren. Innerhalb der präklinischen Phase werden geeignete *in vitro* Modelle, wie rekonstituierte Systeme, Zellkultur- und Organoid-Studien, Tierstudien, und schlussendlich Studien im menschlichen Organismus entwickelt. Die Verwendung von Organhomogenaten ist hierbei eine wichtige Strategie, um erste metabolische Studien mithilfe weniger Individuen, unter Berücksichtigung des gesamten Proteoms durchzuführen. So können geringe Mengen Gewebe genutzt werden, um ein breites Spektrum an Substraten zu screenen, bevor dann *in vivo* Studien im tierischen Organismus folgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche *in vitro* Testsysteme genutzt, um den mARC-vermittelten reduktiven Metabolismus zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem murinen Organismus als mögliches Modellsystem.

Murine Tiermodelle werden häufig genutzt, da das Genom der Maus zum einen mit dem menschlichen Genom vergleichbar ist und eine ähnliche geschätzte Anzahl von Genen, einen ähnlichen Gehalt an chromosomaler DNA und eine ähnliche Informationskomplexität aufweist (Guttman *et al.*, 2009; Blake *et al.*, 2011). Zum anderen sind Haltung, Züchtung und Experimente mit weniger Aufwand durchzuführen als z.B. bei Schweinen oder Schimpansen. Das Genom von Säugetieren kodiert für zwei homologe mARC-Proteine. Bei der Nomenklatur werden die beiden mARC-Proteine (bzw. Gene) durch den Zusatz der arabischen Ziffern ‚1‘ bzw. ‚2‘ gekennzeichnet (Wahl *et al.*, 2010). Interessant im Kontext der vorliegenden Arbeit ist, dass Expressionsanalysen auf mRNA und Proteinebene zeigen, dass je Spezies eines der beiden paralogen Proteine dominant exprimiert wird. So sind, im Gegensatz zu humanen Zelllinien mit einer überwiegenden *MTARC1*-Expression, bei Mäusen hohe *MTARC2*- und niedrige *MTARC1*-Genexpressionslevel beschrieben (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.13 – 7.16) (Wu *et al.*, 2016). Da die speziesübergreifende Nomenklatur von ‚mARC1‘ und ‚mARC2‘ lediglich auf Sequenzalignement beruht, funktionell jedoch noch nicht bestätigt wurde, war es ein Ziel dieser Arbeit, diese Nomenklatur anhand der Substratspezifität zu überprüfen.

Es wurden humane und erstmals murine rekombinante Proteine sowie Gewebehomogenate von *MTARC1*- und *MTARC2*-KO sowie WT Mäusen präpariert und mit verschiedenen Substraten mit *N*-O-Bindungen inkubiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen mit Leberhomogenat aus mARC1- und mARC2-defizienten Mäusen zeigten z.T. deutlich verminderte Reduktaseaktivitäten im Vergleich zum WT Mäusen. Eine signifikant verminderte Reduktion konnte für BAO, GOB und HAP in mARC2-defizienten Proben, für NHC und NANO sowohl in mARC1- als auch mARC2-defizienten Homogenaten und für BHA in mARC1-defizienten Proben detektiert werden (Tab. 5.1).

	m <i>MTARC1</i> ^{-/-}	m <i>MTARC2</i> ^{-/-}
BAO	n.s.	↓↓↓
GOB	n.s.	n.d.
NHC	n.d.	↓↓↓
BHA	↓↓↓	n.s.
HAP	n.s.	↓↓↓
NANO	↓↓	↓

Tab. 5.1: Vergleich der Umsetzungsraten von murinem Leberhomogenat von WT, *MTARC1*^{-/-} und *MTARC2*^{-/-} Proben. n.s., keine signifikante Differenz zum WT; n.d., keine detektierbare Umsetzung; ↓↓↓, verminderte Umsetzung mit $p \leq 0,001$; ↓↓, verminderte Umsetzung mit $p \leq 0,01$; ↓, verminderte Umsetzung mit $p \leq 0,05$.

Interessant ist hierbei, dass trotzdem das gesamte Proteom bei Inkubationen mit Homogenaten einen Einfluss auf die untersuchte Reaktion nehmen kann, der KO eines *MTARC* Gens meist einen massiven Einfluss auf die Reduktaseaktivität ausübt. Dies unterstreicht die entscheidende Rolle von mARC am reduktiven Metabolismus und zeigt, dass es keine *Backup*-Enzyme gibt, die die Funktion bei Ausfall eines mARC-Proteins übernehmen.

Vorangegangene Studien mit rekombinanten humanen Proteinen deuten auf *N*-Oxide als Markersubstrate für mARC1 hin (Jakobs *et al.*, 2014a; Schneider *et al.*, 2018). Dies wurde für das humane Protein im Rahmen dieser Arbeit im rekonstituierten Enzymsystem reproduziert (vgl. 4.1.1, Abb. 4.2). Die erstmalig getesteten murinen rekombinanten Proteinen zeigten ebenfalls eine spezieübergreifende mmARC1-vermittelte Substratspezifität gegenüber *N*-Oxiden (Tab. 5.2) (vgl. 4.1.1, Abb. 4.2). Allerdings führte der KO beider murinen mARC-Proteine zu einer stark beeinträchtigten Reduktaseaktivität gegenüber NANO im Vergleich zu den aktiven WT Proben (vgl. 4.1.2, Abb. 4.4). Demnach sind *N*-Oxide zwar bevorzugte Substrate für humanes mARC1, es konnte aber nicht eindeutig gezeigt werden, dass diese Substratklasse auch spezieübergreifend ausschließlich durch eine paraloge Form umgesetzt wird.

Eine Umsetzung von GOB war durch *MTARC2*^{-/-} Mäuse nicht detektierbar. Zugleich setzten *MTARC1*^{-/-} Proben GOB mit der gleichen Reduktaseaktivität um wie WT Proben. Dieses Ergebnis identifiziert GOB als bevorzugtes mmARC2-Substrat (vgl. 4.1.2, Abb. 4.4). Auch *in vitro* Studien mit rekombinanten Proteinen stützen dieses Ergebnis, da mmARC1 GOB deutlich schlechter umsetzt als mmARC2 (Tab. 5.2) (vgl. 4.1.1, Abb. 4.2). Inkubationen mit humanen rekombinanten Proteinen hingegen zeigten in vergangenen Studien eine vergleichbare Substratspezifität der beiden paralogen hmARC-Proteine (Jakobs *et al.*, 2014a). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden und zeigt Unterschiede der orthologen Proteine auf.

Gegenüber BAO konnte eine drastisch verminderte Reduktaseaktivität lediglich im murinen *MTARC2*-KO Modell beobachtet werden. Auch Studien mit rekombinanten Proteinen zeigten eine höhere Umsetzungsrate der murinen und humanen mARC2 Proteine. Die *in vitro* Inkubationen mit murinen Leberhomogenaten zeigten darüber hinaus eine bevorzugt mARC1-vermittelte NHC- und BHA-Reduktion. *In vitro* Studien mit rekombinanten Proteinen zeigten abweichende Ergebnisse: Inkubationen mit BHA wiesen eine deutlich höhere *N*-Reduktion durch hmARC1 und mmARC1 im Vergleich zu ihren paralogenen Proteinen auf, NHC zeigte bei Inkubationen mit humanen Proteinen eine höhere Substratspezifität für hmARC1, hingegen bei Inkubationen mit murinen Proteinen eine höhere Umsetzungsrate durch mmARC2 (Tab. 5.2).

	mARC1		mARC2	
	human	murin	human	murin
BAO	70 ± 15	22,1 ± 2,7	228,3 ± 32,8	138,8 ± 39,6
GOB	64,9 ± 9,5	15,3 ± 2,4	43,8 ± 6,9	43,4 ± 5,4
NHC	30,2 ± 1,3	5,1 ± 0,9	10,2 ± 4,3	11,3 ± 3,4
BHA	22,8 ± 2	12,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2
HAP	5,8 ± 0,2	n.d.	2,8 ± 0,5	2,2 ± 0,6
NANO	17,2 ± 1,3	n.d.	n.d.	n.d.
ANO	1,2 ± 0,2	3,8 ± 0,3	0,6 ± 0,3	1,3 ± 0,2

Tab. 5.2: Vergleich der Umsetzungsraten muriner und humaner rekombinanter Proteine (vgl. 4.1.1, Abb. 4.2) n.d., keine detektierbare Umsetzung.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass ein direkter Vergleich der Umsetzungsraten der murinen mARC-Proteine aus unterschiedlichen Quellen kritisch zu betrachten ist. Zum einen wurde humanes CYB5B und CYB5R verwendet, dies könnte zu einer verminderten Aktivität von murinem Proteinen führen. Zum anderen ist zu beachten, dass eine deutlich höhere mARC2-Expression und niedrigere mARC1-Expression im murinen Leberhomogenat vorliegt, sodass der jeweilige *Knock-out* unterschiedlich stark ins Gewicht fallen kann (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.16) (Wu *et al.*, 2016; Neve *et al.*, 2015). Widersprüchliche Ergebnisse gilt es in zukünftige Studien mit beispielsweise einem standardisierten NADH-Assay im Hochdurchsatz zu überprüfen. Zusammenfassend zeigen die Studien zur Substratspezifität, dass Parallelen zwischen den Orthologen nach der gegenwärtigen Nomenklatur gezogen werden können, ein absoluter Vergleich, zumindest auf Basis der *N*-Reduktaseaktivität, jedoch nicht eindeutig zu ziehen ist und mmARC getrennt von hmARC betrachtet werden sollte.

Anhand der vorliegenden Daten kann zudem gesagt werden, dass mARC-defiziente Mäuse ein neuartiges und verfügbares Tiermodell darstellen, das als leistungsfähiges Werkzeug zur Untersuchung des *N*-reduktiven Metabolismus von z. B. neuen Wirkstoffkandidaten genutzt werden kann. Die detektierte Restaktivität in Inkubationen mit mARC-defizienten Gewebekomogenaten, lässt sich vermutlich auf das andere paraloge mARC-Protein zurückführen.

Studien mit murinen Proben konnten hohe mARC-Expressionslevel und Reduktaseaktivitäten in Niere, Leber und niedrige in Lunge aufzeigen. Die Tatsache, dass in allen untersuchten Gewebekomponenten mARC2-Expression und *N*-reduktive Aktivität detektiert wurde, zeigt ebenfalls die Bedeutung von mARC für den extrahepatischen Arzneistoffmetabolismus auf.

Die Leber ist der zentrale Ort des Metabolismus. Neben dem Fettstoffwechsel, dem Glucosestoffwechsel und der Synthese der Galle, findet hier auch ein wesentlicher Teil des Arzneistoffmetabolismus statt. Daher überrascht es nicht, dass die Expression von mARC in der Leber besonders hoch ist (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.15 + 7.16) (Wu *et al.*, 2016). Interessanterweise konnten wir in dieser Studie eine, im Vergleich zur Leber, höhere Expressionsrate von mARC in der Niere detektieren und auch die *N*-reduktive Aktivität war in der Niere meist höher als in der Leber (vgl. 4.1.2, Abb. 4.3). Diese Ergebnisse, die zwar Genexpressionsdaten der BioGPS widersprechen, die die höchste Expression von *MTARC* in der Leber detektieren, bestätigen vorherige Ergebnisse mit porcinen Proben (Krischkowski, 2014). Ein direkter Vergleich von mRNA-Konzentrationen und Proteinkonzentrationen ist jedoch nicht möglich und könnte die abweichenden Ergebnisse erklären.

5.2 Auswirkung des *MTARC1*-KOs auf HEK-293T Zellen

Die genetische Veränderung von Zellen und Organismen birgt ein enormes Potential bei der Identifizierung und Charakterisierung proteincodierender Gene.

In bisherigen Arbeiten gelang es, einen siRNA-vermittelten transienten KD beider *MTARC*-Gene in humanen Zellen zu erzeugen. Hierbei erzeugt eine spezifische siRNA, die in die Zellen transfiziert und in einen *RNA induced silencing*-Komplex eingebaut wird, den Strangbruch komplementärer mRNA, sodass das Zielprotein nicht exprimiert wird. Bei diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die *N*-reduktive Aktivität entsprechender Zellen bei Inkubationen mit BAO, HAP, BHA und *N*-Hydroxy-Sulfamethoxazol signifikant vermindert war. Ebenfalls konnte eine erhöhte Sensitivität der *MTARC2*-KD Zellen gegenüber *N*-hydroxylierter Basenanaloga beobachtet werden. Es konnte somit erstmalig eine physiologische Relevanz der reduktiven Detoxifizierung mutagener Basenanaloga durch mARC bewiesen werden. Diese Ergebnisse, die in HeLa Zellen erzielt wurden, konnten jedoch weder für mARC1 noch in HEK-293T Zellen reproduziert werden (Plitzko *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, einen stabilen KO eines *MTARC*-Gens in humanen Zellen zu erzeugen. *MTARC1* wurde, aufgrund seiner

dominanten Expression in humanem Gewebe sowie humanen Zellen, gezielt ausgewählt (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.13) (Wu *et al.*, 2016; Neve *et al.*, 2012). Die entsprechenden mARC1-defizienten Zellen sollten dann entsprechend ihrer Reduktase-Aktivität, reduktiven Detoxifizierung und einer möglichen Beteiligung im Lipidstoffwechsel charakterisiert werden. Bevor jedoch Studien hierzu durchgeführt werden konnten, wurde zuerst überprüft, ob die Zellen durch das Fehlen von mARC1 in ihrer Zellvitalität beeinträchtigt sind. Um dies zu klären wurden die mARC1-defizienten Zellen entsprechend ihrer Morphologie, Proliferation und Viabilität untersucht und mit WT Zellen verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die KO Zellen keine veränderte Morphologie und auch keine verminderte Zellviabilität aufweisen (vgl. 4.2.2, Abb. 4.10).

Eine weit etablierte Methode zur Bestimmung der Zellviabilität ist das Resazurin-Assay. Dieses Assay beruht auf der Reduktion von Resazurin zu Resorufin, welches dann fluoresziert. Da es sich bei dieser Reaktion ebenfalls um eine *N*-Reduktion handelt, konnte gleichzeitig gesehen werden, dass mARC zumindest an der Reduktion von Resazurin nicht ausschlaggebend beteiligt ist, da KO und WT Zellen vergleichbare Umsetzungen aufweisen (normalisiert auf ihre Zellzahl) (vgl. 4.2.2, Abb. 4.12). So sind es vermutlich andere reduzierende Enzyme, die diese Reaktion primär katalysieren.

Unterschiede zwischen WT und KO Zellen konnten bei Betrachtung ihrer Wachstumsrate und Generationszeit detektiert werden, so war die Proliferationsrate der KO Zellen um das 1,4-fache vermindert und zeigten eine errechnete mittlere Generationszeit von ca. 30 h, während WT Zellen eine mittlere Generationszeit von ca. 22 h aufzeigten (vgl. 4.2.2, Abb. 4.11). Da der *N*-reduktive Metabolismus ein zentrales Werkzeug zur Charakterisierung des mARC-Enzymsystems darstellt, wurden die Zellen anschließend entsprechend ihrer Reduktaseaktivität gegenüber verschiedenen Substraten charakterisiert.

In cellulo Studien bieten im Vergleich zu rekombinanten Proteinen und Gewebehomogenaten den großen Vorteil, dass die gesamte Zellphysiologie berücksichtigt wird. Hier haben die subzelluläre Lokalisation der mARC-Proteine, die Kolo-kalisation weitere Proteine sowie die Membrangängigkeit oder Transportmechanismen der Substrate einen Einfluss auf die untersuchte Reaktion. Durch den Vergleich von KO und WT Zellen kann gesehen werden, ob und in welchem Ausmaß Reaktionen durch mARC katalysiert werden oder ob ggf. andere Proteine am Metabolismus beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei dem Vergleich von HEK-293T *MTARC1*-KO und WT Zellen eine signifikant verminderte *N*-reduktive Aktivität bei Inkubationen mit allen getesteten Substraten beobachtet werden (vgl. 4.2.3, Abb. 4.13). So zeigten mARC1-defiziente Zellen keine detektierbare Reduktion von NANO und BAO. Diese Beobachtung

bestätigt die vorherigen Ergebnisse und frühere Studien im rekombinanten, humanen Enzymsystem, die *N*-Oxide als hmARC1-Substrate identifizierten (Schneider *et al.*, 2018; Jakobs *et al.*, 2014a). Ebenfalls war die *N*-Reduktion von GOB, NHC, HAP und BHA signifikant vermindert. Inkubationsansätze mit NHC und GOB zeigten eine reduktive Restaktivität von ca. 7 %, Ansätze mit HAP eine von ca. 12 % und Ansätze mit BHA eine von ca. 28 %. Diese Ergebnisse unterstreichen erneut die entscheidende Rolle von mARC am *N*-reduktiven Metabolismus.

In siRNA-Studien, konnte eine Restaktivität von 15 % bei HAP, eine von 35 % von BAO und eine von 50 % von BHA durch *MTARC1*-KD Zellen detektiert werden (Plitzko *et al.*, 2015, Ginsel *et al.*, 2018). Vergleicht man nun diese Ergebnisse, so bestätigt dies, dass der CRISPR/Cas9-vermittelte KO die effizientere Methode im Vergleich zu einem siRNA-vermittelten KD darstellt (Wang *et al.*, 2018). Neben der höheren Effizienz ist ein weiterer wesentlicher Vorteil der KO-Methode die stabile und nicht transiente Transfektion. Eine transiente Transfektion ist nicht nur durch eine geringere Effizienz gekennzeichnet, sondern ist auch zeitlich limitiert, sodass Experimente nur in einem bestimmten Zeitfenster durchgeführt werden können (zwischen 3 und 5 Tagen (Plitzko *et al.*, 2013)).

In der vorherigen Untersuchung konnte eine deutlich verminderte *N*-Reduktion von HAP zu Adenin durch die *MTARC1*-KO Zellen detektiert werden (vgl. 4.2.3, Abb. 4.13).

N-hydroxylierte Nukleobasen sind bekannt als hochmutagene Substanzen, da sie in Form ihres Nukleosidtriphosphats Replikationsfehler durch tautomere Übergangszustände sowie Inkorporationsfehler durch Basenfehlpaarung induzieren können (Freese, 1959; Negishi *et al.*, 1994). Die Entstehung dieser mutagenen Basenanaloga kann durch oxidativen Stress, durch zellulären Metabolismus oder durch eine dysregulierte Purinbiosynthese erfolgen (Clement & Kunze, 1990; Shimada *et al.*, 2002; Haghdoost *et al.*, 2006). Aus diesem Grund spielen zelluläre Reparationsmechanismen eine entscheidende Rolle. In diesem Kontext sind 3 Mechanismen zu nennen. So kann zum einen das Nukleosidtriphosphat durch die Inosin-Triphosphat-Pyrophosphatase wieder in das entsprechende Monophosphat gespalten werden (Waisertreiger *et al.*, 2010; Menezes *et al.*, 2012). Ebenfalls kann eine bereits eingebaute hydroxylierte Base durch die Endonuklease V erkannt, aus dem DNA-Strang herausgeschnitten und ersetzt werden (Burgis *et al.*, 2003). Der dritte Weg der Detoxifizierung ist die Reduktion des hydroxylierten Basenanalogs zu der entsprechenden kanonischen Base. Dieser Weg stellt wohl den effizientesten dar, da der Einbau eines mutagenen Basenanalogs verhindert wird und die reduzierten, natürlichen Basen anschließend für die weitere DNA-Synthese über den *Salvage-Pathway* zur Verfügung stehen. In diesem Zusammenhang sind mARC sowie die prokaryotischen mARC Analoga YiiM und YcbX zu nennen (Kozmin *et al.*, 2008; Plitzko *et al.*, 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse erstmals in HEK-293T Zellen und erstmals für mARC1 reproduziert werden. Zum anderen konnte eine verminderte Zellproliferation sowie Zellviabilität der *MTARC1*-KO Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen HAP im Vergleich zu WT Zellen gezeigt werden (vgl. 4.2.4, Abb. 4.15). Morphologisch war eine Verminderung der Zell-Zell-Kontakte zu detektieren und es befanden sich mehr Zellen in der Zellapoptose, dies wurde anhand der Chromatinkondensation mittels Hoechst 33342 Färbung gesehen (vgl. 4.2.4, Abb. 4.14 + 4.15). Da die WT Zellen eine mittlere Teilungsrate von ca. 22 h und die KO Zellen eine von ca. 30 h (vgl. 4.2.2, Abb. 4.11) aufwiesen, war es nicht überraschend, dass diese Ergebnisse bereits nach 24 h zu detektieren waren, da hier der überwiegende Teil der Zelle eine Zellteilung durchlaufen hat, bei der es durch das mutagene Basenanalogon zu Replikations-/Inkorporationsfehlern gekommen sein kann.

Eine hierbei sehr interessante Beobachtung war, dass die Zellen in Gegenwart von 0,05 mM HAP eine niedrigere Zellviabilität aufwiesen als Zellen, die mit höheren Konzentrationen HAP inkubiert wurden. Ähnliche Beobachtungen konnte bereits in vorherigen Studien mittels Durchflusszytometrie gemacht werden (Plitzko *et al.*, 2015). Dieser Effekt war bei mARC1-defizienten Zellen stärker ausgeprägt und trat erst bei höheren HAP-Konzentrationen auf. Während die WT Zellen bei 0,1 mM bereits eine höhere Viabilität aufwiesen, war ein Anstieg der Viabilität beim KO erst ab 0,25 mM zu detektieren, das Maximum war bei 0,5 mM HAP zu sehen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei höheren Konzentrationen HAP, höhere Konzentrationen Adenin entstehen, die mit HAP in eine Konkurrenzsituation gelangen, die dann wiederum die Toxizität von HAP senken. Dies wurde bereits für Inkubationen mit 6-Thiopurinen beschrieben, dessen Toxizität durch Zusatz von Adenin reduziert wurde (Hashimoto *et al.*, 1990). Bei Inkubationsstudien mit HAP, konnte eine reduktive Restaktivität der *MTARC1*-KO Zellen von ca. 12 % detektiert werden (vgl. 4.2.3, Abb. 4.13). Dies lässt darauf schließen, dass mARC2, dessen Expression von dem KO nicht beeinträchtigt ist, ebenfalls an der Reduktion von HAP beteiligt ist. In Ehrlich-Aszites Tumorzellen konnte eine HAP-vermittelte Toxizität durch die Gabe von Adenin vermindert werden (Sartorelli *et al.*, 1964). Da der *Salvage-Pathway* und die *De-novo*-Synthese von Purin- und Pyrimidinbasen überwiegend im Cytosol und z.T. auch in Mitochondrien stattfinden, im Vergleich zu DNA-Replikation im Zellkern, ist die Detoxifizierung durch mARC auch anhand der subzellulären Lokalisation eine durchaus denkbare, physiologisch relevante Funktion.

Neben der reduktiven Detoxifizierung von HAP, wurde auch die Auswirkung von H_2O_2 auf mARC1-defiziente Zellen untersucht.

H_2O_2 erfüllt im menschlichen Organismus grundlegende Funktionen. Bei niedrigen Konzentrationen diffundiert H_2O_2 in intrazelluläre Kompartimente und reagiert mit spezifischen Aminosäureresten, wie z. B. Cystein, Methionin und Selenocystein, wobei es eine Schlüsselrolle bei der Regulation der intrazellulären Redox-Signalisierung und damit bei der Zellproliferation, Angiogenese, Migration und Zellregeneration einnimmt (Sies, 2017; Burdon & Rice-Evans, 1989; Cordeiro & Jacinto, 2013). Bei höheren Konzentrationen und in Anwesenheit von Übergangsmetallen erzeugt H_2O_2 jedoch oxidativen Stress sowie $\cdot\text{OH}$, das als starkes Oxidationsmittel willkürlich mit allen wichtigen Makromolekülen reagieren und eine Lipidperoxidation sowie die Oxidation von Proteinen, DNA und Kohlenhydraten induzieren kann, was zu einer Beeinträchtigung ihrer Aktivitäten und Funktionen führt (Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2018a; Chiurchiù & Maccarrone, 2011).

In einer vorherigen Studie, bei der die mARC-vermittelte Katalyse weiter charakterisiert werden sollte, wurde nach Molekülbindungen gesucht, die der N-O-Bindung ähneln und ebenfalls durch das mARC-haltige Enzymsystem reduziert werden können. Im rekonstituierten Enzymsystem konnte schließlich mithilfe eines NADH-Assays und eines fluorimetrischen Assays gezeigt werden, dass mARC die O-O-Bindung in H_2O_2 reduziert (Indorf, 2020b). Die O-O-Bindung ist ähnlich lang wie die N-O-Bindung (O-O 140 pm, N-O 148 pm) und hat eine niedrigere Bindungsenergie (O-O 142 kJ/mol bei 25°C, N-O 201 kJ/mol bei 25°C) (Riedel & Christoph, 2007). H_2O_2 -abbauende Enzyme sind hochredundant in verschiedenen Zellmembranen zur präzisen Regulation der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration vorhanden (Sies, 2017). Erstmals wird nun auch mARC mit der Reduktion von H_2O_2 in Verbindung gebracht.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine physiologische Relevanz dieser mARC-vermittelten Reduktion gezeigt werden. So zeigten *MTARC1*-KO Zellen eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber H_2O_2 im Vergleich zu entsprechenden WT Zellen. Es konnte sowohl auf Basis der Zellproliferation als auch anhand der Zellviabilität eine schlechtere Zellphysiologie beobachtet werden. Erhöhte Apoptoseraten waren ebenfalls durch eine verstärkte Chromatinkondensation zu sehen (vgl. 4.2.5, Abb. 4.17 + 4.18). Allgemein lässt sich sagen, dass die intrazelluläre Konzentration von H_2O_2 ca. 100-mal geringer ist als die extrazelluläre Konzentration. Unter physiologischen Bedingungen können intrazelluläre Konzentrationen von H_2O_2 von bis zu 100 nM vorherrschen und sind noch nicht mit oxidativem Stress assoziiert (Sies, 2017). Aufgrund dessen überrascht es nicht, dass bei extrazellulären Konzentrationen von 10 μM H_2O_2 keine Beeinträchtigung der

Zellproliferation und –viabilität zu detektieren ist. Unterschiede konnten bei 20 μM H_2O_2 extrazellulär beobachtet werden. Hier war die Proliferation sowohl der WT Zellen als auch der KO Zellen im Vergleich zu Kontrollen messbar beeinträchtigt, so war die Anzahl der WT-Zellen nach 24 h bei ca. 70 %, die der KO Zellen bei ca. 50 %, d.h. rein rechnerisch hat in den letzten 24 h keine Zellteilung der KO Zellen stattgefunden (vgl. 4.2.5, Abb. 4.17). Auch die Zellviabilität der KO Zellen war im Vergleich zum WT bei 20 μM H_2O_2 um ca. 30 % vermindert. Nach 48 h waren keine lebensfähigen KO Zellen bei 30 μM H_2O_2 zu detektieren. Dies konnte bei WT Zellen erst bei einer Konzentration von 80 μM H_2O_2 gesehen werden (vgl. 4.2.5, Abb. 4.18).

In einem weiteren Assay wurde die intrazelluläre Konzentration an ROS bestimmt. Hierfür wurden die Zellen unter normalen Kulturbedingungen und unter dem Einfluss unterschiedlicher Noxen getestet: Antimycin A ist ein Inhibitor des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette, eine Hemmung führt zu oxidativem Stress und dem intrazellulärem Anstieg von ROS (Goda *et al.*, 1996). Hohe Konzentrationen Glucose führen nachweislich ebenfalls zu oxidativem Stress (Brownlee, 2001; Nishikawa *et al.*, 2000). Es konnten unter allen getesteten Bedingungen deutlich höhere intrazellulärer ROS-Spiegel in KO Zellen beobachtet werden. Wie erwartet waren die ROS-Spiegel unter der Behandlung mit Antimycin A am höchsten, 50 mM Glucose und überraschenderweise auch 20 μM H_2O_2 zeigten hingegen keine höheren ROS-Level als unter normalen Kulturbedingungen. Eine mögliche Erklärung für gleichbleibende ROS-Level nach 24 h unter 20 μM H_2O_2 könnte sein, dass die Zellphysiologie schon zu stark beeinträchtigt war, sodass ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Es sollten in Zukunft einmal kürzere Zeiträume und geringere Konzentrationen getestet werden.

Bei einem zweiten Assay konnte anschließend keine erhöhte Konzentration intrazellulärer Lipidperoxide detektiert werden. Die Beobachtung war unerwartet, könnte aber darin begründet sein, dass KO Zellen weniger intrazelluläre Lipidakkumulationen aufweisen (vgl. 4.4.2, Abb. 4.26) und dadurch vorwiegend andere Strukturen in KO Zellen oxidiert werden.

Ein weites Spektrum an H_2O_2 reduzierenden Enzymen konnte bereits identifiziert werden. In diesem Kontext sind v.a. die Katalase, Peroxiredoxine sowie Isoenzyme der Glutathionperoxidase zu nennen. Es handelt sich hierbei um Enzyme unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation die im ER, Cytosol, Zellkern, der inneren mitochondrialen Membran, dem mitochondrialen Intermembranraum und in Peroxisomen zu finden sind (Cox *et al.*, 2010; Florian *et al.*, 2009; Frederick & Newcomb, 1969). mARC ist mit seiner Lokalisation an der OMM einzigartig. Es ist denkbar, dass mARC an der OMM eine Schutzfunktion hat, um hier Membranlipide vor einer Peroxidierung zu schützen. Diese würde zu einer Beeinträchtigung der Integrität der Zellmembran führen, was wiederum

zu einer mitochondrialen Dysfunktion und oxidativem Stress führen kann. Ebenfalls sind die Mitochondrien durch die Atmungskette einer der wesentlichen Quellen von ROS (Cadenas, 2018; Berg *et al.*, 2018). H_2O_2 hingegen wird hauptsächlich in Peroxisomen, genauer der peroxisomalen β -Oxidation gebildet (Tsukamoto *et al.*, 1995). Verschiedene Studien an Mäusen und Ratten legen auch die Möglichkeit einer dualen Lokalisation von mARC in Mitochondrien und Peroxisomen nahe (Islinger *et al.*, 2007; Wiese *et al.*, 2007), somit könnte die Kolokalisation auch im mARC-vermittelten antioxidativen Stoffwechsel begründet sein.

In zukünftigen Studien sollten hieran anknüpfend weitere ROS und RNS also mögliche mARC-Substrate analysiert und charakterisiert werden.

Die *in cellulo* Analytik eines *MTARC*-KOs bietet noch viele Möglichkeiten, an die in zukünftigen Studien angeknüpft werden sollte. So ist zum einen interessant, ob durch geeignete *Rescue*-Experimente eine mARC1-Expression durch eine transiente Transfektion entsprechender mARC1-exprimierender Plasmide, erzeugt werden kann. Der Phänotyp der Zellen kann anschließend mit dem Phänotyp der WT Zellen in den bereits etablierten Methoden anhand der *N*-Reduktion, Wachstumsrate und Sensibilität gegenüber toxischen *N*-hydroxylierten Substraten charakterisiert werden. Auf diesem Weg können eventuelle *Off Target*-Ereignisse beurteilt werden.

Ebenfalls sollte die subzelluläre Lokalisation von mARC durch entsprechende histochemische Untersuchungen weiter beleuchtet werden. So ist die Kolokalisation von mARC in Peroxisomen zwar beschrieben, bis jetzt jedoch völlig ungeklärt (Wiese *et al.*, 2007; Islinger *et al.*, 2007). Im Gegensatz hierzu ist eine peroxisomale Kolokalisation von CYB5B und CYB5R bis *dato* nicht beschrieben, daher ist die Identifizierung der peroxisomalen Funktion von mARC von hohem Interesse. Ebenfalls kann im gleichen Atemzug die Lokalisation von CYB5B und CYB5R detektiert werden, um so eine *Moonlighting*-Funktion von mARC zu bestätigen.

Die Erzeugung eines stabilen h*MTARC2* KOs sollte ebenfalls Ziel zukünftiger Forschung sein. Auf diese Weise könnte untersucht werden, ob hmARC1 und hmARC2 unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen, oder ob eines der beiden mARC-Proteine nur als *Backup*-Enzym fungiert. Hierbei sollten nicht nur die WT-Zelllinien verwendet werden, sondern parallel, um einen stabilen Doppel-KO zu generieren, die *MTARC1*-KO Zellen. Soweit die Doppel-KO Zelllinien lebensfähig sind, sollten die unterschiedlichen genmanipulierten sowie und WT Zelllinien charakterisiert werden, um die Funktion der paralogen Proteine näher zu untersuchen.

5.3 Auswirkung eines *MTARC*-KOs auf den Lipidstoffwechsel

Bereits seit über 10 Jahren wird eine funktionelle Verbindung zwischen mARC und dem Fettstoffwechsel diskutiert. Teslovich *et al.* zeigten 2010 einen SNP im *MTARC1*-Locus, der mit veränderten Plasmakonzentrationen für Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin im Menschen einhergeht (2010). Newton *et al.* und Neve *et al.* zeigten unabhängig voneinander eine gesteigerte Expression von mARC2 bei der Differenzierung und Reifung muriner 3T3-L1-Adipozyten (2011; 2012). Hieran angeknüpft zeigte Jakobs *et al.*, dass die mARC1- und mARC2-Proteinlevel in Lebern von Mäusen unter HFD erhöht sind, wie auch die *N*-reduktive Aktivität in diesen Geweben. Nahrungskarenz hingegen führte zu einer Herunterregulation des *N*-reduktiven Systems (2014b). Neueste Studien, darunter v.a. genomweite Assoziationsstudien, brachten die mARC1-Variante A165T, eine Mutation des *MTARC1*-Gens (rs2642438), mit einem verringerten Risiko für Lebererkrankungen in Form einer NAFLD und AFLD sowie einer NASH in Verbindung (Schneider *et al.*, 2021; Emdin *et al.*, 2020; Innes *et al.*, 2020, Haas *et al.*, 2020). Diese Variante, die in bisherigen Studien mit einer Häufigkeit von ca. 7 – 9 % beschrieben wird (Ott *et al.*, 2014b; Schneider *et al.*, 2021), ist assoziiert mit geringeren Werten für Leberlipide, niedrigere ALT-Serumspiegel, Gesamtcholesterin-, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin-Spiegel sowie erhöhten Serum-Triglycerid-Werten (Schneider *et al.*, 2021; Emdin *et al.*, 2020). Während sich also durch immer mehr Studien die Hypothese verfestigt, dass mARC wesentlich am Lipidstoffwechsel beteiligt ist, ist der genaue Mechanismus bis heute völlig ungeklärt.

Bemerkenswert ist hierbei, dass bei humanen Studien nach aktuellem Stand ausschließlich das *MTARC1*-Gen eine entscheidende Rolle im Lipidstoffwechsel spielt, während es in Tierstudien das *MTARC2*-Gen ist (Luukkonen *et al.*, 2020; Innes *et al.*, 2020; Emdin *et al.*, 2020). Hierbei ist jedoch erneut zu sagen, dass eine genaue Zuordnung der Bezeichnung mARC1 und mARC2 in verschiedenen Spezies lediglich auf Sequenzalignment beruht und ein direkter Vergleich dadurch nicht zu machen ist. Es ist außerdem möglich, dass *MTARC1* in genomweiten Assoziationsstudien als relevant identifiziert wird, weil dieses Enzym beim Menschen das dominante ist, während die starken phänotypischen Veränderungen, die mit einem *MTARC2*-KO im Mausmodell assoziiert sind, darauf zurückzuführen sind, dass mARC2 in Mäusen häufiger vorkommt (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.13 – 7.16) (Wu *et al.*, 2016; Neve *et al.*, 2015).

Die Anwendung aussagekräftiger Tiermodelle ist für die Grundlagenforschung, Genomforschung, Erforschung von Stoffwechselerkrankungen und klinischen Studien im Arzneimittel-Entwicklungsprozess unverzichtbar. In diesem Zusammenhang ist das

IMPC zu nennen, welches sich zum Ziel gesetzt hat, mithilfe von Mausmodellen die Funktion einzelner Gene aufzudecken. Eine Reihe von Mausmutantenlinien wurden hierbei bereits erzeugt und in Hochdurchsatz-Screenings phänotypisiert. Für die *MTARC2*-KO Maus war neben einem erhöhten Schreckreflex und einer verminderten Präpulsheftung ein vermindertes Körpergewicht ein deutliches und signifikantes Merkmal im Vergleich zu ihrem WT (*Dickinson et al.*, 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei der Untersuchung eines murinen *MTARC2*-KOs ebenfalls ein ausgeprägter Phänotyp beobachtet werden. *mARC2*-defiziente Mäuse waren resistent gegenüber einer durch eine hochkalorische Diät induzierte Adipositas. Serum-Analysen zeigten reduzierte Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen der KO Tiere. Erhöhte ALT- und γ GT-Werte konnten in WT Mäusen detektiert werden und deuteten auf eine Leberzellschädigung hin. Histologische Untersuchungen von Leberparenchym-Zellen der WT Tiere bestätigten dies und zeigten mikrovesikuläre Steatose und hepatozelluläre Ballonierung als Folge der hochkalorischen Diät. Entsprechende Gewebeuntersuchungen von *mARC2*-defizienten Tieren zeigten keine Anzeichen einer Steatose und damit einen *MTARC2*-KO-vermittelten hepatoprotektiven Effekt.

Interessanterweise zeigten *mARC1*-defiziente Mäuse im Gegensatz hierzu kein verändertes Körpergewicht und auch keine Resistenz gegenüber einer hochkalorisch-induzierten Adipositas. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die paraloge Proteine unterschiedliche Funktionen im Organismus erfüllen. Dies widerspricht der Hypothese von Gladwin *et al.*, die von einem vergleichbaren Phänotyp sowohl der *MTARC2*-KO als auch der *MTARC1*-KO Mäuse ausgehen und den KO beider Gene als therapeutisches *Target* zur Behandlung von Insulinresistenz beschreiben (2019).

Es ist denkbar, dass die Funktion im Lipidstoffwechsel des *hmARC1* im murinen Organismus durch das *mmARC2* erfüllt wird und diese Funktion unabhängig von der *N*-Reduktion zu betrachten ist.

Vergleicht man die Ergebnisse murinen *MTARC2*-KO Studie mit den aus humanen Studien, so können viele Parallelen gezogen werden. Verminderte Cholesterin-, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin-Werte konnten sowohl bei Patienten, die die A165T Variante tragen, als auch in *MTARC2*-KO Mäusen und Patienten beobachtet werden. Eine hepatoprotektive Wirkung konnte in *MTARC2*-KO Mäusen durch geringere Leberenzymwerte und dem Ausbleiben einer Steatose gesehen werden und ist ebenfalls für die A165T Variante beschrieben (*Schneider et al.*, 2021; *Emdin et al.*, 2020; *Innes et al.*, 2020, *Haas et al.*, 2020).

Bei dem direkten Vergleich lassen sich jedoch auch Unterschiede aufzeigen. In der vorliegenden Studie konnten, zumindest unter einer normokalorischen Diät, verminderte Konzentrationen an Triglyceriden in *MTARC2*-KO Mäusen detektiert werden, die in anderen Studien als erhöht beschrieben wird. Ebenfalls konnte unseren KO Mäusen ein signifikant vermindertes Körpergewicht nachgewiesen werden, während Patienten der Variante keinen veränderten BMI oder Taille-Hüft-Verhältnis aufzeigten (Emdin *et al.*, 2020; Schneider *et al.*, 2021). Dieser ausgeprägte Phänotyp konnte zudem nur in *mARC2*-defizienten Mäusen, nicht jedoch in *mARC1*-defizienten Mäusen beobachtet werden. Dies deutet zum aktuellen Stand darauf hin, dass im murinen Organismus *mARC2*, jedoch nicht *mARC1*, am Fettstoffwechsel beteiligt ist. Leider ist ein direkter Vergleich der Studien aufgrund der unterschiedlichen Nahrungszusammensetzung nicht möglich, daher sollte in einer zukünftigen Studie sowohl *mARC1*- als auch *mARC2*-defiziente Mäuse parallel mit derselben Diät gefüttert und verglichen werden.

Eine sehr interessante Beobachtung war außerdem, dass *mARC2*-defiziente Mäuse eine signifikant erhöhte Temperatur aufzeigten. Die Thermogenese steht metabolisch im Zusammenhang mit der Lipolyse von v.a. von braunem und beigem Fettgewebe (Braun *et al.*, 2018). Es ist beschrieben, dass Menge und Aktivität von thermogenem Fettgewebe sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen mit einer Verringerung der Adipositas und einer Verbesserung der Ganzkörper-Glucosehomöostase in Verbindung steht (Betz & Enerbäck, 2015; Kajimura *et al.*, 2015; Chondronikola *et al.*, 2014). Es bleibt in zukünftigen Studien zu zeigen, worin genau der Zusammenhang des *MTARC2*-KOs und der Thermogenese besteht.

Um die Beteiligung von *mARC* bei der Progression einer Fettleber zu diskutieren, wird im Weiteren die Pathophysiologie genauer betrachtet (Abb. 5.1).

Die hepatische Fettakkumulation ist das Resultat eines Ungleichgewichts zwischen Lipidaufnahme bzw. -synthese und dem Lipidabbau bzw. -abtransport. Die Lipid-Homöostase wird also durch 4 Hauptwege reguliert: Aufnahme von zirkulierenden Lipiden, *De-novo*-Lipogenese, Fettsäureoxidation und Export von Lipiden als VLDL. Die Aufnahme von Fetten wird in erster Linie durch Fettsäure-Transporter (FATP) reguliert, hepatisch spielen die Isoformen FATP2 und FATP5 eine entscheidende Rolle. Eine Beteiligung dieser Transporter bei der Progression einer Steatose wurde bereits beschrieben, so reduziert der KO beider Gene in einem Mausmodell in unterschiedlichen Studien die Leberverfettung. Ebenfalls ist die Genexpression beider Gene bei Jugendlichen mit NASH erhöht (Doege *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011; Falcon *et al.*, 2010).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Überexpression sowie eine Translokation des Thrombozytenglykoproteins 4 (CD36) vom Cytoplasma in die äußere Membran

gleichermaßen mit einer Steatose korreliert (Koonen *et al.*, 2007; Miquilena-Colina *et al.*, 2011).

Hydrophobe Fettsäuren werden intrazellulär an spezifische Fettsäure-bindende Proteine (FABP1) gebunden, die den Transport, die Speicherung und den Abbau der Fettsäuren sowie ihrer Acyl-CoA Derivate regulieren und somit eine protektive Wirkung gegen die zytotoxischen freien Fettsäuren haben (Wang *et al.*, 2015). Ebenfalls beeinflusst es die Expression von PPAR α (Wolfrum *et al.*, 2001). So sind sie bei einer Fettleibigkeit und Steatose meist erhöht, nehmen bei Fortschreiten zu einer Fibrose jedoch ab (Charlton *et al.*, 2009).

Die *De-novo*-Lipogenese wird entscheidend durch die Acetyl-CoA-Synthetase (ACS), die die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA katalysiert, eingeleitet. Anschließend katalysiert die Fettsäure-Synthase (FAS) die Synthese von Fettsäuren, v.a. Palmitinsäure, aus Malonyl-CoA und Acetyl-CoA. Anschließend können Desaturierungs-, Verlängerungs- und Veresterungsschritte folgen, bevor sie als Triglyceride gespeichert werden oder als VLDL die Leber verlassen. Eine gesteigerte *De-novo*-Lipogenese ist nachweislich mit einer Steatose und Steatohepatitis assoziiert (Listenberger *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2014).

Die *De-novo*-Lipogenese wird vorwiegend durch zwei Transkriptionsfaktoren reguliert, dem *Carbohydrate Responsive Element Binding Protein* (CHREBP), das durch Insulin und dem Leber-X-Rezeptor α aktiviert wird, und dem *Sterol Regulatory Element-Binding Protein* (SREBP1c), das durch Kohlenhydrate aktiviert wird (Eberlé *et al.*, 2004; Sanders & Griffin, 2016). Während SREBP1c die *De-novo*-Lipogenese erhöht und zur Akkumulation von Lipidtröpfchen und Progression einer Fettleber beiträgt, ist die Wirkung von CHREBP widersprüchlich sowohl als hepatoprotektiv als auch als hepatotoxisch beschrieben (Iizuka *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2017; Kohjima *et al.*, 2007). Die Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), die ebenfalls zusammen mit CYB5 und der CYB5R das Einfügen einer Doppelbindung in Position 9 einer Fettsäure katalysiert, hat ebenfalls einen protektiven Einfluss auf NAFLD (Paton & Ntambi, 2009; Benhamed *et al.*, 2012). Die SCD1 befindet sich, im Unterschied zu mARC, in den Mikrosomen und agiert zusammen dort mit der mikrosomalen Isoform Cytochrom b5 A (D'Arrigo *et al.*, 1993).

Die Oxidation von Fettsäuren wird von PPAR α reguliert und initiiert und findet vor allem in den Peroxisomen, Mitochondrien und im ER statt. Sie dient dem Energiegewinn in Form von ATP. Sehr lange Fettsäuren werden v.a. in der peroxisomalen β -Oxidation abgebaut, kürzere Fettsäuren in den Mitochondrien. Peroxisomale Enzyme, die auch mit einer Steatose in Verbindung gebracht werden, sind u.a. die *very long-chain acyl-CoA dehydrogenase* (VLCAD) und die Acyl-CoA-Oxidase (ACOX). Die *short-chain acyl-CoA dehydrogenase* (SCAD) ist Teil der mitochondrialen β -Oxidation, SCAD-defiziente

Mäuse zeigten analog zu ACOX-defizienten Mäusen eine verminderte Leberverfettung unter einer hyperkalorischen Diät. Bei sehr hohen Lipidkonzentrationen findet zudem die ω -Oxidation im ER statt. Die ω -Oxidation ist jedoch durch das Entstehen erheblicher Mengen ROS geprägt (Rao & Reddy, 2001). PPAR α -defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Inzidenz einer Steatose (Lee *et al.*, 1995). Hierzu hingegen waren erniedrigte Werte PPAR α erst bei Patienten mit einer NASH, nicht aber bei Patienten mit einer Steatose zu detektieren (Fujita *et al.*, 2009; Francque *et al.*, 2015).

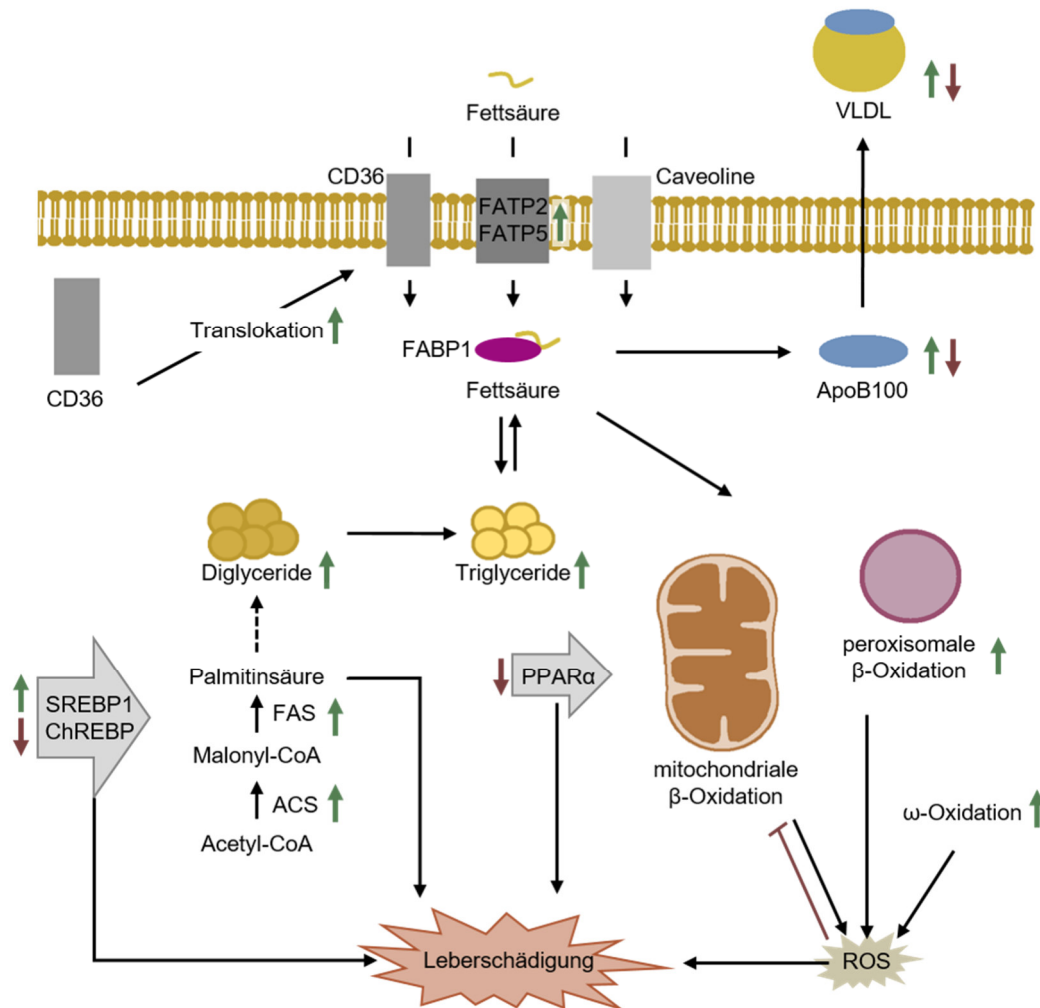


Abb. 5.1: Pathophysiologische Prozesse der NAFLD (nach Ipsen *et al.*, 2018)

Neben der Fettsäureoxidation ist der Export von VLDL der einzige Weg Leberlipide zu senken. VLDL wird im ER gebildet, indem das Apolipoprotein B100 (apoB100) durch das mikrosomale Triglycerid-Transferprotein lipidisiert wird (Ipsen *et al.*, 2018). Bei genetischen Defekten dieser beiden beteiligten Proteine ist eine Steatose sehr häufig zu beobachten (Tanoli *et al.*, 2004; Berriot-Varoqueaux *et al.*, 2000). Hohe Konzentrationen von Lipiden und oxidativer Stress können zu ER-Stress führen und so die Synthese des PPAR α -regulierten apoB100 senken und zu einer Steatose führen (Zhang, 2014). Die

Sekretion von VLDL läuft bei Lebererkrankungen biphasisch, so ist die bei einer Steatose anfangs erhöht und bei einer fortgeschrittenen Steatohepatitis erniedrigt (Tanoli *et al.*, 2004; Fabbrini *et al.*, 2009; Charlton *et al.*, 2002).

Bei der Betrachtung der Prozesse der Lipid-Homöostase und der Progression einer Fettleber stellt sich die Frage, an welcher Stelle mARC eine entscheidende Rolle spielen kann. So kann eine Akkumulation von Leberlipiden einer durch mARC-vermittelten höheren Aufnahme, gesteigerten *De-novo*-Lipogenese, einem verminderten oxidativen Abbau oder einem verminderten Export von VLDL zugrunde liegen.

Um die Beteiligung von mARC näher zu untersuchen, wird im Folgenden der Phänotyp des *MTARC2*-KOs mit den entsprechenden Phänotypen unterschiedlicher KO Modelle verglichen.

	Defizienz	TC	HDL	LDL	Glc	BW	TG	FLD
	mmARC2	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓
	hA165T	↓	↓	↓	N/A	↔	↑	↓
Aufnahme	FATP5	↑	N/A	N/A	N/A	↓	↓	↓
	CD36	↑	↑	N/A	N/A	N/A	↑	↓
Transport	FABP	↓	N/A	N/A	↔	↓	↑	↓
De-novo-Lipogenese	ACS	↓	N/A	N/A	↔	↓	↓	↓
	FAS				letal			
	SREBP	↓	N/A	N/A	↓/↔	↓	↓	↔
	CHREBP	↓	N/A	N/A	↑	↓	↓	↓
		HFD↔						
	PPARα	↑	↑	↔/↑	↔	↑	↔/↑	↑
	SCD1	↔	N/A	N/A	↓	↓	↓	↓
	CPT1A				letal			
β-Oxidation	SCAD	↓	N/A	N/A	↓	↓	↓	↓
	VLCAD	↑	N/A	N/A	↓/↔	↓	↑	↑
	ACOX	↔	N/A	N/A	↓	↓	↓	↓
VLDL-Sekretion	apoB100				letal			
	gp78	N/A	N/A	N/A	N/A	↑	N/A	↑

Tab. 5.3: Vergleich der Phänotypen unterschiedlicher KO Mausmodelle

TC, Gesamtcholesterin; HDL, *High-Density*-Lipoprotein; LDL, *Low-Density*-Lipoprotein; Glc, Glucose; TG, Triglyceride; FLD, Fettlebererkrankungen; FATP5, Fettsäure-Transporter 5; CD36, Thrombozytenglykoprotein 4; FABP, Fettsäure-bindendes Protein; ACS, Acetyl-CoA Synthetase; FAS, Fettsäure-Synthase; SREBP, *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*; CHREBP, *Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*; PPARα, Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren α; SCD1, Stearoyl-CoA Desaturase 1; CPT1A, Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1A; SCAD, *Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*; VLCAD, *Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*; ACOX, Acyl-CoA-Oxidase; VLDL, *Very-Low-Density*-Lipoprotein; apoB100, Apolipoprotein B100; gp78, Glycoprotein 78; N/A, keine Angabe. (Doege *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2020; Clugston *et al.*, 2014; Newberry *et al.*, 2006; Brundert *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2018b; Ramírez *et al.*, 2011; Attie *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 2007; Guerre-Millo *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Iizuka, 2017; Iizuka *et al.*, 2004; Nyman *et al.*, 2005; Tolwani *et al.*, 2005; Tucci *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2018; Hubbard *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2018; Rong *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2011; He *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2019).

Eine verminderte Aufnahme von Fettsäuren in die Leber resultierte bei entsprechenden FATP5- und CD36-defizienten Mausmodellen in signifikant erhöhten Serum- bzw. Plasma-Spiegeln von Cholesterin (Perez *et al.*, 2020; Hubbard *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse widersprechen unseren Ergebnissen von verminderten Cholesterin-Spiegeln sowohl im *MTARC2*-KO als auch bei Patienten, die die A165T Variante tragen.

Der KO des Fettsäurebindungsproteins (FABP) im Mausmodell resultiert in einem relativ ähnlichen Phänotyp zu dem der *MTARC2*-KO Maus. Interessanterweise konnte in der Studie von Newberry *et al.* keine veränderte Glucose-Konzentration im KO detektiert werden (2006). Auch gibt es für *mARC2*-defiziente Mäuse widersprüchliche Studien im Hinblick auf die Glucose-Konzentration. Während wir in dieser Studie erhöhte Glucose-Konzentrationen detektieren konnten, zeigten Gladwin *et al.* einen verminderten Blutzuckerspiegel (2019). Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass Gladwin *et al.* gezielt die Nüchternglucose (6 Stunden nach der Fütterung) gemessen haben, während in unserer Studie die Tiere vor der Bestimmung der Blutglucose nicht gefastet haben. In jedem Fall erlaubt der unterschiedliche Versuchsaufbau keinen direkten Vergleich der beiden Ergebnisse. Eine Protein-Protein-Interaktion des FABP beim Binden von Fettsäuren ist nicht beschrieben, dennoch kann eine Regulierung dieses Proteins auf Basis der Transkription oder Synthese geschehen (Wang *et al.*, 2015). FABP-defiziente Mäuse weisen erhöhte Serum-Triglycerid-Konzentrationen auf, analog zu Beobachtungen in Patienten mit der A165T-Variante, in dem *MTARC2*-KO Mausmodell hingegen waren Triglycerid-Konzentrationen, zumindest unter einer normokalorischen Diät, vermindert (Schneider *et al.*, 2021; Newberry *et al.*, 2006).

SCREBP, CHREBP und PPAR α sind, wie bereits beschrieben, Proteine/Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene und damit verschiedener Stoffwechselwege regulieren (Rakhshandehroo *et al.*, 2009; Dorotea *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2011). Ein Vergleich der entsprechenden Phänotypen ist war möglich, dennoch eine Beteiligung von *mARC* schwer zu diskutieren. So ist es durchaus denkbar, dass *mARC* selbst durch einen dieser Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Z.B. kann PPAR α eine negative Regulierung von *mARC* beeinflussen, oder CHREBP die Expression von *mARC* positiv regulieren.

Während der KO der FAS und der CPT1A im Mausmodell letal waren, zeigten ACS-defiziente Mäuse und SCD1-defiziente einen ähnlichen Phänotyp wie *MTARC2*-KO Mäuse. Somit kann in zukünftigen Untersuchungen eine suppressive Wirkung von *mARC* auf ACS untersucht werden. Ebenfalls besonders interessant ist die SCD-1, da dieses Enzym, analog zu *mARC*, mit den beiden Elektronentransferproteinen CYB5 und CYB5R das Einfügen einer Doppelbindung und somit eine reduktive Reaktion katalysiert. Es

kann diskutiert werden, ob mARC und SCD1 ggf. dieselbe Reaktion katalysieren, SCD1 in den Mikrosomen und mARC an der OMM (D'Arrigo *et al.*, 1993).

Eine Induktion durch mARC der Enzyme der β -Oxidation kann mithilfe dieses Vergleichs ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Wie auch anhand dieser Aufstellung zu sehen, sind Daten und Studien zur Fettsäure-Oxidation in Verbindung mit Steatose widersprüchlich und berichten über eine erhöhte (Miele *et al.*, 2003), unveränderte (Kotronen *et al.*, 2009) oder verminderte Fettsäureoxidation (Crocì *et al.*, 2013).

Zuletzt kann die verminderte Sekretion von VLDL und damit Cholesterin und Cholesterinestern sowie Triglyceriden eine weitere Ursache für ein Ungleichgewicht des Lipidstoffwechsels sein. Eine negative Beeinflussung der VLDL Sekretion durch eine Interaktion von mARC mit apoB100 könnte diskutiert werden. Entsprechende Tiermodelle zeigten, dass eine Deletion des apoB100 kurz nach der Geburt letal ist. Es können jedoch bei den fötalen Mäusen hohe Mengen akkumulierter Lipide in ER detektiert werden (Hamilton *et al.*, 1998). Mäuse, die eine verkürzte Form von apoB100, exprimieren, entwickelten eine Fettleber, die vermutlich auf die Unfähigkeit zurückzuführen ist, normale Mengen an VLDL-Triglycerid zu sezernieren (Chen *et al.*, 2000).

Studien zeigten, dass mARC neben dem *N*-reduktiven Metabolismus auch wesentliche physiologischen Vorgänge durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert. Bereits seit 2017 wird mARC als *Moonlighting*-Protein diskutiert. Zum einen aufgrund der unterschiedlichen katalysierten Reaktionen mehrerer physiologischer Substrate, zum anderen durch die Tatsache, dass sowohl Ein-Elektronen-, als Zwei-Elektronen-Substratreduktionen durch mARC beschrieben werden (Llamas *et al.*, 2017).

Ein schwerwiegendes Argument dafür lieferten dann Wu *et al.* (2020). Sie konnten zeigen, dass mARC2 durch eine Konkurrenzreaktion einen Suppressor der E3-Ubiquitin-Ligasen RNF123

und SKP2 darstellt und die Ubiquitinierung und damit den Abbau von p27 verhindert. p27 ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor. Durch eine inhibitorische Wirkung auf den Zellzyklus in der G1-Phase, provoziert so einen Zellzyklusarrest

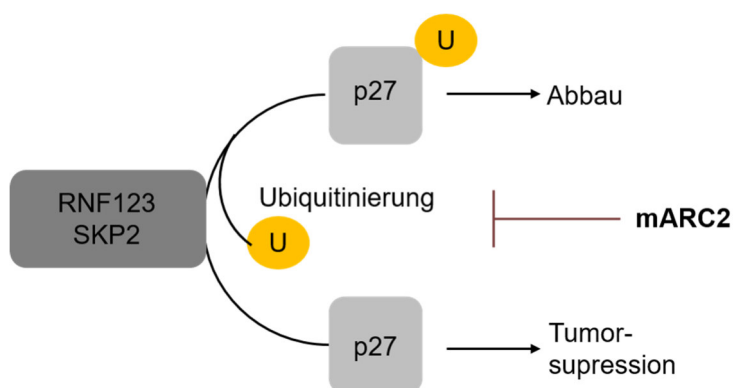


Abb. 5.2 tumorsuppressive Wirkung von mARC2 bei der Progression eines hepatozellulären Karzinoms

und wirkt somit tumorsuppressiv (Abb 5.2). Daher hat mARC2 durch diese Protein-Protein-Interaktion eine suppressive Wirkung bei der Progression eines hepatozellulären Karzinoms (Wu *et al.*, 2020). Ubiquitin-Ligasen sind ubiquitär vorkommende Proteine,

die meist durch die Ubiquitinierung von Proteinen deren Abbau induzieren (Zheng & Shabek, 2017). Es ist denkbar, dass analog hierzu mARC auch im Fettmetabolismus eine regulative Funktion als Ubiquitin-Ligasen-Antagonist erfüllt. So gibt es auch E3-Ubiquitinligasen die mit der Progression einer Fettleber assoziiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass der KO der E3-Ubiquitinligasen gp78, die ebenfalls mit der Sekretion von VLDL in Verbindung gebracht wird (Rusiñol *et al.*, 1994), mit dem Auftreten von NASH korreliert (Zhang *et al.*, 2015). Ebenfalls konnte in einem Mäusemodell das Auftreten einer AFLD mit dem KO der E3-Ubiquitinligase SMAD-spezifische E3-Ubiquitin-Protein-Ligase 1 (Smurf1) assoziiert werden (Petrasek *et al.*, 2019). An diese Interaktion von mARC sollte in weiteren Studien angeknüpft werden, um so ein mögliches *Target* zu identifizieren.

Zusammenfassend ist aufgrund der erhöhten Cholesterinspiegel eine Beteiligung von mARC an Aufnahmeprozessen von Fettsäuren in Hepatozyten anhand dieses Vergleichs auf den ersten Blick unwahrscheinlich, gilt es jedoch zu verifizieren. Interessante Ansätze für zukünftige Studien sind zum einen die Analogie zu ACS, SCD1 und FABP, die es zu untersuchen gilt sowie eine Beteiligung von mARC an der Sekretion von VLDL. Ebenfalls ist es gut möglich, dass mARC im Fettstoffwechsel die Ubiquitinierung eines Proteins hemmt und der verminderte Abbau dieses Proteins mit einer Lebererkrankung assoziiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben dem murinem mARC2 auch das humane mARC1 untersucht. Hierfür stand zum einen humanes Fettgewebe von Patienten, die die mARC1-Variante A165T tragen, zur Verfügung, zum anderen wurden humane mARC1-defiziente Zellen untersucht.

Die humane A165T Variante, ist, wie bereits beschrieben, mit einer verminderten Inzidenz von Lebererkrankungen, insbesondere Fettlebererkrankungen, Leberzirrhose und NASH assoziiert (Innes *et al.*, 2020; Emdin *et al.*, 2020). Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eine unveränderte *N*-reduktive Aktivität in A165T-exprimierendem humanen Fettgewebe (vgl. 4.4.1, Abb. 4.25). Die Bezeichnung dieses SNP als ‚*loss of function*‘-Mutation ist daher vermutlich nicht korrekt. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass diese Reduktion mARC-unabhängig ist, da vorherige Studien mit murinem KO-Gewebe, die eindeutige Beeinträchtigung der Reduktaseaktivität durch mARC-Defizienz zeigten (vgl. 4.1.2, Abb. 4.4). Somit konnten die Ergebnisse von Ott *et al.*, dass das rekombinant hergestellte A165T keinen signifikanten Unterschied in der Reduktase-Aktivität zeigt, bestätigt werden (2014b). Ebenfalls konnte keine verminderte Expression beobachtet werden. Da die Variante einen ähnlichen Phänotyp wie die mARC2-defiziente Maus aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass im Gegensatz zur Reduktaseaktivität die Funktion

im Lipidstoffwechsel beeinträchtigt ist. Diese Beobachtung befürwortet eine *Moonlighting*-Funktion von mARC.

Die Tatsache, dass die höchste Genexpression von mARC1 in humanen Adipozyten detektiert wird, wohingegen gleichzeitig eine geringe Mitochondriendichte in diesem Gewebe beschrieben ist, unterstützt diesen Beweis (vgl. Anhang 7.6, Abb. 7.13) (Wu *et al.*, 2016; Cedikova *et al.*, 2016). In diesem Zusammenhang ist in zukünftigen Studien die peroxisomale Kolokalisation von mARC näher zu charakterisieren.

Es kann zudem diskutiert werden, ob die Variante besonders vorteilhaft für die Patienten ist, da sie nicht nur hepatoprotektiv ist, sondern, da der reduktive Metabolismus nicht beeinträchtigt ist, auch antioxidativ und antimutagen wirkt. ROS haben, wie bereit beschrieben, ebenfalls einen großen Einfluss auf die Progression einer Lebererkrankung. Daher ist es möglich, dass auch die antioxidative Wirkung von mARC diesen Phänotyp bedingt. Es stellt sich die Frage, ob die systemische Hemmung von mARC als pharmakologisches *Target* erstrebenswert ist, oder ob eine organspezifische Anwendung angestrebt werden sollte, um so ungewollte Nebenwirkungen zu vermeiden.

Es bleibt zu zeigen, warum die Umsetzungsrate von Amitriptylin in diesem Gewebe so ungewöhnlich hoch war.

In Studien mit humanen mARC1-defizienten Zellen konnte gesehen werden, dass *MTARC1*-KO Zellen resistenter gegen eine Palmitat-induzierte Lipotoxizität waren (vgl. 4.4.3). Ebenfalls konnte als weiteres phänotypisches Merkmal der mARC1-defizienten Zellen, eine erhöhte Konzentration amphiphiler Lipide detektiert werden (vgl. 4.4.2). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit einer Studie von Luukkonen *et al.*. Sie zeigten ebenfalls eine höhere Konzentrationen von mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholinen bei Patienten, die die A165T Variante trugen und assoziierten die hepatischen Phosphatidylcholine mit der Progression einer NAFLD (2020). Hudert *et al.* berichteten ebenfalls über Veränderungen der Phosphatidylcholinen im Plasmalipidom (2020).

Die NAFLD und NASH sind hepatische Manifestationen von Fettleibigkeit und gehen mit einer Abnahme der Phospholipide in der Leber einher (Otto *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2006). Es kann daher vermutet werden, dass die Verbindung von mARC und Lebererkrankungen bei dem Stoffwechsel der Phospholipide liegt. Es bleibt zu zeigen, ob eine mARC-Defizienz den Abbau bzw. Umbau dieser Lipide stört, oder ob eine gesteigerte Synthese durch eine fehlende suppressive Wirkung von mARC erfolgt. Die Tatsache, dass die mARC1-defizienten HEK-293T Zellen resistenter gegen eine Palmitat-induzierte Lipotoxizität waren, lässt vermuten, dass WT und KO Zellen Palmitat unterschied-

lich verwerten können. Während die WT Zellen die Fettsäure zum Aufbau von Triglyceriden nutzen und diese intrazellulär als Akkumulationen lagern, verwenden KO Zellen Palmitat, um amphiphile Lipide, die v.a. in der Membran anzufinden sind, aufzubauen. Neben Palmitat, wurden die humanen Zellen zusätzlich mit hohen Konzentrationen an Glucose, Fructose und Insulin inkubiert. Diese hohe Konzentrationen, die nachweislich zu oxidativem Stress führen (Brownlee, 2001; Nishikawa *et al.*, 2000; Ly *et al.*, 2017; Softic *et al.*, 2016; Othman *et al.*, 2013) und mit einer Hyperglykämie, Diabetes mellitus, einer Hypertriglyceridämie und der NAFLD assoziiert sind (Laube *et al.*, 2004; Rada *et al.*, 2020), brachten in der durchgeführten Studie interessanterweise keine Unterschiede zwischen WT und KO hervor, ausschließlich Palmitat hatte einen Einfluss auf Zellviabilität und -proliferation.

Eine weitere Hypothese, die die Beteiligung von mARC an Fettstoffwechselprozessen erörtert und insbesondere eine Verbindung zur Progression einer Fettleber erklärt, ist eine mögliche mARC-vermittelte Reduktion von Nitrolipiden. Sie entstehen nicht-enzymatisch durch die Reaktion von Lipiden mit RNS bei bspw. Entzündungsreaktionen oder dem Verdau von Fettsäuren (Abb. 5.3) (Villacorta *et al.*, 2018; Turell *et al.*, 2018).

In einer Studie von Rom *et al.* konnte gezeigt werden, dass Nitrolipide die Triglycerid-Biosynthese und die Akkumulation in Hepatozyten hemmen. Es konnte eine Suppression von Entzündungsprozessen, Fibrose und Steatose gesehen werden. Ebenfalls konnte die Regulierung von Lipogenese- und Lipolyse-Wegen mit einer robusten Hemmung der proteolytischen Aktivierung von SREBP1 und der anschließenden Expression von Lipogenese-Genen durch Nitrolipide beobachtet werden (2019).

Die Tatsache, dass die N-Reduktaseaktivität in humanem Gewebe, das die A165T Variante exprimiert, unverändert ist, widerspricht jedoch eindeutig dieser These. In zukünftigen Studien könnte man zur Verifizierung die Reduktion von Nitrolipiden sowohl im Gewebe als auch im rekonstituierten System untersucht werden.

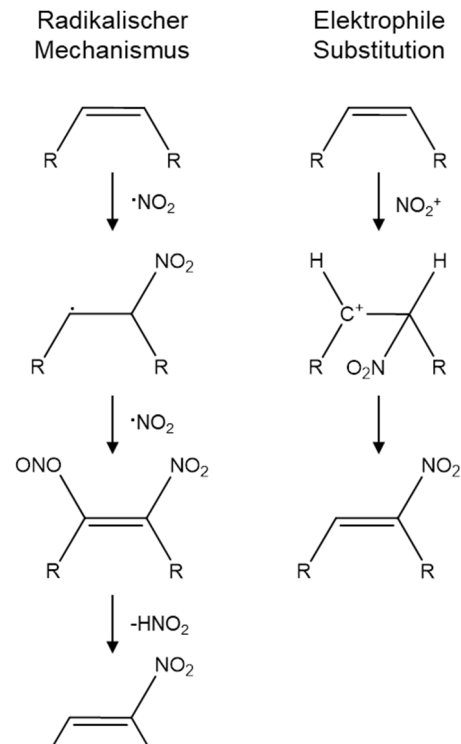


Abb. 5.3: Entstehung von Nitrolipiden
(nach Melo *et al.*, 2019)

Die CRISPR/Cas-Methode und entsprechende gen-manipulierte Zellen sind ein vielversprechendes Werkzeug, um in zukünftigen Studien die Auswirkung eines *MTARC*-KOs auf den Lipidstoffwechsel zu untersuchen.

Um einen tieferen Einblick in die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu gewinnen, stellen Transkriptomik-, Proteomik- und Metabolomik-Analysen einen Vielversprechenden Ansatz dar. Hierunter versteht man die quantitative Analyse aller transkribierten Gene, vorliegenden Proteine oder Metabolite. Diese Forschungsgebiete, die auf aufwendiger instrumenteller Analytik beruhen, sind wesentliche Werkzeuge der Grundlagenforschung. Ein Teilgebiet der Metabolomik stellt die Lipidomik dar, die die Zusammensetzung der vorliegenden Lipide genau analysiert. Die Analyse von Lipid-Mustern von mARC-defizienten Modellorganismen oder mARC-defizienten humanen Zellen im Vergleich zu entsprechenden WT-Proben könnte wesentlich zur Aufklärung der physiologischen Funktion von mARC beitragen. Ebenfalls wäre die Erkenntnis über veränderte Proteinexpressionsmuster, die durch den *MTARC*-KO bedingt sind, eine Möglichkeit Protein-Protein-Interaktionen oder Stoffwechsel- bzw. Signalwege zu identifizieren.

Ein weiterer, vielversprechender Ansatz zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wäre ein Biotinylierungs-Assay. Hierbei werden die Zellen transient mit einem Plasmid transfiziert, das eines der mARC-Proteine gekoppelt mit einer Biotinligase exprimiert. Anschließend werden intrazelluläre Interaktionspartner von mARC durch die Biotinligase biotinyliert. Diese biotinylierten Proteine können dann über ein *Pull-Down-Assay* isoliert werden und über eine umfassende Proteom-Analytik identifiziert werden. Auf diesem Weg können, abgesehen von CYB5B und CYB5R, Proteine entdeckt werden, die mit mARC interagieren.

Im Weiteren ist von hohem Interesse, *MTARC1* in weiteren humanen Zelllinien auszuknocken. Da die Leber den zentralen Ort des Xenobiotika-, Glucose- und Fettstoffwechsel darstellt und mARC in vielen Studien mit der Progression einer Fettleber assoziiert ist, sollte der nächste Schritt sein, eine mARC1-Defizienz in HepG2-Zellen zu erzeugen. Diese Zellen können dann ebenfalls mit den etablierten Methoden charakterisiert werden. Der *Knockout* von *MTARC1* und/oder *MTARC2* in murinen Zelllinien wäre ein weiterer Ansatz, um die Funktion der orthologen Proteine durch den Vergleich mit humanen Zellen aufzuklären. Ebenfalls können murine 3T3-L1-Adipozyten für den KO verwendet werden, um deren Differenzierung zu reifen Adipozyten, die Lipidakkumulation mittel *Nile Red*-Färbung bzw. die Lipidzusammensetzung durch Lipidomik zu untersuchen. Dies könnte einen essentiellen Einblick in die Funktion von mARC im Fettstoffwechsel aufzeigen.

6 Literaturverzeichnis

- Alberti, K. G. M.; Zimmet, P.; Shaw, J. (2005): The metabolic syndrome - a new world-wide definition. *Lancet* 366, 1059–1062.
- Alberti, K. G. M.; Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z.; Cleeman, J. I.; Donato, K. A.; Fruchart, J. C.; James, W. P. T.; Loria, C. M.; Smith, S. C. (2009): Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645.
- Alberti, K. G. M.; Zimmet, P.; Shaw, J. (2006): Metabolic syndrome - a new worldwide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* 23, 469–480.
- Alberti, K. G. M.; Zimmet, P. Z. (1998): Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* 15, 539–553.
- Alegria-Schaffer, A.; Lodge, A.; Vatter, K. (2009): Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. *Methods Enzymol.* 463, 573–599.
- Altschul, S. F.; Gish, W. (1996): Local alignment statistics. *Methods Enzymol.* 266, 460–480.
- Anderson, E. J.; Lustig, M. E.; Boyle, K. E.; Woodlief, T. L.; Kane, D. A.; Lin, C.-T.; Price, J. W.; Kang, L.; Rabinovitch, P. S.; Szeto, H. H.; *et al.* (2009): Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J. Clin. Investig.* 119, 573–581.
- Asakawa, T.; Matsushita, S. (1979): Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids* 14, 401–406.
- Attie, A. D.; Krauss, R. M.; Gray-Keller, M. P.; Brownlie, A.; Miyazaki, M.; Kastelein, J. J.; Lusis, A. J.; Stalenhoef, A. F. H.; Stoeck, J. P.; Hayden, M. R.; Ntambi, J. M. (2002): Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* 43, 1899–1907.
- Augé, N.; Maupas-Schwalm, F.; Elbaz, M.; Thiers, J. C.; Waysbort, A.; Itohara, S.; Krell, H.-W.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A. (2004): Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 110, 571–578.
- Ayala, A.; Muñoz, M. F.; Argüelles, S. (2014): Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 360438.
- Bauch, E.; Reichmann, D.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Manke, A. M.; Kurz, P.; Girreser, U.; Havemeyer, A.; Clement, B. (2015): Electrochemical and mARC-catalyzed enzymatic reduction of para-substituted benzamidoximes: Consequences for the prodrug concept "amidoximes instead of amidines". *ChemMedChem* 10, 360–367.
- Benhamed, F.; Denechaud, P. D.; Lemoine, M.; Robichon, C.; Moldes, M.; Bertrand-Michel, J.; Ratzu, V.; Serfaty, L.; Housset, C.; Capeau, J.; *et al.* (2012): The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Investig.* 122, 2176–2194.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Gatto jr., G. J.; Stryer, L. (2018): *Stryer Biochemie* (8. Auflage). Springer Spektrum. Berlin.
- Berriot-Varoqueaux, N.; Aggerbeck, L. P.; Samson-Bouma, M. E.; Wetterau, J. R. (2000): The role of the microsomal triglyceride transferprotein in a betalipoproteinemia. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 663–697.

- Betz, M. J.; Enerbäck, S. (2015): Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes* 64, 2352–2360.
- Biddinger, S. B.; Hernandez-Ono, A.; Rask-Madsen, C.; Haas, J. T.; Alemán, J. O.; Suzuki, R.; Scapa, E. F.; Agarwal, C.; Carey, M. C.; Stephanopoulos, G.; *et al.* (2008): Hepatic Insulin Resistance Is Sufficient to Produce Dyslipidemia and Susceptibility to Atherosclerosis. *Cell Metab.* 7, 125–134.
- Blake, J. A.; Bult, C. J.; Kadin, J. A.; Richardson, J. E.; Eppig, J. T. (2011): The Mouse Genome Database (MGD): Premier model organism resource for mammalian genomics and genetics. *Nucleic Acids Res.* 39, D842–D848.
- Braun, K.; Oeckl, J.; Westermeier, J.; Li, Y.; Klingenspor, M.; Suarez, R. K.; Hoppeler, H. H. (2018): Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. *J. Exp. Biol.* 221, 406.
- Brovarets', O. O.; Hovorun, D. M. (2019): Key microstructural mechanisms of the 2-aminopurine mutagenicity: Results of extensive quantum-chemical research. *J. Biomol. Struct.* 37, 2716–2732.
- Brownlee, M. (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
- Brundert, M.; Heeren, J.; Merkel, M.; Carambia, A.; Herkel, J.; Groitl, P.; Dobner, T.; Ramakrishnan, R.; Moore, K. J.; Rinninger, F. (2011): Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J. Lipid Res.* 52, 745–758.
- Burdon, R. H.; Rice-Evans, C. (1989): Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* 6, 345–358.
- Burgis, N. E.; Brucker, J. J.; Cunningham, R. P. (2003): Repair System for Noncanonical Purines in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 185, 3101–3110.
- Butzler, M.; Worzella, T.; Hungriano, M.; Osorio, F.; Hanegraaff, I.; Cowan, C. (2014): Automated cytotoxicity profiling using the CyBi®-FeliX instrument, cell health assays and thaw-and-use cells. <https://www.promega.de/resources/pubhub/automated-profiling-using-the-cybi-felix-instrument-cell-health-assays-and-thaw-and-use-cells/>.
Aufgerufen am 25.08.2021.
- Cadenas, S. (2018): Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1859, 940–950.
- Cedikova, M.; Kripnerová, M.; Dvorakova, J.; Pitule, P.; Grundmanova, M.; Babuska, V.; Mullerova, D.; Kuncova, J. (2016): Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Int. J. Stem. Cells* 2016, 1–11.
- Charlton, M.; Sreekumar, R.; Rasmussen, D.; Lindor, K.; Nair, K. S. (2002): Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 35, 898–904.
- Charlton, M.; Viker, K.; Krishnan, A.; Sanderson, S.; Veldt, B.; Kaalsbeek, A. J.; Kendrick, M.; Thompson, G.; Que, F.; Swain, J.; Sarr, M. (2009): Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: New insights into the histologic spectrum of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1375–1384.
- Chattopadhyay, M.; Khemka, V. K.; Chatterjee, G.; Ganguly, A.; Mukhopadhyay, S.; Chakrabarti, S. (2015): Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol. Cell. Biochem.* 399, 95–103.
- Chen, X.; Li, X.; Wang, P.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Zhao, G.; Xu, H.; Zhu, J.; Qin, X.; Chen, S.; *et al.* (2010): Novel Association Strategy with Copy Number Variation for Identifying New Risk Loci of Human Diseases. *PLoS ONE* 5, e12185.
- Chen, Y.; Chen, J.; Zhang, C.; Yang, S.; Zhang, X.; Liu, Y.; Su, Z. (2019): Deficiency in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase protects mice against diet-induced obesity and insulin resistance. *FASEB J.* 33, 13722–13733.
- Chen, Z.; Fitzgerald, R. L.; Averna, M. R.; Schonfeld, G. (2000): A Targeted Apolipoprotein B-38.9-producing Mutation Causes Fatty Livers in Mice Due to the Reduced Ability of Apolipoprotein B-38.9 to Transport Triglycerides. *J. Biol. Chem.* 275, 32807–32815.

- Cheng, Z.; Almeida, F. A. (2014): Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: An epigenetic link. *Cell cycle* 13, 890–897.
- Cheng, Z.; Tseng, Y.; White, M. F. (2010): Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 589–598.
- Chiurchiù, V.; Maccarrone, M. (2011): Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2605–2641.
- Chondronikola, M.; Volpi, E.; Børsheim, E.; Porter, C.; Annamalai, P.; Enerbäck, S.; Lidell, M. E.; Saraf, M. K.; Labbe, S. M.; Hurren, N. M.; *et al.* (2014): Brown Adipose Tissue Improves Whole-Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes* 63, 4089–4099.
- Christian, M.; Cermak, T.; Doyle, E. L.; Schmidt, C.; Zhang, F.; Hummel, A.; Bogdanove, A. J.; Voytas, D. F. (2010): Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186, 757–761.
- Clement, B. (2002): Reduction of *N*-hydroxylated compounds: Amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab. Rev.* 34, 565–579.
- Clement, B.; Kunze, T. (1990): Hepatic microsomal *N*-hydroxylation of adenine to 6-*N*-hydroxylaminopurine. *Biochem. Pharmacol.* 39, 925–933.
- Clement, B.; Lopian, K. (2003): Characterization of in vitro biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab. Dispos.* 31, 645–651.
- Clement, B.; Mau, S.; Deters, S.; Havemeyer, A. (2005): Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 (1-(2*s*)-2-4-(hydroxyamino)iminomethylbenzoylamino-1-oxopropyl-4-piperidinyloxy-acetic acid). *Drug Metab. Dispos.* 33, 1740–1747.
- Clement, B.; Raether, W. (1985): Amidoximes of pentamidine: Synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittel-Forschung* 35, 1009–1014.
- Clugston, R. D.; Yuen, J. J.; Hu, Y.; Abumrad, N. A.; Berk, P. D.; Goldberg, I. J.; Blaner, W. S.; Huang, L.-S. (2014): CD36-deficient mice are resistant to alcohol- and high-carbohydrate-induced hepatic steatosis. *J. Lipid Res.* 55, 239–246.
- Cordeiro, J. V.; Jacinto, A. (2013): The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 249–262.
- Cox, A. G.; Winterbourn, C. C.; Hampton, M. B. (2010): Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* 425, 313–325.
- Croci, I.; Byrne, N. M.; Choquette, S.; Hills, A. P.; Chachay, V. S.; Clouston, A. D.; O'Moore-Sullivan, T. M.; Macdonald, G. A.; Prins, J. B.; Hickman, I. J. (2013): Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 62, 1625–1633.
- Dai, W.; Ye, L.; Liu, A.; Wen, S. W.; Deng, J.; Wu, X.; Lai, Z. (2017): Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Medicine* 96, e8179.
- D'Arrigo, A.; Manera, E.; Longhi, R.; Borgese, N. (1993): The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *J. Biol. Chem.* 268, 2802–2808.
- Desroches, S.; Lamarche, B. (2007): The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32, 23–32.
- Deveau, H.; Garneau, J. E.; Moineau, S. (2010): CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 475–493.
- Diaz, G.; Melis, M.; Batetta, B.; Angius, F.; Falchi, A. M. (2008): Hydrophobic characterization of intracellular lipids *in situ* by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron* 39, 819–824.
- Dickinson, M. E.; Flenniken, A. M.; Ji, X.; Teboul, L.; Wong, M. D.; White, J. K.; Meehan, T. F.; Weninger, W. J.; Westerberg, H.; Adissu, H.; *et al.* (2016): High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature* 537, 508–514.

- Doege, H.; Grimm, D.; Falcon, A.; Tsang, B.; Storm, T. A.; Xu, H.; Ortegon, A. M.; Kazantzis, M.; Kay, M. A.; Stahl, A. (2008): Silencing of Hepatic Fatty Acid Transporter Protein 5 in Vivo Reverses Diet-induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Improves Hyperglycemia. *J. Biol. Chem.* 283, 22186–22192.
- Dorotea, D.; Koya, D.; Ha, H. (2020): Recent Insights into SREBP as a Direct Mediator of Kidney Fibrosis via Lipid-Independent Pathways. *Front. Pharmacol.* 11, 31078.
- Eberlé, D.; Hegarty, B.; Bossard, P.; Ferré, P.; Foulle, F. (2004): SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848.
- Elahian, F.; Sepehrizadeh, Z.; Moghimi, B.; Mirzaei, S. A. (2014): Human cytochrome b5 reductase: Structure, function, and potential applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34, 134–143.
- el-Ghomari, K.; Gorrod, J. W. (1987): Metabolic N-oxygenation of 2,4-diamino-6-substituted pyrimidines. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 12, 253–258.
- El-Serag, H. B.; Rudolph, K. L. (2007): Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* 132, 2557–2576.
- Emdin, C. A.; Haas, M. E.; Khera, A. V.; Aragam, K.; Chaffin, M.; Klarin, D.; Hindy, G.; Jiang, L.; Wei, W.-Q.; Feng, Q.; *et al.* (2020): A missense variant in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 gene and protection against liver disease. *PLOS Genet.* 16, e1008629.
- Fabbrini, E.; Magkos, F.; Mohammed, B. S.; Pietka, T.; Abumrad, N. A.; Patterson, B. W.; Okunade, A.; Klein, S. (2009): Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 15430–15435.
- Falcon, A.; Doege, H.; Fluitt, A.; Tsang, B.; Watson, N.; Kay, M. A.; Stahl, A. (2010): FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 299, E384-E393.
- Field, A. E.; Coakley, E. H.; Must, A.; Spadano, J. L.; Laird, N.; Dietz, W. H.; Rimm, E.; Colditz, G. A. (2001): Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch. Intern. Med.* 161, 1581–1586.
- Finkelstein, E. A.; Brown, D. S.; Wragge, L. A.; Allaire, B. T.; Hoerger, T. J. (2010): Individual and aggregate years-of-life-lost associated with overweight and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 18, 333–339.
- Fitch, W. M. (1970): Distinguishing Homologous from Analogous Proteins. *Syst. Zool.* 19, 99.
- Flegal, K. M.; Carroll, M. D.; Kit, B. K.; Ogden, C. L. (2012): Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*, 307, 491–497.
- Florian, S.; Wingler, K.; Schmehl, K.; Jacobasch, G.; Kreuzer, O. J.; Meyerhof, W.; Brigelius-Flohé, R. (2009): Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic. Res.* 35, 655–663.
- Francque, S.; Verrijken, A.; Caron, S.; Prawitt, J.; Paumelle, R.; Derudas, B.; Lefebvre, P.; Taskinen, M.-R.; van Hul, W.; Mertens, I.; *et al.* (2015): PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 63, 164–173.
- Frederick, S. E., Newcomb, E. H. (1969): Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). *J. Cell Biol.* 43, 343–353.
- Freese, E. (1959): The specific mutagenic effect of base analogues on Phage T4. *J. Mol. Biol.* 1, 87 - 105
- Froier, D.; Clement, B.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Reichmann, D.; Schmalix, W.; Havemeyer, A. (2013): Activation of the anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica* 43, 780–784.
- Fujita, K.; Nozaki, Y.; Wada, K.; Yoneda, M.; Fujimoto, Y.; Fujitake, M.; Endo, H.; Takahashi, H.; Inamori, M.; Kobayashi, N.; Kirikoshi, H. (2009): Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* 50, 772–780.

- Furchgott, R. F.; Cherry, P. D.; Zawadzki, J. V.; Jothianandan, D. (1984): Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2, S336-43.
- Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, I. (2004): Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Investig.* 114, 1752–1761.
- Gill, H.; Mugo, M.; Whaley-Connell, A.; Stump, C.; Sowers, J. R. (2005): The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci.* 330, 290–294.
- Ginsel, C.; Plitzko, B.; Froriep, D.; Stofa, D. A.; Jung, M.; Kubitz, C.; Scheidig, A. J.; Havemeyer, A.; Clement, B. (2018): The Involvement of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) in the Reductive Metabolism of Hydroxamic Acids. *Drug Metab. Dispos.* 46, 1396–1402.
- Gladwin, M.; Sparacino-Watkins, C.; Jurczak, M. (2019): Method of treating insulin resistance. *U.S. patent US 20190160154 A1*.
- Go, A. S.; Mozaffarian, D.; Roger, V. L.; Benjamin, E. J.; Berry, J. D.; Blaha, M. J.; Dai, S.; Ford, E. S.; Fox, C. S.; Franco, S.; *et al.* (2014): Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update. *Circulation* 129, 1.
- Goda, N.; Suematsu, M.; Mukai, M.; Kiyokawa, K.; Natori, M.; Nozawa, S.; Ishimura, Y. (1996): Modulation of mitochondrion-mediated oxidative stress by nitric oxide in human placental trophoblastic cells. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 271, H1893-H1899.
- Gonzalez, F. J. (2005): Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutat. Res.* 569, 101–110.
- Grattagliano, I.; Vendemiale, G.; Lauterburg, B. H. (1999): Reperfusion Injury of the Liver: Role of Mitochondria and Protection by Glutathione Ester. *J. Surg. Res.* 86, 2–8.
- Gruenewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Schwering, U.; Mendel, R. R.; Clement, B. (2008): The fourth molybdenum containing enzyme mARC: Cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs. *J. Med. Chem.* 51, 8173–8177.
- Guerre-Millo, M.; Rouault, C.; Poulain, P.; Andre, J.; Poitout, V.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J.; Fruchart, J.-C.; Reach, G.; Staels, B. (2001): PPAR-/- Null Mice Are Protected From High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes* 50, 2809–2814.
- Günther, B. R. (1982): Verfahren zur Herstellung von 3-(10,11-Dihydro-5H-dibenzo *a,d*-cyclohepten-5-yliden)-*N,N*-dimethyl-1-propanamin-*N*-oxid-Dihydrat. *European Patent Office EP 0094560 B1*.
- Gustafsson, D.; Nyström, J.-E.; Carlsson, S.; Bredberg, U.; Eriksson, U.; Gyzander, E.; Elg, M.; Antonsson, T.; Hoffmann, K.-J.; Ungell, A.-L.; *et al.* (2001): The Direct Thrombin Inhibitor Melagatran and Its Oral Prodrug H 376/95: Intestinal Absorption Properties, Biochemical and Pharmacodynamic Effects. *Thromb. Res.* 101, 171–181.
- Guttman, M.; Amit, I.; Garber, M.; French, C.; Lin, M. F.; Feldser, D.; Huarte, M.; Zuk, O.; Carey, B. W.; Cassady, J. P.; *et al.* (2009): Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458, 223–227.
- Haas, M.E.; Pirruccello, J. P.; Friedman, S. N.; Emdin, C. A.; Ajmera, V. H.; Simon, T. G.; Homburger, J. R.; Guo, X.; Budoff, M.; Corey, K.E.; *et al.* (2020): Machine learning enables new insights into clinical significance of and genetic contributions to liver fat accumulation. *medRxiv* 2020.2009.2003.20187195.
- Hadi, H. A. R.; Carr, C. S.; Al Suwaidi, J. (2005): Endothelial dysfunction: Cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc. Health Risk Manag.* 1, 183–198.
- Haffner, S.; Taegtmeier, H. (2003): Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation* 108, 1541–1545.
- Haghdoust, S.; Sjölander, L.; Czene, S.; Harms-Ringdahl, M. (2006): The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 620–626.

- Hamilton, R. L.; Wong, J. S.; Cham, C. M.; Nielsen, L. B.; Young, S. G. (1998): Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J. Lipid Res.* 39, 1543–1557.
- Hashimoto, H.; Kubota, M.; Shimizu, T.; Takimoto, T.; Kitoh, T.; Akiyama, Y.; Mikawa, H. (1990): Biochemical basis of the prevention of 6-thiopurine toxicity by the nucleobases, hypoxanthine and adenine. *Leuk. Res.* 14, 1061–1066.
- Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B. (2006): Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 34796–34802.
- Havemeyer, A.; Grünewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Mendel, R.; Erdélyi, P.; Fischer, J.; Clement, B. (2010): Reduction of *N*-hydroxy-sulfonamides, including *N*-hydroxy-valdecoxib, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1917–1921.
- Havemeyer, A.; Lang, J.; Clement, B. (2011): The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: Current state of research. *Drug Metab. Rev.* 43, 524–539.
- He, A.; Chen, X.; Tan, M.; Chen, Y.; Lu, D.; Zhang, X.; Dean, J. M.; Razani, B.; Lodhi, I. J. (2020): Acetyl-CoA Derived from Hepatic Peroxisomal β -Oxidation Inhibits Autophagy and Promotes Steatosis via mTORC1 Activation. *Mol. Cell* 79, 30-42.e4.
- Hennig, E. E.; Mikula, M.; Goryca, K.; Paziewska, A.; Ledwon, J.; Nesteruk, M.; Woszczynski, M.; Walewska-Zielecka, B.; Pysniak, K.; Ostrowski, J. (2014): Extracellular matrix and cytochrome P450 gene expression can distinguish steatohepatitis from steatosis in mice. *J. Cell Mol. Med.* 18, 1762–1772.
- Hsu, P. D.; Scott, D. A.; Weinstein, J. A.; Ran, F. A.; Konermann, S.; Agarwala, V.; Li, Y.; Fine, E. J.; Wu, X.; Shalem, O.; Cradick, T. J.; Marraffini, L. A.; Bao, G.; Zhang, F. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832.
- Huang, B.; Liang, J.-J.; Zhuang, X.; Chen, S.-W.; Ng, T. K.; Chen, H. (2018a): Intravitreal Injection of Hydrogen Peroxide Induces Acute Retinal Degeneration, Apoptosis, and Oxidative Stress in Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 5489476.
- Huang, J.; Jia, Y.; Fu, T.; Viswakarma, N.; Bai, L.; Rao, M. S.; Zhu, Y.; Borensztajn, J.; Reddy, J. K. (2011): Sustained activation of PPAR α by endogenous ligands increases hepatic fatty acid oxidation and prevents obesity in ob/ob mice. *FASEB J.* 26, 628–638.
- Huang, Z.; Zhang, M.; Plec, A. A.; Estill, S. J.; Cai, L.; Repa, J. J.; McKnight, S. L.; Tu, B. P. (2018b): ACSS2 promotes systemic fat storage and utilization through selective regulation of genes involved in lipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E9499-E9506.
- Hubbard, B.; Doege, H.; Punreddy, S.; Wu, H.; Huang, X.; Kaushik, V. K.; Mozell, R. L.; Byrnes, J. J.; Stricker-Krongrad, A.; Chou, C. J.; *et al.* (2006): Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology* 130, 1259–1269.
- Hudert, C.A.; Alisi, A.; Anstee, Q. M.; Crudele, A.; Draijer, L. G.; Furse, S.; Hengstler, J. G.; Jenkins, B.; Karnebeek, K.; Kelly, D. A.; *et al.* (2020): Variants in MARC1 and HSD17B13 reduce severity of NAFLD in children, perturb phospholipid metabolism, and suppress fibrotic pathways. *medRxiv* 2020.2006.2005.20120956.
- Iizuka, K. (2017): The transcription factor carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP): A possible link between metabolic disease and cancer. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863, 474–485.
- Iizuka, K.; Bruick, R. K.; Liang, G.; Horton, J. D.; Uyeda, K. (2004): From The Cover: Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7281–7286.
- Indorf, P.; Kubitz, C.; Scheidig, A. J.; Kunze, T.; Clement, B. (2020a): Drug Metabolism by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Rapid Assay and Identification of New Substrates. *J. Med. Chem.* 63, 6538–6546.

- Indorf, P. (2020b): Entwicklung eines schnellen Assays zur Findung von Substraten und Inhibitoren der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC). *Dissertation*. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Innes, H.; Buch, S.; Hutchinson, S.; Guha, I. N.; Morling, J. R.; Barnes, E.; Irving, W.; Forrest, E.; Pedergnana, V.; Goldberg, D.; *et al.* (2020): Genome-Wide Association Study for Alcohol-Related Cirrhosis Identifies Risk Loci in MARC1 and HNRNPUL1. *Gastroenterology* 159, 1276-1289.e7.
- Ipsen, D. H.; Lykkesfeldt, J.; Tveden-Nyborg, P. (2018): Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3313–3327.
- Islinger, M.; Lüers, G. H.; Li, K. W.; Loos, M.; Völkl, A. (2007): Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 282, 23055–23069.
- Ismail, A.; Dumitraşcu, D. L. (2019): Cardiovascular Risk in Fatty Liver Disease: The Liver-Heart Axis—Literature Review. *Front. Med.* 6, e28.
- Ito, A. (1980): Cytochrome b5-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane; OM cytochrome b. I. Purification of OM cytochrome b from rat liver mitochondria and comparison of its molecular properties with those of cytochrome b5. *J. Biochem.* 87, 63–71.
- Iyanagi, T.; Watanabe, S.; Anan, K. F. (1984): One-electron oxidation-reduction properties of hepatic NADH-cytochrome b5 reductase. *Biochemistry* 23, 1418–1425.
- Jakobs, H. H.; Froriep, D.; Havemeyer, A.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Clement, B. (2014a): The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): Involvement in metabolic reduction of *N*-oxides, oximes and *N*-hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem* 9, 2381–2387.
- Jakobs, H. H.; Mikula, M.; Havemeyer, A.; Strzalkowska, A.; Borowa-Chmielak, M.; Dzwonek, A.; Gajewska, M.; Hennig, E. E.; Ostrowski, J.; Clement, B. (2014b): The *N*-reductive system composed of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b5 (CYB5B) and cytochrome b5 reductase (CYB5R) is regulated by fasting and high fat diet in mice. *PLoS ONE* 9, e105371.
- Janero, D. R. (1990): Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515–540.
- Janssen-Heininger, Y. M. W.; Mossman, B. T.; Heintz, N. H.; Forman, H. J.; Kalyanaraman, B.; Finkel, T.; Stamler, J. S.; Rhee, S. G.; van der Vliet, A. (2008): Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1–17.
- Jeffery, C. J. (2018): Protein moonlighting: What is it, and why is it important? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci.* 373.
- Jeong, Y. S.; Kim, D.; Lee, Y. S.; Kim, H. J.; Han, J. Y.; Im, S. S.; Chong, H. K.; Kwon, J. K.; Cho, Y. H.; Kim, W. K.; *et al.* (2011): Integrated Expression Profiling and Genome-Wide Analysis of ChREBP Targets Reveals the Dual Role for ChREBP in Glucose-Regulated Gene Expression. *PLoS ONE* 6, e22544.
- Kajimura, S.; Spiegelman, B. M.; Seale, P. (2015): Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* 22, 546–559.
- Keating, S. E.; Hackett, D. A.; Parker, H. M.; O'Connor, H. T.; Gerofi, J. A.; Sainsbury, A.; Baker, M. K.; Chuter, V. H.; Caterson, I. D.; George, J.; Johnson, N. A. (2015): Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J. Hepatol.* 63, 174–182.
- Kelley, D. E.; He, J.; Menshikova, E. V.; Ritov, V. B. (2002): Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2944–2950.
- Khromov-Borisov, N. N. (1997): Naming the mutagenic nucleic acid base analogs: The Galatea syndrome. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 379, 95–103.
- Kim, B. H.; Won, Y. S.; Kim, E. Y.; Yoon, M.; Nam, K. T.; Oh, G. T.; Kim, D. Y. (2003): Phenotype of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) deficient mice on mixed background fed high fat diet. *J. Vet. Sci.* 4, 239.

- Kogelman, L. J. A.; Cirera, S.; Zhernakova, D. V.; Fredholm, M.; Franke, L.; Kadarmideen, H. N. (2014): Identification of co-expression gene networks, regulatory genes and pathways for obesity based on adipose tissue RNA Sequencing in a porcine model. *BMC Med. Genom.* 7, 57.
- Kohjima, M.; Enjoji, M.; Higuchi, N.; Kato, M.; Kotoh, K.; Yoshimoto, T.; Fujino, T.; Yada, M.; Yada, R.; Harada, N.; Takayanagi, R.; Nakamuta, M. (2007): Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* 20, 351–358.
- Kolovou, G. D.; Anagnostopoulou, K. K.; Salpea, K. D.; Mikhailidis, D. P. (2007): The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *Am. J. Med. Sci.* 333, 362–371.
- Koonen, D. P.Y.; Jacobs, R. L.; Febbraio, M.; Young, M. E.; Soltys, C.-L. M.; Ong, H.; Vance, D. E.; Dyck, J. R.B. (2007): Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 56, 2863–2871.
- Kotronen, A.; Seppälä-Lindroos, A.; Vehkavaara, S.; Bergholm, R.; Frayn, K. N.; Fielding, B. A.; Yki-Järvinen, H. (2009): Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver Int.* 29, 1439–1446.
- Kotthaus, J.; Wahl, B.; Havemeyer, A.; Kotthaus, J.; Schade, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R.; Bittner, F.; Clement, B. (2011): Reduction of N(ω)-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem. J.* 433, 383–391.
- Kozmin, S. G.; Leroy, P.; Pavlov, Y. I.; Schaaper, R. M. (2008): YcbX and yjiM, two novel determinants for resistance of Escherichia coli to N-hydroxylated base analogues. *Mol. Microbiol.* 68, 51–65.
- Krischkowski, C. (2014): mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen porcinen und humanen Geweben und Studien zur submitochondrialen Lokalisation von mARC *Dissertation*. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Krompholz, N.; Krischkowski, C.; Reichmann, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Clement, B.; Havemeyer, A. (2012): The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2443–2450.
- Ladner, C. L.; Yang, J.; Turner, R. J.; Edwards, R. A. (2004): Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal. Biochem.* 326, 13–20.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lallukka, S.; Yki-Järvinen, H. (2016): Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 385–395.
- Lambert, J. E.; Ramos-Roman, M. A.; Browning, J. D.; Parks, E. J. (2014): Increased De Novo Lipogenesis Is a Distinct Characteristic of Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 146, 726–735.
- Larson-Meyer, D. E.; Newcomer, B. R.; Heilbronn, L. K.; Volaufova, J.; Smith, S. R.; Alfonso, A. J.; Lefevre, M.; Rood, J. C.; Williamson, D. A.; Ravussin, E. (2008): Effect of 6-Month Calorie Restriction and Exercise on Serum and Liver Lipids and Markers of Liver Function. *Obesity* 16, 1355–1362.
- Laube, H.; Klör, H. U.; Fussgänger, R.; Pfeiffer, E. F. (2004): The Effect of Starch, Sucrose, Glucose and Fructose on Lipid Metabolism in Rats. *Ann. Nutr. Metab.* 15, 273–280.
- Le Cong, F.; Ran, A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P. D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L. A.; Zhang, F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Lee, S.; Kang, S.; Ang, M. J.; Kim, J.; Kim, J. C.; Kim, S. H.; Jeon, T. I.; Jung, C.; Im, S. S.; Moon, C. (2018): Deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c induces schizophrenia-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behav.* 18, e12540.
- Lee, S. S.; Pineau, T.; Drago, J.; Lee, E. J.; Owens, J. W.; Kroetz, D. L.; Fernandez-Salguero, P. M.; Westphal, H.; Gonzalez, F. J. (1995): Targeted disruption of the alpha

- isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012–3022.
- Lewis, C. E.; McTigue, K. M.; Burke, L. E.; Poirier, P.; Eckel, R. H.; Howard, B. V.; Allison, D. B.; Kumanyika, S.; Pi-Sunyer, F. X. (2009): Mortality, health outcomes, and body mass index in the overweight range: A science advisory from the American Heart Association. *Circulation* 119, 3263–3271.
- Li, Z.; Agellon, L. B.; Allen, T. M.; Umeda, M.; Jewell, L.; Mason, A.; Vance, D. E. (2006): The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab.* 3, 321–331.
- Listenberger, L. L.; Han, X.; Lewis, S. E.; Cases, S.; Farese, R. V.; Ory, D. S.; Schaffer, J. E. (2003): Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3077–3082.
- Liu, J. D.; Leung, K. W.; Wang, C. K.; Liao, L. Y.; Wang, C. S.; Chen, P. H.; Chen, C. C.; Yeh, E.-K. (1998): Alcohol-Related Problems in Taiwan with Particular Emphasis on Alcoholic Liver Diseases. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 164S–169S.
- Liu, Y.; Ding, M.; Liao, X.; Gao, Q.; He, A.; Liu, B.; Hu, K.; Xie, H.; Zhou, Q.; Zhan, H.; *et al.* (2018): High expression of enhancer RNA MARC1 or its activation by DHT is associated with the malignant behavior in bladder cancer. *Exp. Cell Res.* 370, 303–311.
- Llomas, A.; Chamizo-Ampudia, A.; Tejada-Jimenez, M.; Galvan, A.; Fernandez, E. (2017): The molybdenum cofactor enzyme mARC: Moonlighting or promiscuous enzyme? *BioFactors* 43, 486–494.
- Lönn, M. E.; Dennis, J. M.; Stocker, R. (2012): Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 863–884.
- Luukkonen, P. K.; Juuti, A.; Sammalkorpi, H.; Penttilä, A. K.; Orešič, M.; Hyötyläinen, T.; Arola, J.; Orho-Melander, M.; Yki-Järvinen, H. (2020): MARC1 variant rs2642438 increases hepatic phosphatidylcholines and decreases severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans. *J. Hepatol.* 73, 725–726.
- Ly, L. D.; Xu, S.; Choi, S.-K.; Ha, C.-M.; Thoudam, T.; Cha, S.-K.; Wiederkehr, A.; Wollheim, C. B.; Lee, I.-K.; Park, K.-S. (2017): Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp. Mol. Med.* 49, e291–e291.
- Machado, M.; Marques-Vidal, P.; Cortez-Pinto, H. (2006): Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J. Hepatol.* 45, 600–606.
- Malik, A. N.; Rossios, C.; Al-Kafaji, G.; Shah, A.; Page, R. A. (2007): Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 237–244.
- Martin, S. D.; McGee, S. L. (2014): The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1303–1312.
- Marzetti, E.; Lees, H. A.; Wohlgemuth, S. E.; Leeuwenburgh, C. (2009): Sarcopenia of aging: Underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction. *BioFactors* 35, 28–35.
- Matsuda, M.; Shimomura, I. (2013): Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes. Res. Clin. Pract.* 7, e330–41.
- Matsuzawa-Nagata, N.; Takamura, T.; Ando, H.; Nakamura, S.; Kurita, S.; Misu, H.; Ota, T.; Yokoyama, M.; Honda, M.; Miyamoto, K.-i.; Kaneko, S. (2008): Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metab.: Clin. Exp.* 57, 1071–1077.
- Matteoni, C.; Younossi, Z.; Gramlich, T.; Boparai, N.; Liu, Y.; McCullough, A. (1999): Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116, 1413–1419.
- Melo, T.; Montero-Bullón, J.-F.; Domingues, P.; Domingues, M. R. (2019): Discovery of bioactive nitrated lipids and nitro-lipid-protein adducts using mass spectrometry-based approaches. *Redox Biol.* 23, 101106.

- Menezes, M. R.; Waisertreiger, I. S.-R.; Lopez-Bertoni, H.; Luo, X.; Pavlov, Y. I.; Zhivotovsky, B. (2012): Pivotal Role of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase in Maintaining Genome Stability and the Prevention of Apoptosis in Human Cells. *PLoS ONE* 7, e32313.
- Michelotti, G. A.; Machado, M. V.; Diehl, A. M. (2013): NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 656–665.
- Miele, L.; Grieco, A.; Armuzzi, A.; Candelli, M.; Forgione, A.; Gasbarrini, A.; Gasbarrini, G. (2003): Hepatic Mitochondrial Beta-Oxidation in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis Assessed by ¹³C-Octanoate Breath Test. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 2335–2336.
- Mikolasevic, I.; Filipec-Kanizaj, T.; Mijic, M.; Jakopcic, I.; Milic, S.; Hrstic, I.; Sobocan, N.; Stimac, D.; Burra, P. (2018): Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation - Where do we stand? *World J. Gastroenterol.* 24, 1491–1506.
- Mikula, M.; Rubel, T.; Karczmarski, J.; Goryca, K.; Dadlez, M.; Ostrowski, J. (2011): Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Funct. Integr. Genomics* 11, 215–224.
- Miller, J. C.; Holmes, M. C.; Wang, J.; Guschin, D. Y.; Lee, Y.-L.; Rupniewski, I.; Beausejour, C. M.; Waite, A. J.; Wang, N. S.; Kim, K. A.; *et al.* (2007): An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 25, 778–785.
- Min, H.-K.; Kapoor, A.; Fuchs, M.; Mirshahi, F.; Zhou, H.; Maher, J.; Kellum, J.; Warnick, R.; Contos, M. J.; Sanyal, A. J. (2012): Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 15, 665–674.
- Miner, J. N.; Ostertag, T.; Tan, P.; Jin, P. (2020): Compositions and methods for the diagnosis and treatment of diseases of the liver. *patent WO2020154567*.
- Miquilena-Colina, M. E.; Lima-Cabello, E.; Sanchez-Campos, S.; Garcia-Mediavilla, M. V.; Fernandez-Bermejo, M.; Lozano-Rodriguez, T.; Vargas-Castrillon, J.; Buque, X.; Ochoa, B.; Aspichueta, P.; *et al.* (2011): Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* 60, 1394–1402.
- Miyazaki, M.; Flowers, M. T.; Sampath, H.; Chu, K.; Otzelberger, C.; Liu, X.; Ntambi, J. M. (2007): Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase-1 Deficiency Protects Mice from Carbohydrate-Induced Adiposity and Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* 6, 484–496.
- Moncada, S.; Higgs, E. A. (2006): The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S193-201.
- Nascimbeni, F.; Pais, R.; Bellentani, S.; Day, C. P.; Ratzliff, V.; Loria, P.; Lonardo, A. (2013): From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J. Hepatol.* 59, 859–871.
- Negishi, K.; Bessho, T.; Hayatsu, H. (1994): Nucleoside and nucleobase analog mutagens. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* 318, 227–238.
- Neve, E. P. A.; Köfeler, H.; Hendriks, D. F. G.; Nordling, Å.; Gogvadze, V.; Mkrtchian, S.; Näslund, E.; Ingelman-Sundberg, M. (2015): Expression and Function of mARC: Roles in Lipogenesis and Metabolic Activation of Ximelagatran. *PLoS ONE* 10, e0138487.
- Neve, E. P. A.; Nordling, A.; Andersson, T. B.; Hellman, U.; Diczfalussy, U.; Johansson, I.; Ingelman-Sundberg, M. (2012): Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *The J. Biol. Chem.* 287, 6307–6317.
- Newberry, E. P.; Xie, Y.; Kennedy, S. M.; Luo, J.; Davidson, N. O. (2006): Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 44, 1191–1205.
- Newton, B. W.; Cologna, S. M.; Moya, C.; Russell, D. H.; Russell, W. K.; Jayaraman, A. (2011): Proteomic analysis of 3T3-L1 adipocyte mitochondria during differentiation and enlargement. *J. Proteome Res.* 10, 4692–4702.

- Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X. L.; Yamagishi, S.-i.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M. A.; Beebe, D.; Oates, P. J.; Hammes, H.-P.; *et al.* (2000): Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790.
- Nyman, L. R.; Cox, K. B.; Hoppel, C. L.; Kerner, J.; Barnoski, B. L.; Hamm, D. A.; Tian, L.; Schoeb, T. R.; Wood, P. A. (2005): Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol. Genet. Metab.* 86, 179–187.
- O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426.
- Ogden, C. L.; Carroll, M. D.; Fryar, C. D.; Flegal, K. M. (2015): Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2011–2014. *NCHS data br.* 1–8.
- O'Keefe, J. H.; Bell, D. S. H. (2007): Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.* 100, 899–904.
- Olijhoek, J. K.; van der Graaf, Y.; Banga, J.-D.; Algra, A.; Rabelink, T. J.; Visseren, F. L. J. (2004): The metabolic syndrome is associated with advanced vascular damage in patients with coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Eur. Heart J.* 25, 342–348.
- O'Rourke, R. W. (2018): Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 14, 1755–1763.
- Otani, H. (2011): Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1911–1926.
- Othman, E. M.; Kreissl, M. C.; Kaiser, F. R.; Arias-Loza, P.-A.; Stopper, H. (2013): Insulin-Mediated Oxidative Stress and DNA Damage in LLC-PK1 Pig Kidney Cell Line, Female Rat Primary Kidney Cells, and Male ZDF Rat Kidneys *In Vivo*. *Endocrinology* 154, 1434–1443.
- Ott, G.; Havemeyer, A.; Clement, B. (2015): The mammalian molybdenum enzymes of mARC. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 265–275.
- Ott, G.; Plitzko, B.; Krischkowski, C.; Reichmann, D.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Kunze, T.; Clement, B.; Havemeyer, A. (2014a): Reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine (SMX-HA) by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1687–1695.
- Ott, G.; Reichmann, D.; Boerger, C.; Cascorbi, I.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Kunze, T.; Clement, B.; Havemeyer, A. (2014b): Functional characterization of protein variants encoded by nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in MARC1 and MARC2 in healthy Caucasians. *Drug Metab. Dispos.* 42, 718–725.
- Otto, A.-C.; Gan-Schreier, H.; Zhu, X.; Tuma-Kellner, S.; Staffer, S.; Ganzha, A.; Liebisch, G.; Chamulitrat, W. (2019): Group VIA phospholipase A2 deficiency in mice chronically fed with high-fat-diet attenuates hepatic steatosis by correcting a defect of phospholipid remodeling. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 662–676.
- Parisinos, C. A.; Wilman, H. R.; Thomas, E. L.; Kelly, M.; Nicholls, R. C.; McGonigle, J.; Neubauer, S.; Hingorani, A. D.; Patel, R. S.; Hemingway, H.; *et al.* (2020): Genome-wide and Mendelian randomisation studies of liver MRI yield insights into the pathogenesis of steatohepatitis. *J. Hepatol.* 73, 241–251.
- Paton, C. M.; Ntambi, J. M. (2009): Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, E28–E37.
- Pear, W. S.; Nolan, G. P.; Scott, M. L.; Baltimore, D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8392–8396.
- Peng, J.; Yu, J.; Xu, H.; Kang, C.; Shaul, P. W.; Guan, Y.; Zhang, X.; Su, W. (2018): Enhanced Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP)-1c-Null Mice is Associated with Increased Hepatocellular Cholesterol Availability. *Cell. Physiol. Biochem.* 47, 784–799.
- Perez, V. M.; Gabell, J.; Behrens, M.; Wase, N.; DiRusso, C. C.; Black, P. N. (2020): Deletion of fatty acid transport protein 2 (FATP2) in the mouse liver changes the

- metabolic landscape by increasing the expression of PPAR α -regulated genes. *J. Biol. Chem.* 295, 5737–5750.
- Perumpail, B. J.; Khan, M. A.; Yoo, E. R.; Cholankeril, G.; Kim, D.; Ahmed, A. (2017): Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterology* 23, 8263–8276.
- Petrasek, J.; Erhartova, D.; Levine, B. (2019): Protective Effect of SMAD-Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 in Alcoholic Steatohepatitis in Mice. *Hepatology* 3, 1450–1458.
- Plitzko, B.; Havemeyer, A.; Bork, B.; Bittner, F.; Mendel, R.; Clement, B. (2016): Defining the Role of the NADH-Cytochrome-b5 Reductase 3 in the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzyme System. *Drug Metab. Dispos.* 44, 1617–1621.
- Plitzko, B.; Havemeyer, A.; Kunze, T.; Clement, B. (2015): The pivotal role of the mitochondrial amidoxime reducing component 2 in protecting human cells against apoptotic effects of the base analog N6-hydroxylaminopurine. *J. Biol. Chem.* 290, 10126–10135.
- Plitzko, B.; Ott, G.; Reichmann, D.; Henderson, C. J.; Wolf, C. R.; Mendel, R.; Bittner, F.; Clement, B.; Havemeyer, A. (2013): The involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2 and mitochondrial cytochrome b5 in *N*-reductive metabolism in human cells. *J. Biol. Chem.* 288, 20228–20237.
- Puddu, P.; Puddu, G. M.; Galletti, L.; Cravero, E.; Muscari, A. (2005): Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: A plausible hypothesis. *Cardiology* 103, 137–141.
- Rada, P.; González-Rodríguez, Á.; García-Monzón, C.; Valverde, Á. M. (2020): Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: Is CD36 a key driver? *Cell Death Dis.* 11, 793.
- Raff, J. E.; Kakati, D.; Bloomer, J.R.; Shoreibah, M.; Rasheed, K.; Singal, A. K. (2015): Diabetes Mellitus Predicts Occurrence of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Alcoholic Liver and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *J. Clin. Transl. Hepatology* 3, 9–16.
- Rakhshandehroo, M.; Hooiveld, G.; Müller, M.; Kersten, S.; Laudet, V. (2009): Comparative Analysis of Gene Regulation by the Transcription Factor PPAR α between Mouse and Human. *PLoS ONE* 4, e6796.
- Ramírez, C.; Sierra, S.; Tercero, I.; Vázquez, J. A.; Pineda, A.; Manrique, T.; Burgos, J. S.; Ikezu, T. (2011): ApoB100/LDLR-/- Hypercholesterolaemic Mice as a Model for Mild Cognitive Impairment and Neuronal Damage. *PLoS ONE* 6, e22712.
- Ran, F. A.; Hsu, P. D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8, 2281–2308.
- Rani, V.; Deep, G.; Singh, R. K.; Palle, K.; Yadav, U. C. S. (2016): Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 148, 183–193.
- Rao, M. S.; Reddy, J. K. (2001): Peroxisomal β -Oxidation and Steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 21, 43–56.
- Riedel, E.; Janiak, C. (2007): *Anorganische Chemie (7. Auflage)*. Walter de Gruyter. Berlin.
- Rinella, M. E. (2015): Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *JAMA* 313, 2263.
- RKI (2008): Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin". *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 51, 1464–1482.
- Rom, O.; Xu, G.; Guo, Y.; Zhu, Y.; Wang, H.; Zhang, J.; Fan, Y.; Liang, W.; Lu, H.; Liu, Y.; et al. (2019): Nitro-fatty acids protect against steatosis and fibrosis during development of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *EBioMedicine* 41, 62–72.
- Rong, S.; Cortés, V. A.; Rashid, S.; Anderson, N. N.; McDonald, J. G.; Liang, G.; Moon, Y.-A.; Hammer, R. E.; Horton, J. D. (2017): Expression of SREBP-1c Requires SREBP-2-mediated Generation of a Sterol Ligand for LXR in Livers of Mice. *eLife* 6, S15.

- Roy Chowdhury, S. K.; Sangle, G. V.; Xie, X.; Stelmack, G. L.; Halayko, A. J.; Shen, G. X. (2010): Effects of extensively oxidized low-density lipoprotein on mitochondrial function and reactive oxygen species in porcine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 298, E89-98.
- Rusiñol, A. E.; Cui, Z.; Chen, M. H.; Vance, J. E. (1994): A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 269, 27494–27502.
- Sachithanandan, N.; Fam, B. C.; Fynch, S.; Dzamko, N.; Watt, M. J.; Wormald, S.; Honeyman, J.; Galic, S.; Proietto, J.; Andrikopoulos, S.; *et al.* (2010): Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity¹. *Hepatology* 52, 1632–1642.
- Sadler, N. C.; Nandhikonda, P.; Webb-Robertson, B.-J.; Ansong, C.; Anderson, L. N.; Smith, J. N.; Corley, R. A.; Wright, A. T. (2016): Hepatic Cytochrome P450 Activity, Abundance, and Expression Throughout Human Development. *Drug Metab. Dispos.* 44, 984–991.
- Samuel, V. T.; Shulman, G. I. (2016): The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Investig.* 126, 12–22.
- Sander, J. D.; Dahlborg, E. J.; Goodwin, M. J.; Cade, L.; Zhang, F.; Cifuentes, D.; Curtin, S. J.; Blackburn, J. S.; Thibodeau-Beganny, S.; Qi, Y.; *et al.* (2011): Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat. Methods* 8, 67–69.
- Sanders, F. W. B.; Griffin, J. L. (2016): De novo lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev.* 91, 452–468.
- Sartorelli, A. C.; Bieber, A. L.; Chang, P. K.; Fischer, G. A. (1964): some inhibitory properties of 6-*N*-Hydroxylaminopurine: An analog of adenine and hypoxanthine. *Biochem. Pharmacol.* 13, 507–515.
- Savage, D. B. (2006): Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J. Clin. Investig.*, 116, 817–824.
- Savage, D. B.; Petersen, K. F.; Shulman, G. I. (2007): Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* 87, 507–520.
- Schneider, C. V.; Schneider, K. M.; Conlon, D. M.; Park, J.; Vujkovic, M.; Zandvakili, I.; Ko, Y.-A.; Trautwein, C.; Carr, R. M.; Strnad, P.; *et al.* (2021): A genome-first approach to mortality and metabolic phenotypes in MTARC1 p.Ala165Thr (rs2642438) heterozygotes and homozygotes. *Med* 2, 851-863.e3.
- Schneider, J.; Girreser, U.; Havemeyer, A.; Bittner, F.; Clement, B. (2018): Detoxification of Trimethylamine *N*-Oxide by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component mARC. *Chem. Res. Toxicol.* 31, 447–453.
- Shen, G. X. (2012): Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders. *Cardiovascular hematological disorders drug targets*, 12, 106–112.
- Shimada, M.; Hashimoto, E.; Taniai, M.; Hasegawa, K.; Okuda, H.; Hayashi, N.; Takasaki, K.; Ludwig, J. (2002): Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.*, 37, 154–160.
- Sies, H. (2017): Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613–619.
- Singal, A. G.; Manjunath, H.; Yopp, A. C.; Beg, M. S.; Marrero, J. A.; Gopal, P.; Waljee, A. K. (2014): The Effect of PNPLA3 on Fibrosis Progression and Development of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-analysis. *Am. J. Gastroenterology* 109, 325–334.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Softic, S.; Cohen, D. E.; Kahn, C. R. (2016): Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 61, 1282–1293.

- Spahis, S.; Borys, J.-M.; Levy, E. (2017): Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 445–461.
- Sparacino-Watkins, C. E.; Tejero, J.; Sun, B.; Gauthier, M. C.; Thomas, J.; Ragireddy, V.; Merchant, B. A.; Wang, J.; Azarov, I.; Basu, P.; Gladwin, M. T. (2014): Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *The J. Biol. Chem.* 289, 10345–10358.
- Stefano, G. B.; Challenger, S.; Kream, R. M. (2016): Hyperglycemia-associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders. *Eur. J. Nutr.* 55, 2339–2345.
- Stickel, F.; Hoehn, B.; Schuppan, D.; Seitz, H. K. (2003): Nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18, 357–373.
- Tannapfel, A.; Denk, H.; Dienes, H.-P.; Langner, C.; Schirmacher, P.; Trauner, M.; Flott-Rahmel, B. (2010): Histopathologische Diagnose der nicht alkoholischen und alkoholischen Fettlebererkrankung. *Z. Gastroenterol.* 48, 486–498.
- Tanoli, T.; Yue, P.; Yablonskiy, D.; Schonfeld, G. (2004): Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 45, 941–947.
- Targher, G.; Day, C. P.; Bonora, E. (2010): Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N. Eng. J. Med.* 363, 1341–1350.
- Teli, M.R.; Day, C.P.; James, O.F.W.; Burt, A.D.; Bennett, M.K. (1995): Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet*, 346, 987–990.
- Teslovich, T. M.; Musunuru, K.; Smith, A. V.; Edmondson, A. C.; Stylianou, I. M.; Koseki, M.; Pirruccello, J. P.; Ripatti, S.; Chasman, D. I.; Willer, C. J.; *et al.* (2010): Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466, 707–713.
- Tolwani, R. J.; Hamm, D. A.; Tian, L.; Sharer, J. D.; Vockley, J.; Rinaldo, P.; Matern, D.; Schoeb, T. R.; Wood, P. A.; Valle, D. (2005): Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Gene-Targeted Mice. *PLOS Genet.* 1, e23.
- Tsukamoto, H.; Horne, W.; Kamimura, S.; Niemelä, O.; Parkkila, S.; Ylä-Herttuala, S.; Brittenham, G. M. (1995): Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J. Clin. Investig.* 96, 620–630.
- Tucci, S.; Primassin, S.; Ter Veld, F.; Spiekerkoetter, U. (2010): Medium-chain triglycerides impair lipid metabolism and induce hepatic steatosis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-deficient mice. *Mol. Genet. Metab.* 101, 40–47.
- Turell, L.; Steglich, M.; Alvarez, B. (2018): The chemical foundations of nitroalkene fatty acid signaling through addition reactions with thiols. *Nitric Oxide* 78, 161–169.
- Villacorta, L.; Minarrieta, L.; Salvatore, S. R.; Khoo, N. K.; Rom, O.; Gao, Z.; Berman, R. C.; Jobbagy, S.; Li, L.; Woodcock, S. R.; Chen, Y. E.; *et al.* (2018): *In situ* generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol.* 15, 522–531.
- Wahl, B.; Reichmann, D.; Niks, D.; Krompholz, N.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Messerschmidt, T.; Rothkegel, M.; Biester, H.; Hille, R.; *et al.* (2010): Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *The J. Biol. Chem.* 285, 37847–37859.
- Waisertreiger, I. S. R.; Menezes, M. R.; Randazzo, J.; Pavlov, Y. I. (2010): Elevated Levels of DNA Strand Breaks Induced by a Base Analog in the Human Cell Line with the P32T ITPA Variant. *J. Nucleic. Acids* 2010, 1–11.
- Wang, F.; Guo, T.; Jiang, H.; Li, R.; Wang, T.; Zeng, N.; Dong, G.; Zeng, X.; Li, D.; Xiao, Y.; Hu, Q.; *et al.* (2018): A comparison of CRISPR/Cas9 and siRNA-mediated ALDH2 gene silencing in human cell lines. *Mol. Genet. Genom.* 293, 769–783.
- Wang, G.; Bonkovsky, H. L.; Lemos, A. de, Burczynski, F. J. (2015): Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J. Lipid Res.* 56, 2238–2247.
- Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B. J.; Koeth, R.; Levison, B. S.; Dugar, B.; Feldstein, A. E.; Britt, E. B.; Fu, X.; Chung, Y. M.; *et al.* (2011): Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472, 57–63.

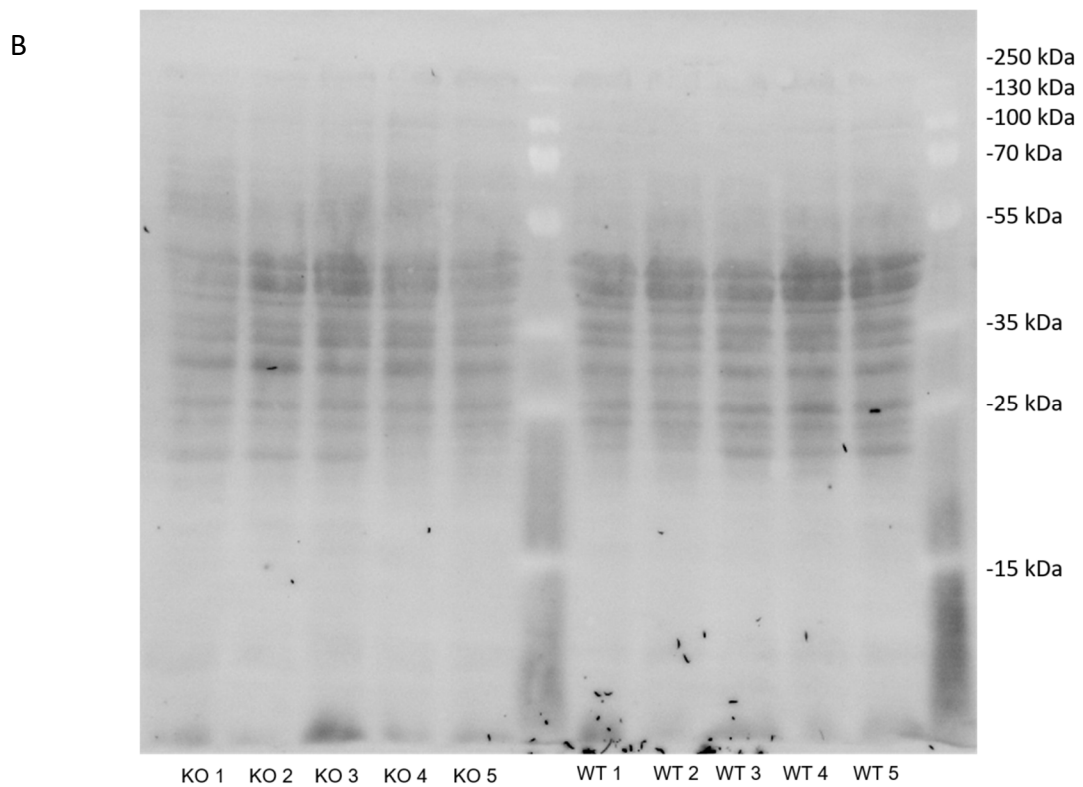
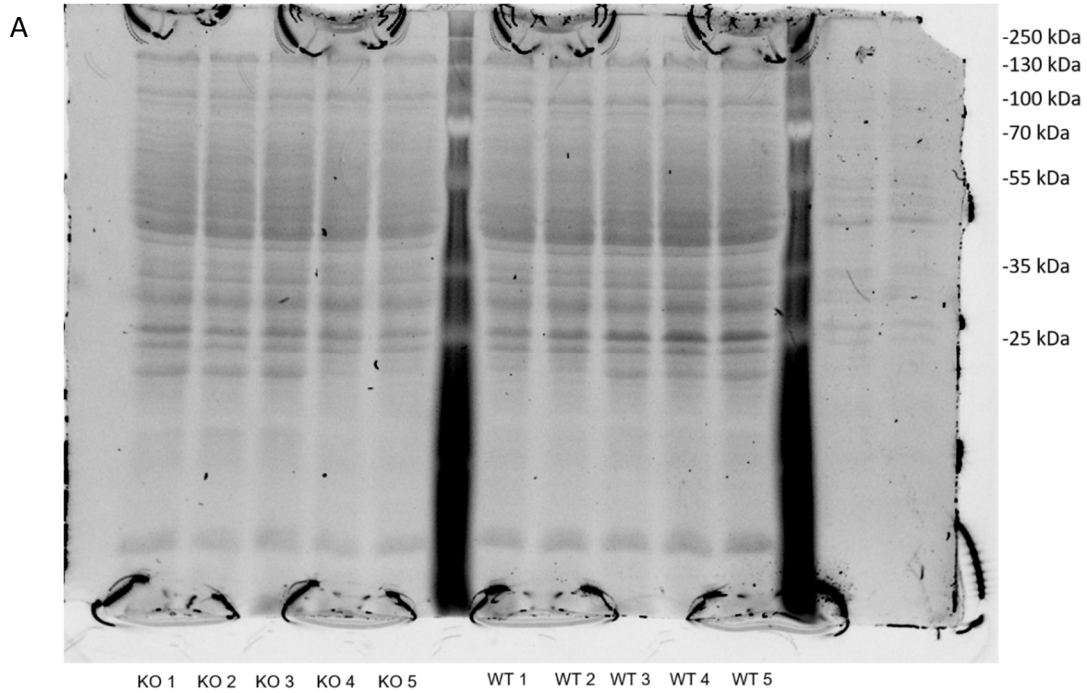
- Watkins, A. M.; Chan, P. J.; Kalugdan, T. H.; Patton, W. C.; Jacobson, J. D.; King, A. (1996): Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 709–712.
- Weltman, M. D.; Farrell, G. C.; Hall, P.; Ingelman-Sundberg, M.; Liddle, C. (1998): Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 27, 128–133.
- Weltman, M. D.; Farrell, G. C.; Liddle, C. (1996): Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 111, 1645–1653.
- Wiese, S.; Gronemeyer, T.; Ofman, R.; Kunze, M.; Grou, C. P.; Almeida, J. A.; Eisenacher, M.; Stephan, C.; Hayen, H.; Schollenberger, L.; *et al.* (2007): Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Mol. Cell Proteom.* 6, 2045–2057.
- Wolfrum, C.; Borrmann, C. M.; Borchers, T.; Spener, F. (2001): Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors and mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: A signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2323–2328.
- Wong, R. J.; Cheung, R.; Ahmed, A. (2014): Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology* 59, 2188–2195.
- Wood, A. J.; Lo, T. W.; Zeitler, B.; Pickle, C. S.; Ralston, E. J.; Lee, A. H.; Amora, R.; Miller, J. C.; Leung, E.; Meng, X.; *et al.* (2011): Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science* 333, 307.
- Wu, C.; Jin, X.; Tsueng, G.; Afrasiabi, C.; Su, A. I. (2016): BioGPS: Building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic Acids Res.* 44, D313–D316.
- Wu, D.; Wang, Y.; Yang, G.; Zhang, S.; Liu, Y.; Zhou, S.; Guo, H.; Liang, S.; Cui, Y.; Zhang, B.; *et al.* (2020): A novel mitochondrial amidoxime reducing component 2 is a favorable indicator of cancer and suppresses the progression of hepatocellular carcinoma by regulating the expression of p27. *Oncogene* 39, 6099–6112.
- Wyllie, A. H.; Morris, R. G.; Smith, A. L.; Dunlop, D. (1984): Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67–77.
- Xu, J.; Lloyd, D. J.; Hale, C.; Stanislaus, S.; Chen, M.; Sivits, G.; Vonderfecht, S.; Hecht, R.; Li, Y. S.; Lindberg, R. A.; *et al.* (2008): Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 58, 250–259.
- Younossi, Z. M.; Blissett, D.; Blissett, R.; Henry, L.; Stepanova, M.; Younossi, Y.; Racila, A.; Hunt, S.; Beckerman, R. (2016a): The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* 64, 1577–1586.
- Younossi, Z. M.; Koenig, A. B.; Abdelatif, D.; Fazel, Y.; Henry, L.; Wymer, M. (2016b): Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84.
- Zhang, D.; Christianson, J.; Liu, Z. X.; Tian, L.; Choi, C. S.; Neschen, S.; Dong, J.; Wood, P. A.; Shulman, G. I. (2010): Resistance to High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice with Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Cell Metab.* 11, 402–411.
- Zhang, D.; Tong, X.; VanDommelen, K.; Gupta, N.; Stamper, K.; Brady, G. F.; Meng, Z.; Lin, J.; Rui, L.; Omary, M. B.; Yin, L. (2017): Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *J. Clin. Investig.* 127, 2855–2867.
- Zhang, T.; Kho, D. H.; Wang, Y.; Harazono, Y.; Nakajima, K.; Xie, Y.; Raz, A.; Chellappan, S. P. (2015): Gp78, an E3 Ubiquitin Ligase Acts as a Gatekeeper Suppressing Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) and Liver Cancer. *PLoS ONE* 10, e0118448.
- Zhang, X. J.; She, Z. G.; Li, H. (2018): Time to step-up the fight against NAFLD. *Hepatology* 67, 2068–2071.

- Zhang, X.-Q. (2014): Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 1768.
- Zheng, N.; Shabek, N. (2017): Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 129–157.
- Zhu, L.; Baker, S. S.; Liu, W.; Tao, M. H.; Patel, R.; Nowak, N. J.; Baker, R. D. (2011): Lipid in the livers of adolescents with nonalcoholic steatohepatitis: Combined effects of pathways on steatosis. *Metabolism* 60, 1001–1011.

7 Anhang

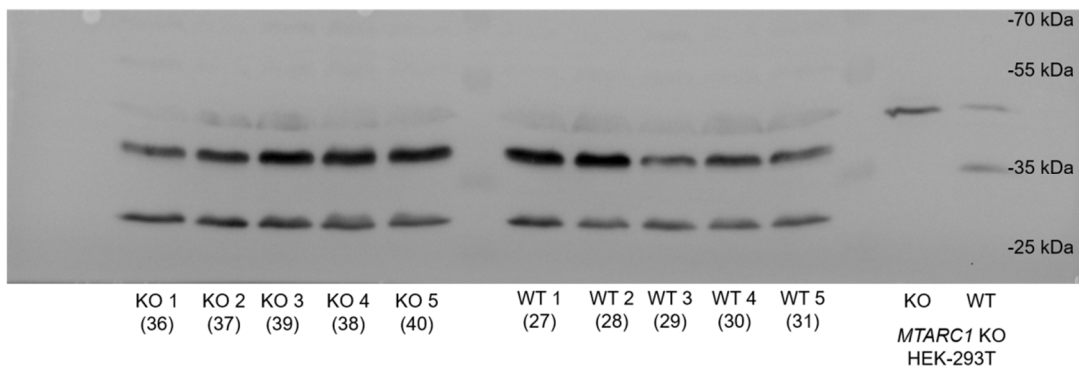
7.1 Western Blot – Ladekontrollen

7.1.1 *MTARC1*-KO Mäuse



C

Anti-mARC1



D

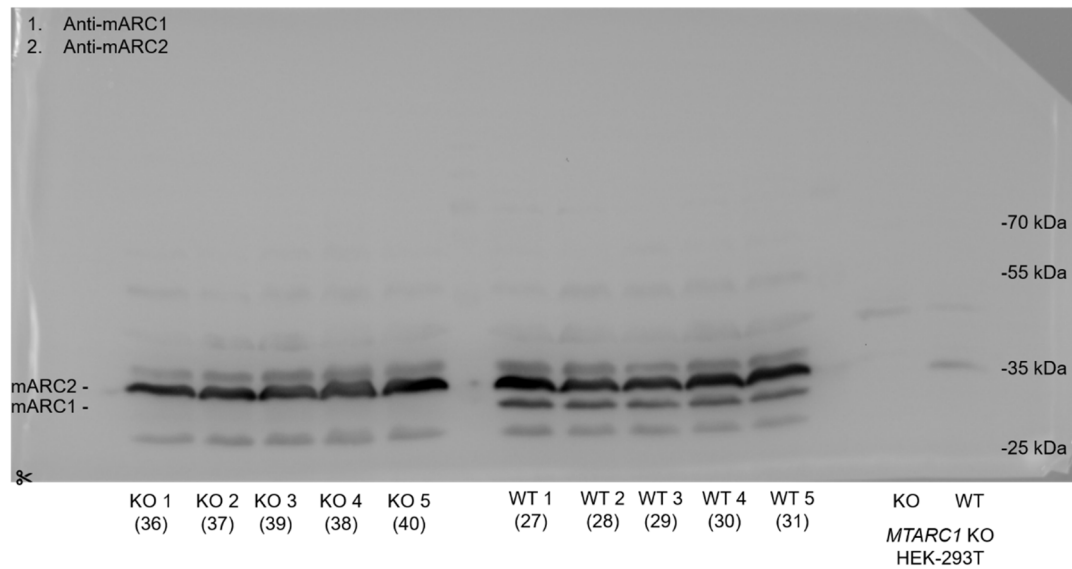


Abb. 7.1: Polyacrylamid-Gel und Western Blot der *MTARC1*-KO Mäuse und WT Mäuse.

(A) Aufnahme des Gels nach UV-Belichtung (B) fluoreszierende Proteine nach dem Western Blot auf der Membran; Die Membran wurde nach dem Blotting bei ca. 25 Da geschnitten, um die obere und untere Membran getrennt mit Antikörpern zu inkubieren. (C) Der obere, abgebildete Teil wurde mit anti-mARC1-Antikörpern inkubiert (D) anschließend wurde dieselbe Membran mit anti-mARC2-Antikörpern inkubiert (siehe abgeschnittene Spur in Abb. 4.3). Es zeigte sich, dass der anti-mARC1-Antikörper nicht für murine Proben geeignet ist und der anti-mARC2-Antikörper an beide mARC-Proteine bindet.

7.1.2 *MTARC2*-KO Mäuse



Abb. 7.2: Western Blot der *MTARC2*-KO Mäuse und WT Mäuse. Die Membran wurde nach dem Blotting bei ca. 25 Da geschnitten, um die obere und untere Membran getrennt mit Antikörpern zu inkubieren. Der obere Teil wurde mit anti-mARC2-Antikörpern inkubiert (siehe abgeschnittene Spur in Abb. 4.3). Der untere Teil wurde mit anti-COX4-Antikörpern inkubiert und dient der Ladekontrolle. Es zeigte sich auch hier, dass der anti-mARC2-Antikörper an beide mARC-Proteine bindet.

7.1.3 Leber, Niere, Lunge von WT Mäusen

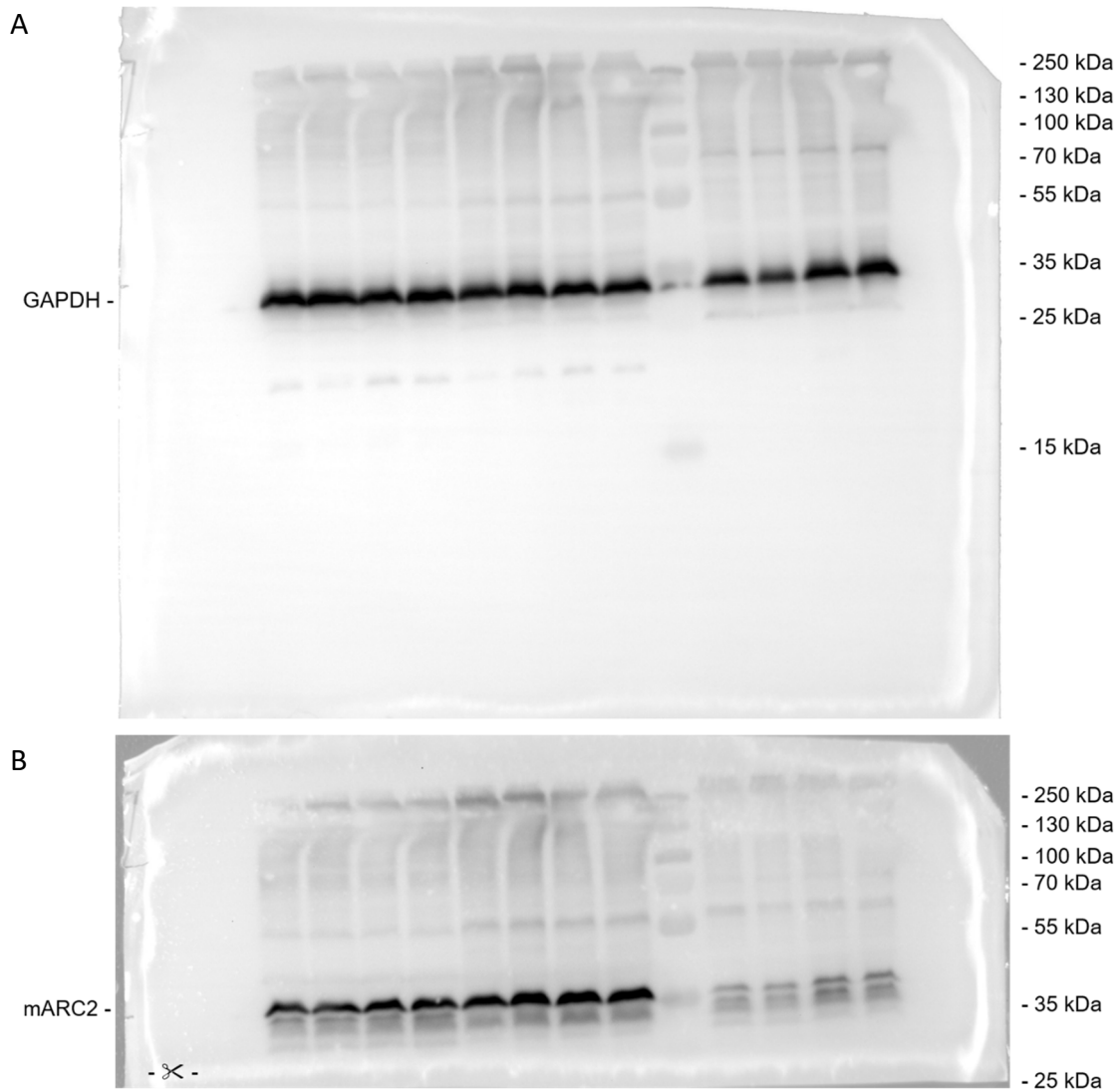


Abb. 7.3: mARC2-Expression unterschiedlicher Organe von WT Mäusen.

(A) Die Membran wurde nach dem Blotting mit einem anti-GAPDH-Antikörper inkubiert und entwickelt (siehe abgeschnittene Spur in Abb. 4.5). Anschließend wurde die Membran gestriipt und bei ca. 25 Da geschnitten, um die obere und untere Membran getrennt mit Antikörpern zu inkubieren. (B) Der obere Teil wurde anschließend mit anti-mARC2-Antikörpern inkubiert (siehe abgeschnittene Spur in Abb. 4.5). Der untere Teil wurde mit anti-COX4-Antikörpern inkubiert und dient der Ladekontrolle.

7.1.4 HEK-293T *MTARC1*^{-/-} und WT Zellen

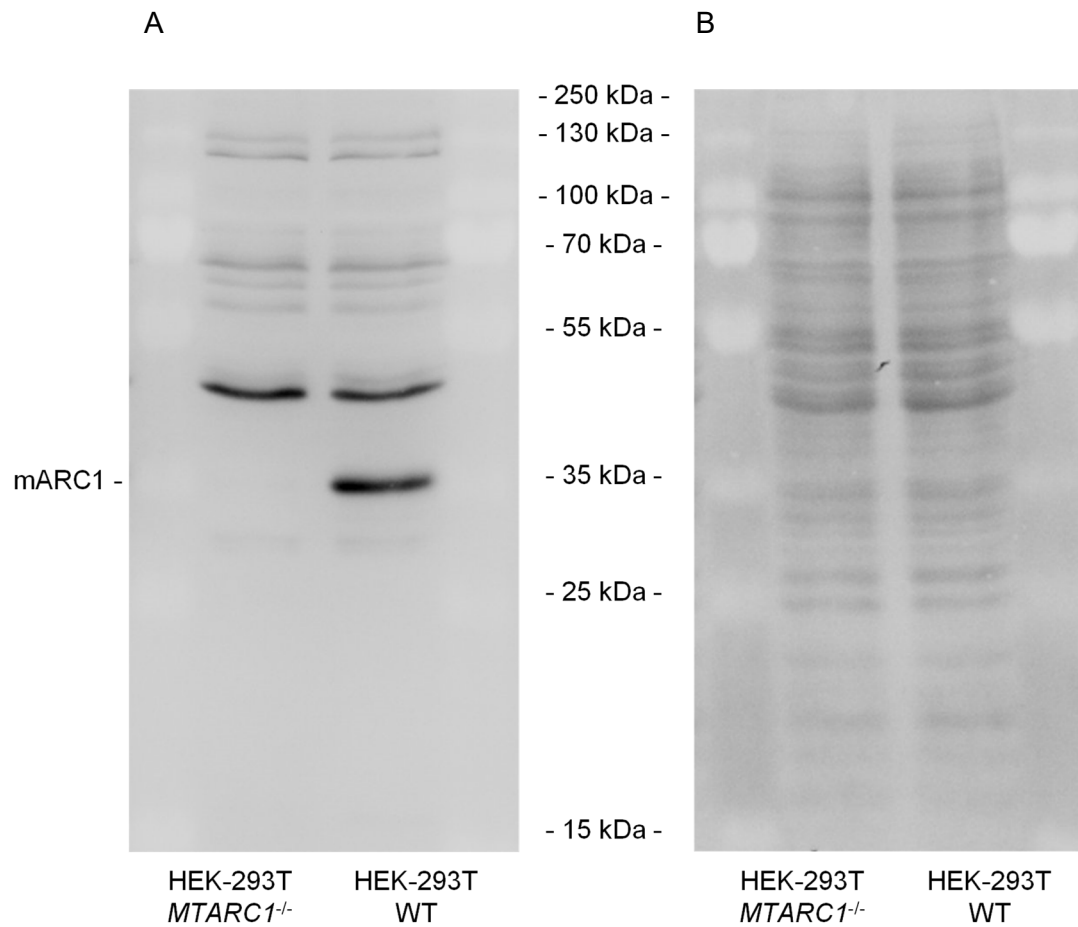
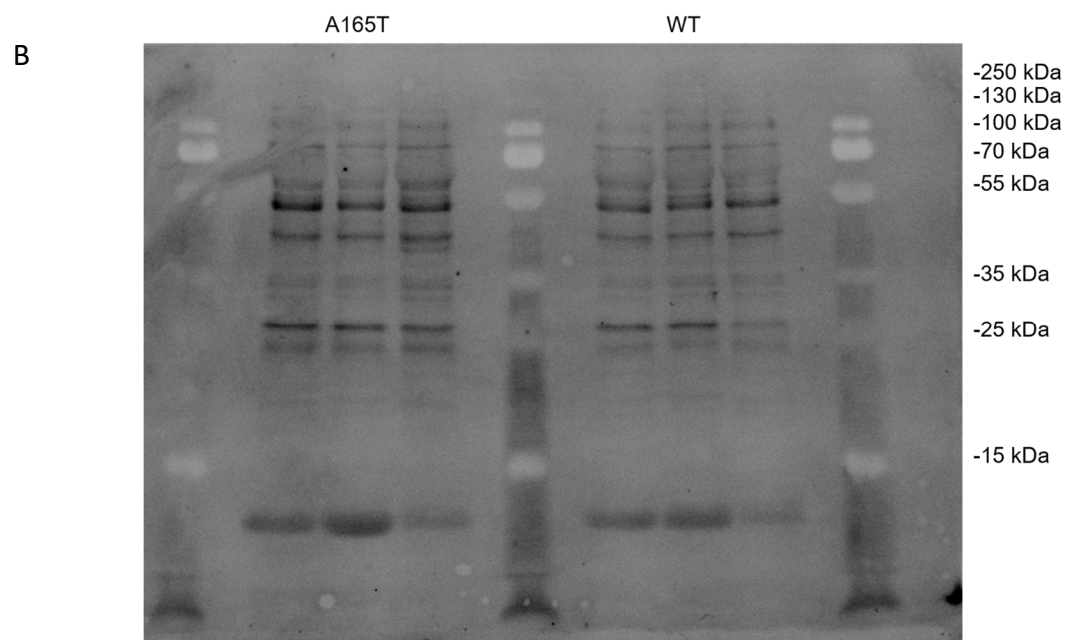
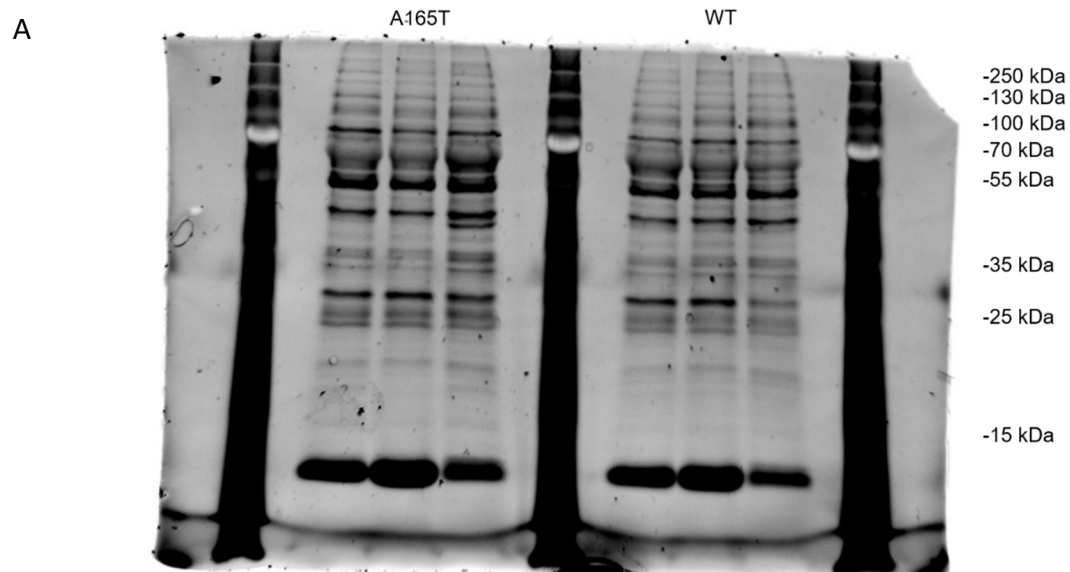


Abb. 7.4: Proteinexpression zur Verifizierung des KO. *MTARC1*^{-/-} und WT Zellen wurden wie unter 3.2.6 lysiert und (A) Western Blot Analysen unter Verwendung von anti-mARC1-Antikörpern wie unter 3.6 beschrieben durchgeführt. Aufgetragen wurden pro Tasche 36 µg Protein. (B) Zur Ladekontrolle wurden die gesamten Proteine mit TCE gefärbt und fluorimetrisch detektiert (vgl. 3.6).

7.1.5 Humanes Fettgewebe WT und A165T Variante



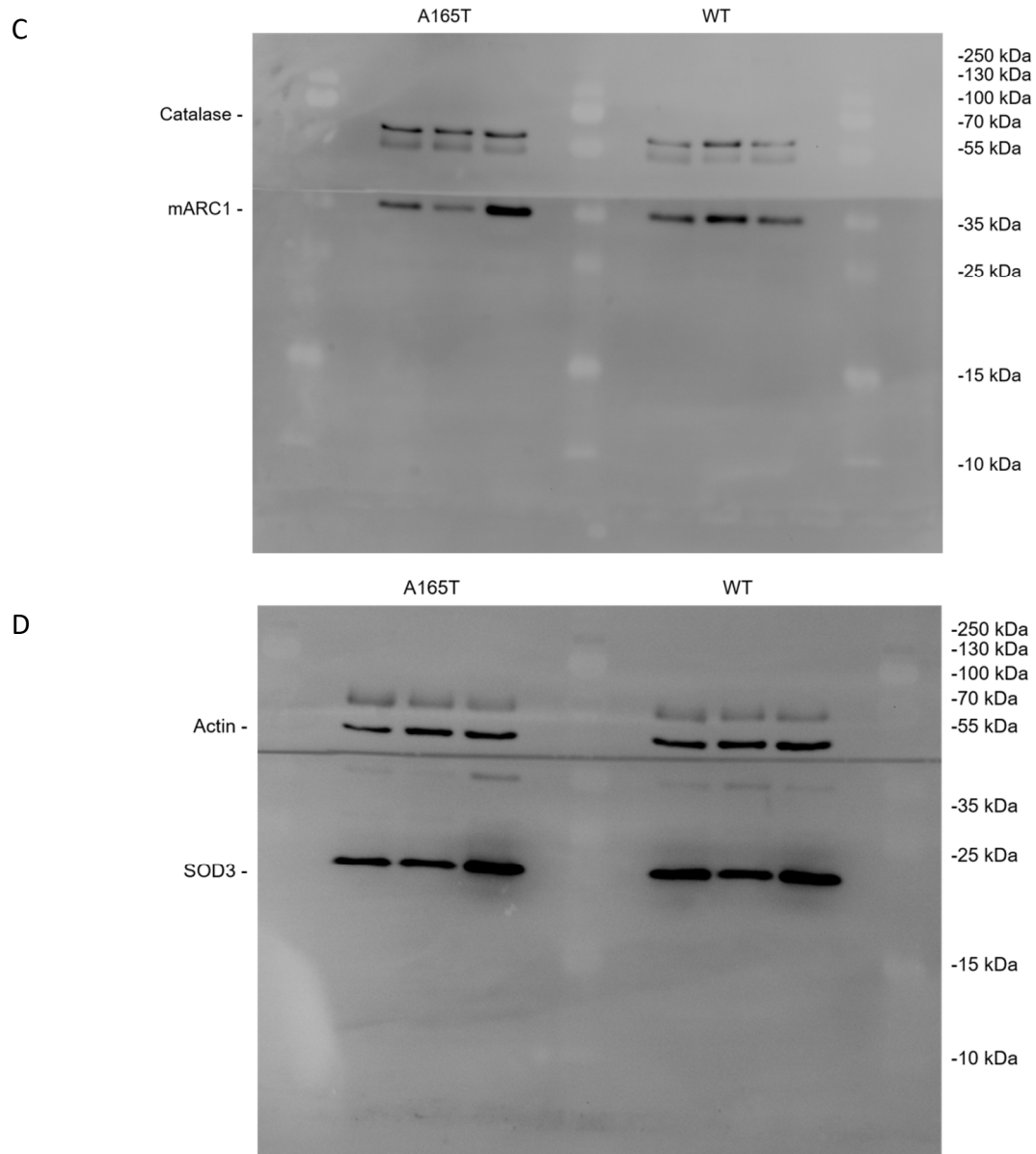


Abb. 7.5: Polyacrylamid-Gel und Western Blot des humanen Fettgewebes von mARC1 WT und der A165T Variante. (A) Aufnahme des Gels nach UV-Belichtung (B) fluoreszierende Proteine nach dem Western Blot auf der Membran; Die Membran wurde nach dem Blotting knapp über dem 35 Da-Marker geschnitten, um die obere und untere Membran getrennt mit Antikörpern zu inkubieren. (C) Der obere Teil wurde mit anti-Katalase-Antikörpern inkubiert, der untere mit anti-mARC1-Antikörpern (siehe abgeschnittene Spur in Abb. 4.23). (D) Anschließend wurde die Membran gestrippt und der obere Teil mit anti-Actin-Antikörpern (siehe abgeschnittene Spur in Abb. 4.23), der untere mit anti-SOD3-Antikörpern inkubiert.

7.2 N-reduktive Aktivität unterschiedlicher muriner Organe

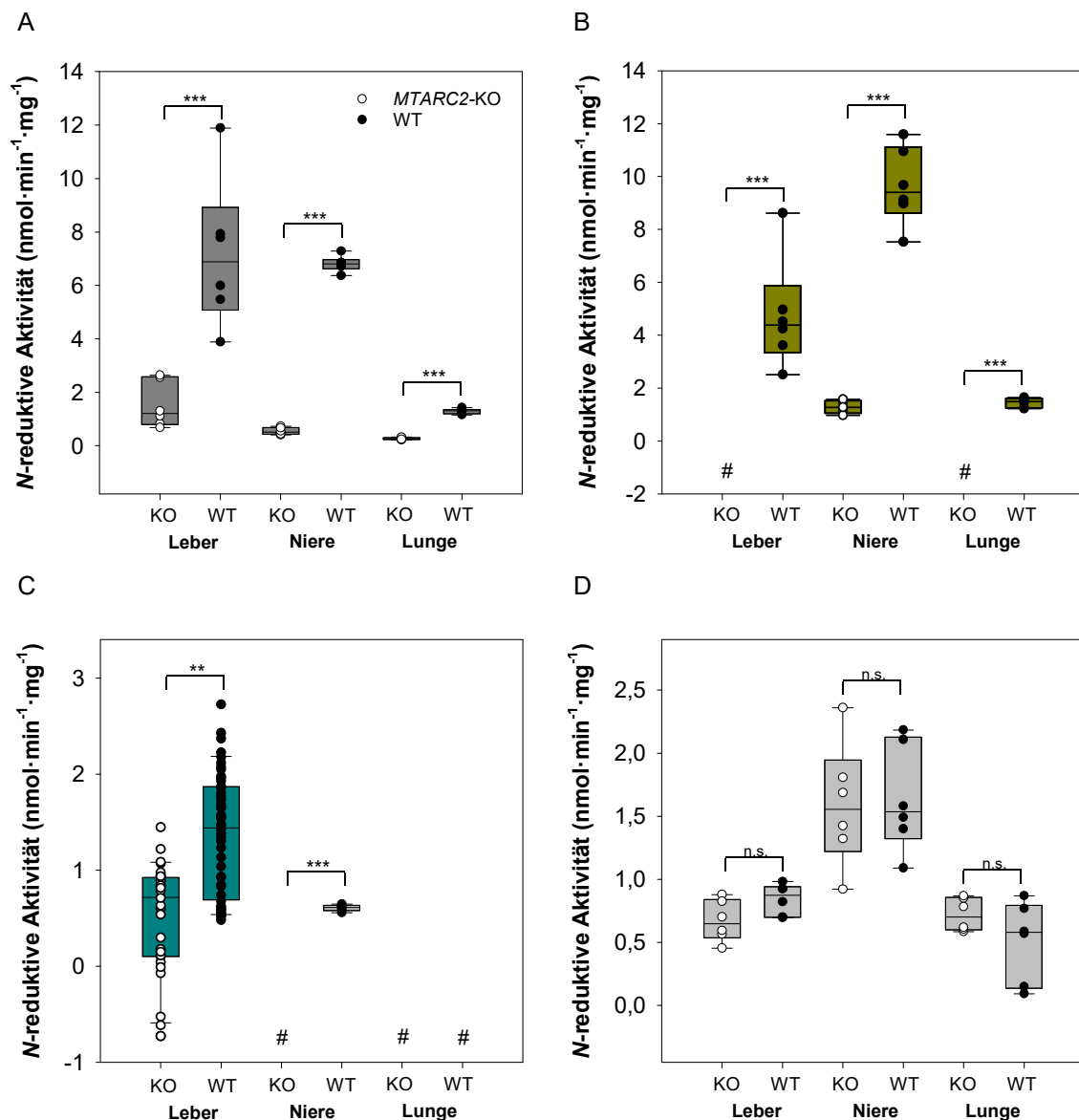


Abb. 7.6: Reduktaseaktivität von WT- und KO-Gewebehomogenaten (Leber, Nieren, Lunge)
 Organe von 6 einzelne WT (●) und *MTARC2*-KO (○) Mäusen wurden separat homogenisiert und über eine Zeitspanne von bis zu 90 min mit (A) BAO, (B) GOB, (C) NHC und (D) ANO inkubiert (vgl. 3.7.3). Die Bestimmungsgrenze betrug 0,1 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ für BAO und GOB und 0,02 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ für NHC und ANO. Die statistische Signifikanz wurde mittels *U*-Test und *t*-Test nachgewiesen. Für jedes Substrat wurden Negativkontrollen ohne NADH und ohne Protein durchgeführt und der Wert hiermit korrigiert. #, unterhalb der LOQ. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant.

7.3 Sequenzierungsergebnisse

Clone_3	-----CTCAGGGTCTGGCTTCTGCCATAATGGGTTACACATATCCAGGTGTTT	50
Clone_1	-----GGTCATGGCTTCCATGCCATAATGGGTTACACATATCCAGGTGTTT	47
Clone_2	-----CTGCTCTGGCTTCTGCCATAA-TGGTTCACACAT-ATCCTGTGTTT	44
MTARC1	TTGAAGCTCCTCCAGGGTCTGGCTTCTGCCATAA-TGGTTCACACAT-ATCCTGTGTTT	58
	***** * *****	
Clone_3	TGAAAACGGCAGGTTTTGGCTTGTGATCC---AGGAGGGAACATGGTTACTGCTCGCC	106
Clone_1	TGAAAACGGCAGGTTTTGGCTTGTGATCAAAACAGGAGGGAACATGGTTACTGCTCGCC	107
Clone_2	TGAAAACGGCAGGTTTTGGCTTGTGAT-CAC-CAGGAGGGAACATGGTTACTGCTCGCC	102
MTARC1	TGAAAACGGCAGGTTTTGGCTTGTGAT-CAACCAGGAGGGAACATGGTTACTGCTCGCC	117

Clone_3	AGGAACCTCGCCTGGTCCTGATTTCCCTGACCTGCGATGGTGACACCCTGACTCTCAGTG	166
Clone_1	AGGAACCTCGCCTGGTCCTGATTTCCCTGACCTGCGATGGTGACACCCTGACTCTCAGTG	167
Clone_2	AGGAACCTCGCCTGGTCCTGATTTCCCTGACCTGCGATGGTGACACCCTGACTCTCAGTG	162
MTARC1	AGGAACCTCGCCTGGTCCTGATTTCCCTGACCTGCGATGGTGACACCCTGACTCTCAGTG	177

Clone_3	CAGCCTACACAAAGGACCTACTACTGCCTATCAAAACGCCACCACAAATGCAGTGCACA	226
Clone_1	CAGCCTACACAAAGGACCTACTACTGCCTATCAAAACGCCACCACAAATGCAGTGCACA	227
Clone_2	CAGCCTACACAAAGGACCTACTACTGCCTATCAAAACGCCACCACAAATGCAGTGCACA	222
MTARC1	CAGCCTACACAAAGGACCTACTACTGCCTATCAAAACGCCACCACAAATGCAGTGCACA	237

Clone_3	AGTGCAGGTAAGGAAAGGGCAGGTCGTAGCCCTTGTGTGAATGAATAGCCA-----	277
Clone_1	AGTGCAGGTAAGGAAAGGGCAGGTCGTAGCCCTTGTGTGAATGAATAGCCAA-----	279
Clone_2	AGTGCAGGTAAGGAAAGGGCAGGTCGTAGCCCTTGTGTGAATGAATATCATGCAATTAAA	282
MTARC1	AGTGCAGGTAAGGAAAGGGCAGGTCGTAGCCCTTGTGTGA-----	277

Clone_3	-----	277
Clone_1	-----	279
Clone_2	ACTAGCGGACCCTTGTGCCCTGGAAGACCTGCCAGATCTGGAACCAACATGTCAGGAGC	342
MTARC1	-----	277
Clone_3	-----	277
Clone_1	-----	279
Clone_2	AGGTGTGTAGTGCTGAACAAATGCCAGTGTTACAAGCAAACCTTCTAAA	390
MTARC1	-----	277

Abb. 7.7: Gen-Sequenz von humanem *MTARC1* und der untersuchten 3 Varianten.

Variante 1

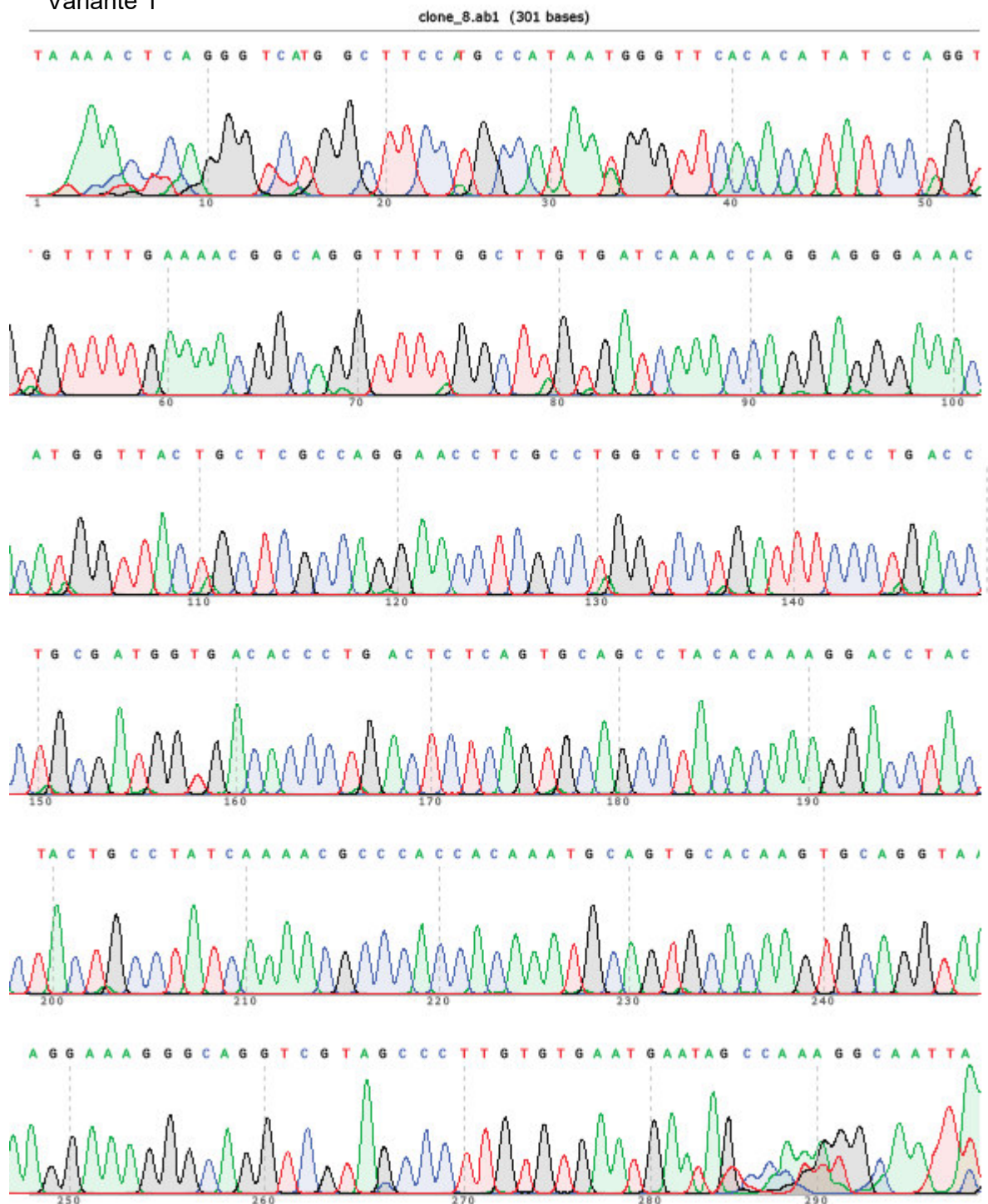


Abb. 7.8: Ergebnis der Sanger-Sequenzierung der Variante 1.

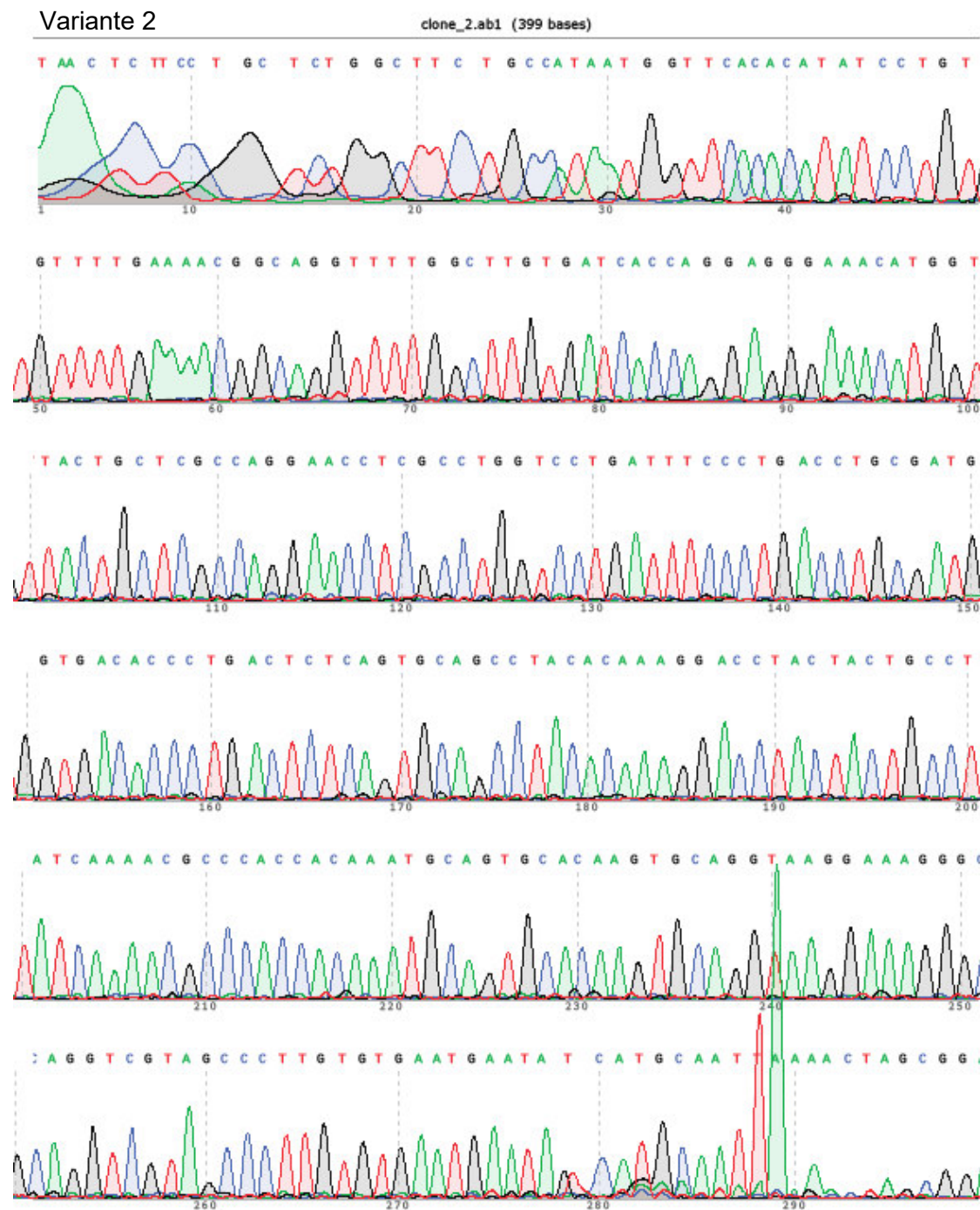


Abb. 7.9: Ergebnis der Sanger-Sequenzierung der Variante 2.

Variante 3

clone_1.ab1 (294 bases)

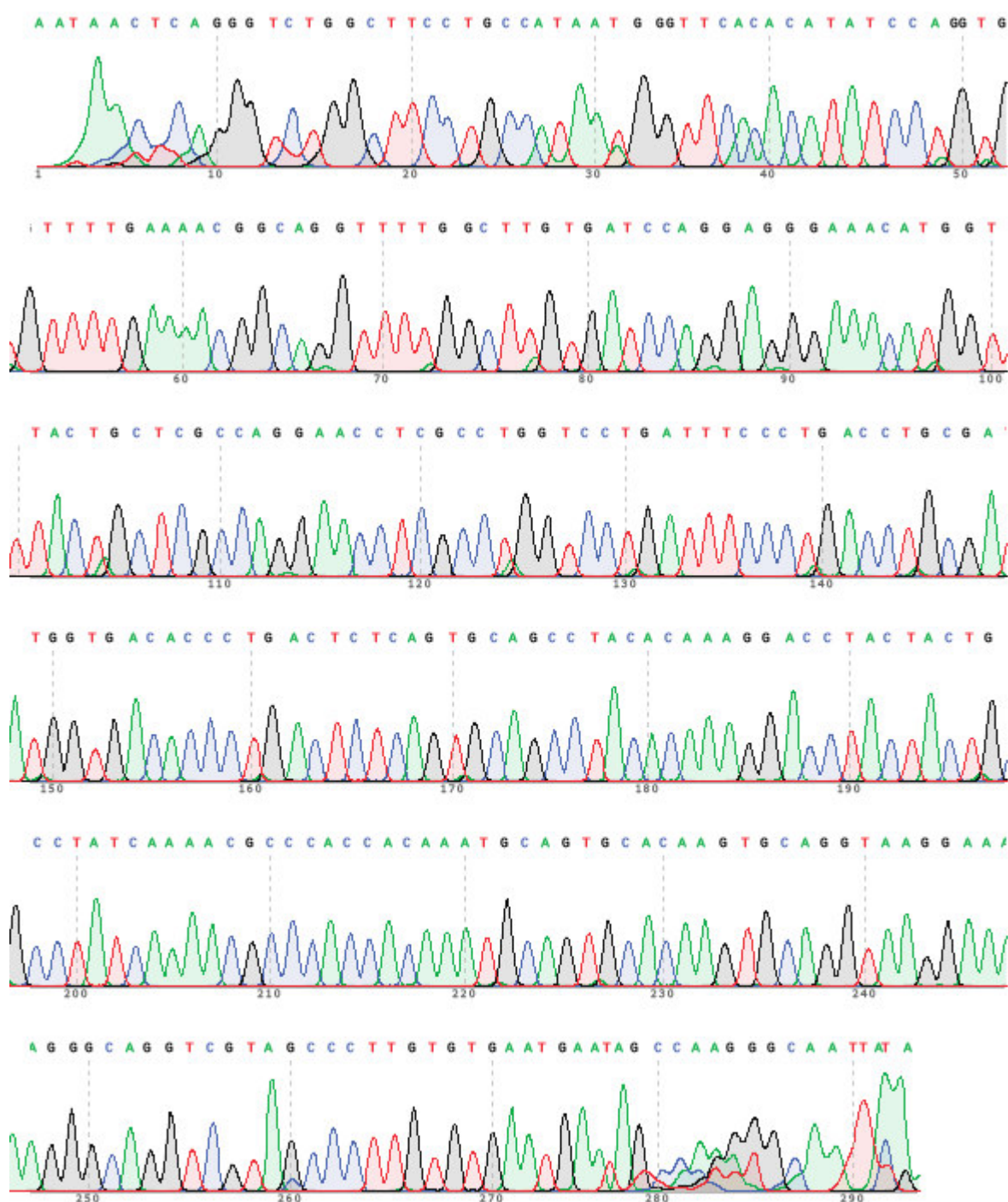


Abb. 7.10: Ergebnis der Sanger-Sequenzierung der Variante 3.

7.4 Einfluss von DMSO als Lösungsvermittler auf die Zellviabilität

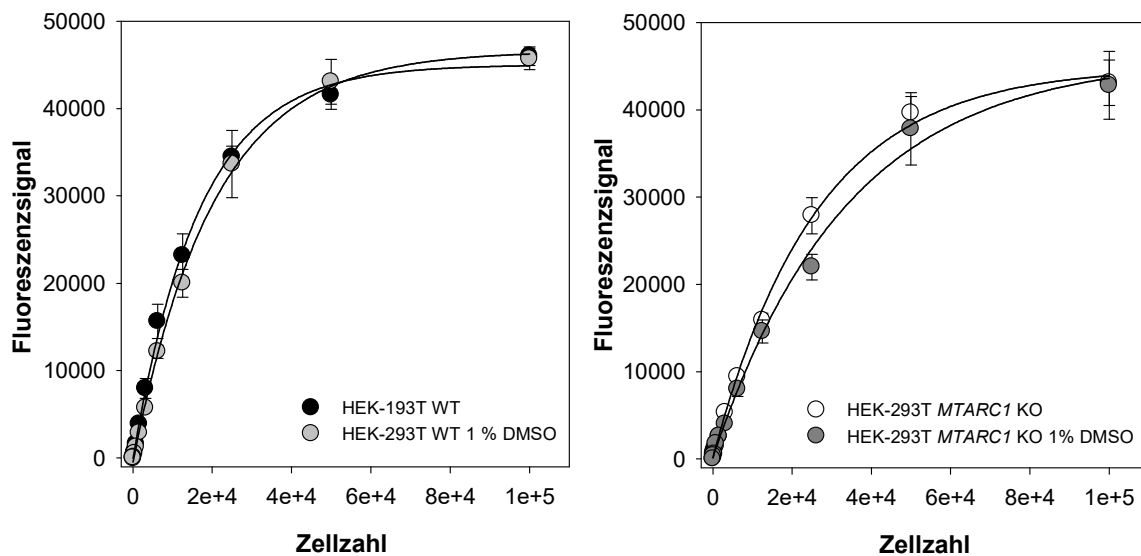


Abb. 7.11: Zellviabilitäts-Bestimmung der HEK-293T A MTARC1-KO und B WT Zellen mit und ohne Behandlung von 1 % DMSO. Die Zellen wurden wie in 3.2.7.1 beschrieben ausgesät und für 180 min mit DMSO behandelt, Zellviabilität wurde mittels Resazurin-Assay (vgl. 3.2.7.2) gemessen. Angegeben ist die Zellzahl pro Kavität gegen den die Fluoreszenzintensität als Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Kavitäten.

7.5 Ermittlung der optimalen Konzentration mittels Zellviabilitäts-Assay

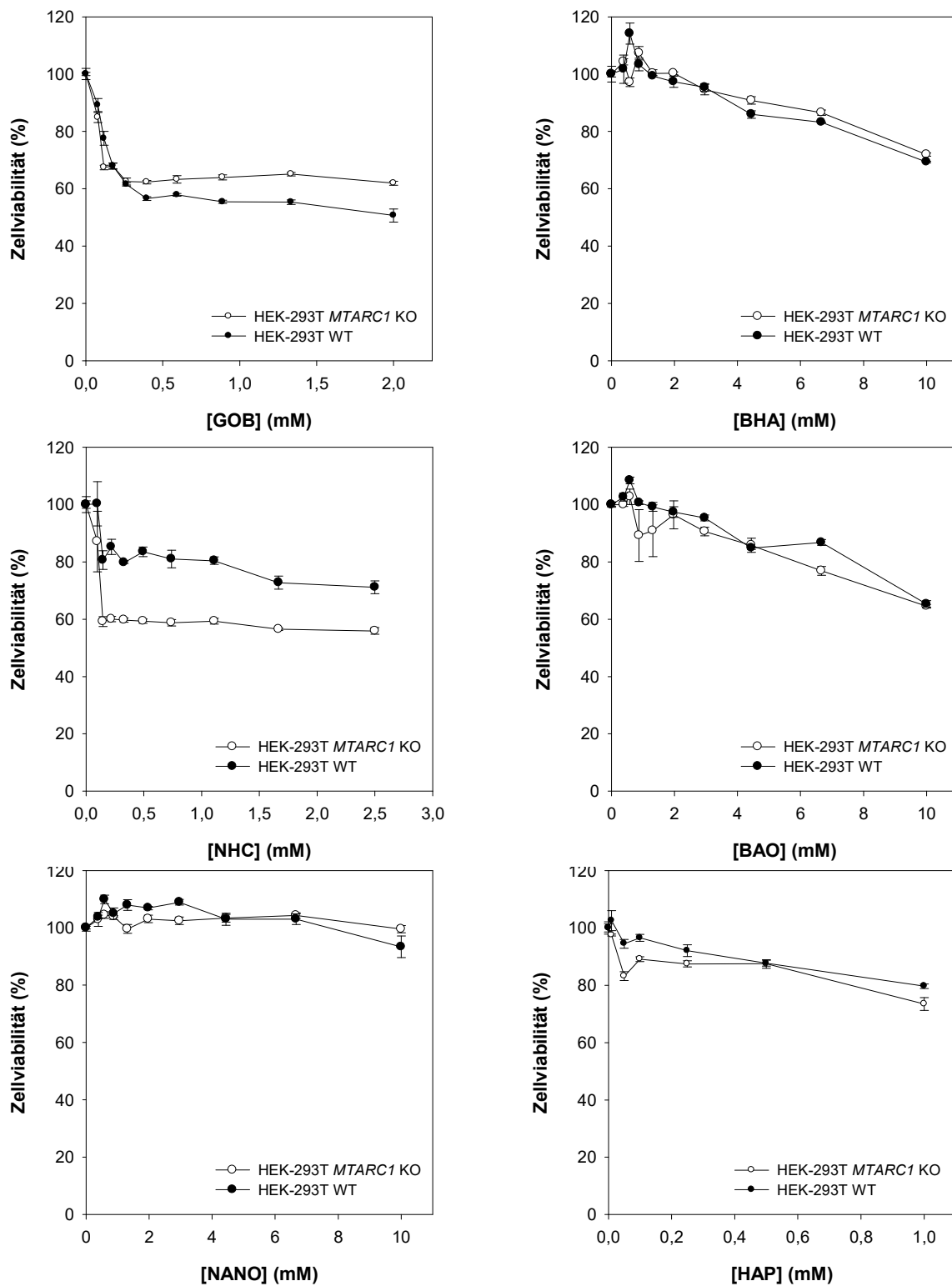


Abb. 7.12: Zellviabilität von HEK-293T *MTARC1*-KO und WT Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der Inkubationssubstrate (A) GOB; (B) BHA; (C) NHC; (D) BAO; (E) NANO; (F) HAP. Es wurden 6.000 Zellen/Well ausgesät und für 24 h inkubiert, anschließend wurde eine serielle 1:2-Verdünnung hergestellt und die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate inkubiert. Nach 180 min wurde die Zellviabilität wie unter 3.2.7.2 beschrieben mittels Resazurin-Assay bestimmt.

7.6 Genexpressionsdaten

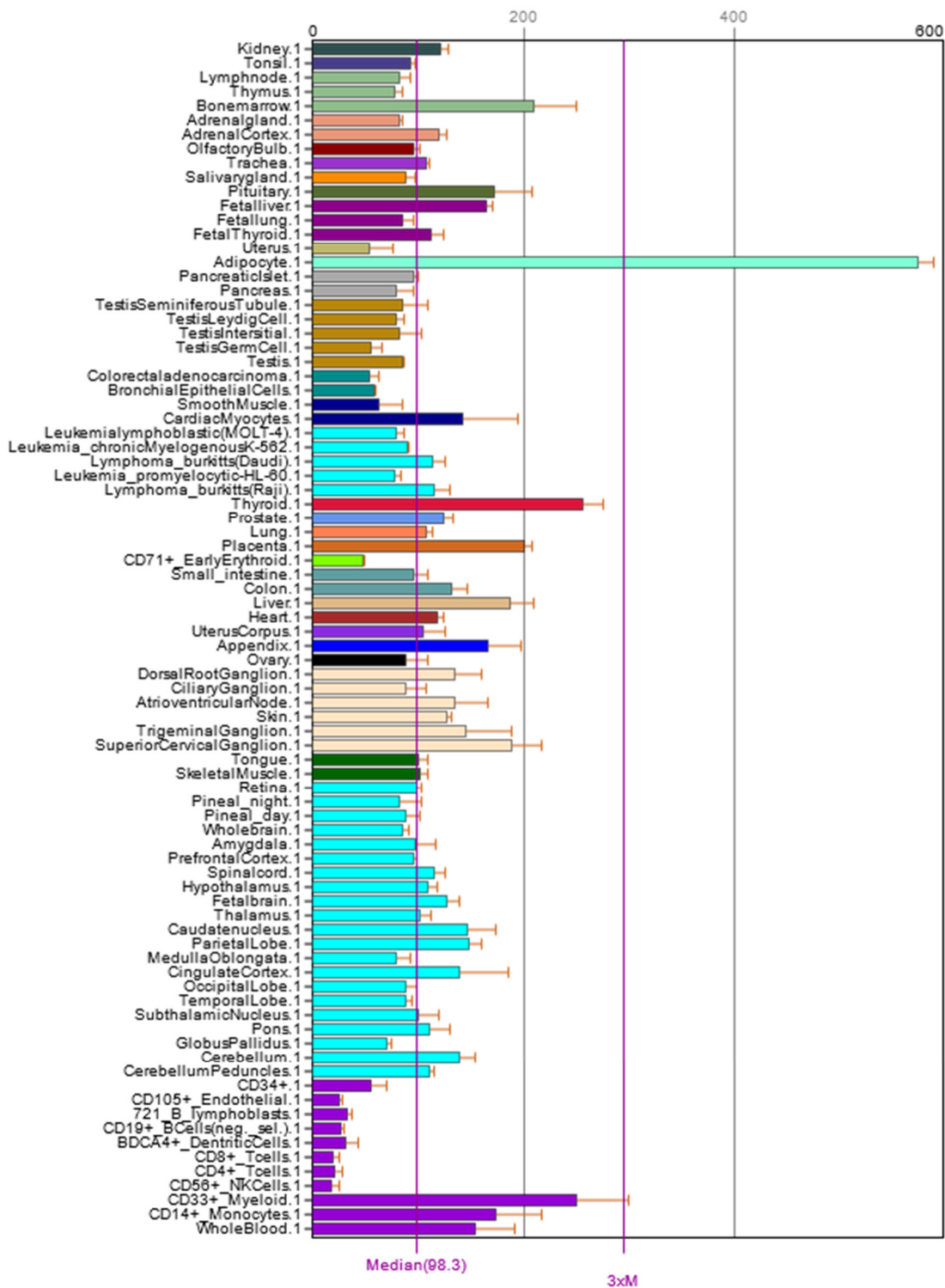


Abb. 7.13: MTARC1-Expression humaner Gewebe (Wu et al., 2016).

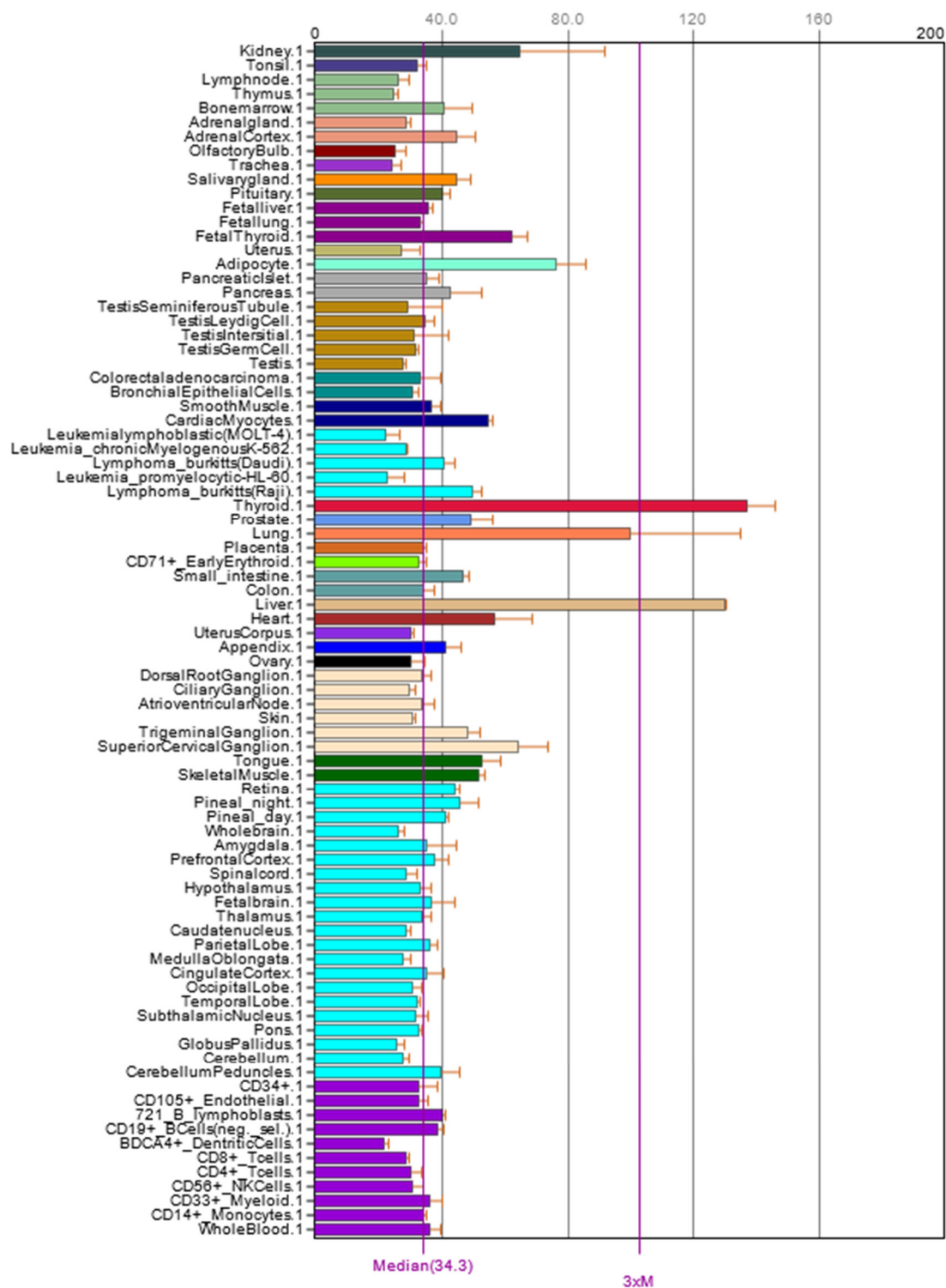


Abb. 7.14: MTARC2-Expression humaner Gewebe (Wu et al., 2016).

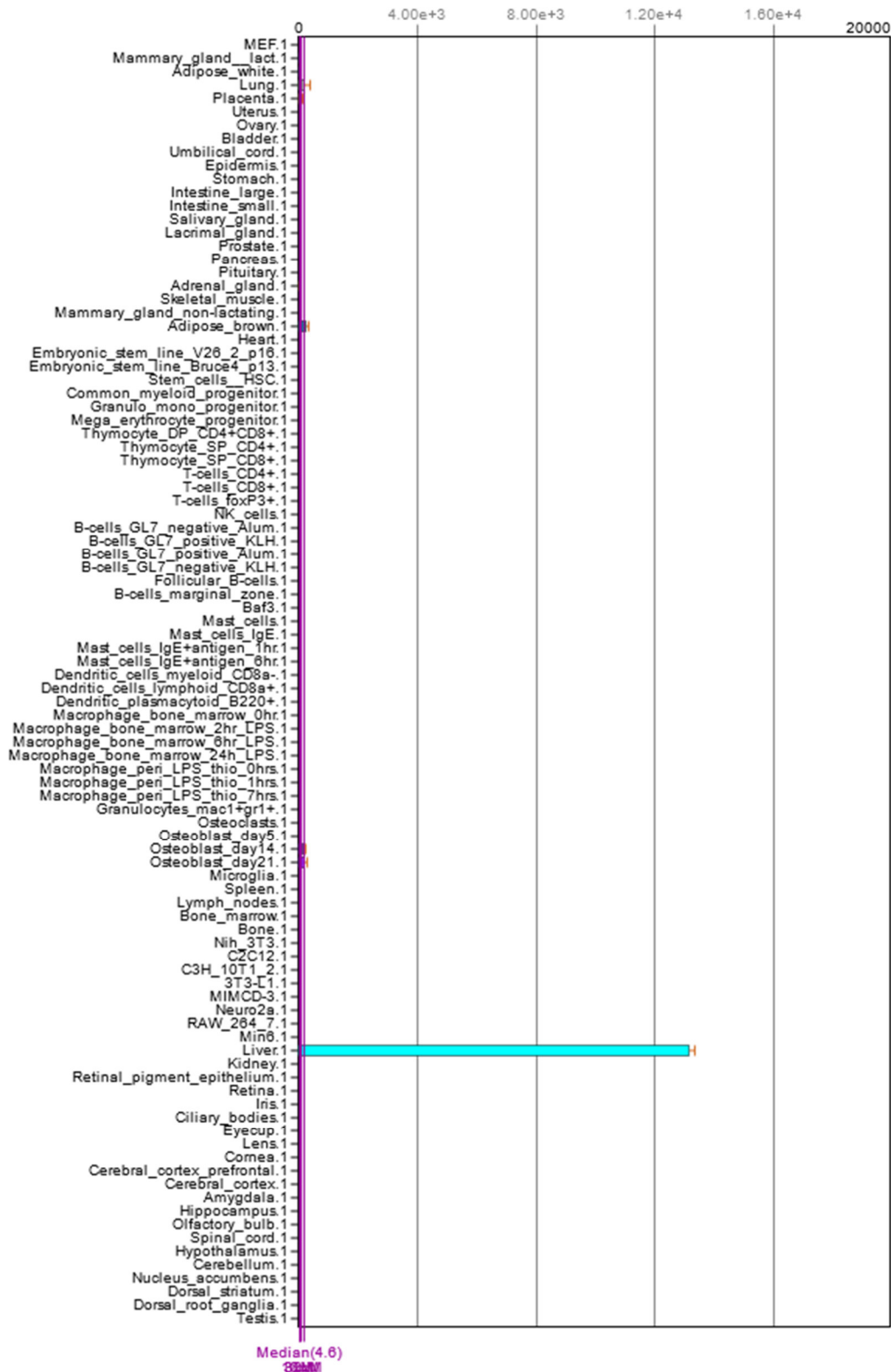


Abb. 7.15: MTARC1-Expression muriner Gewebe (Wu et al., 2016).

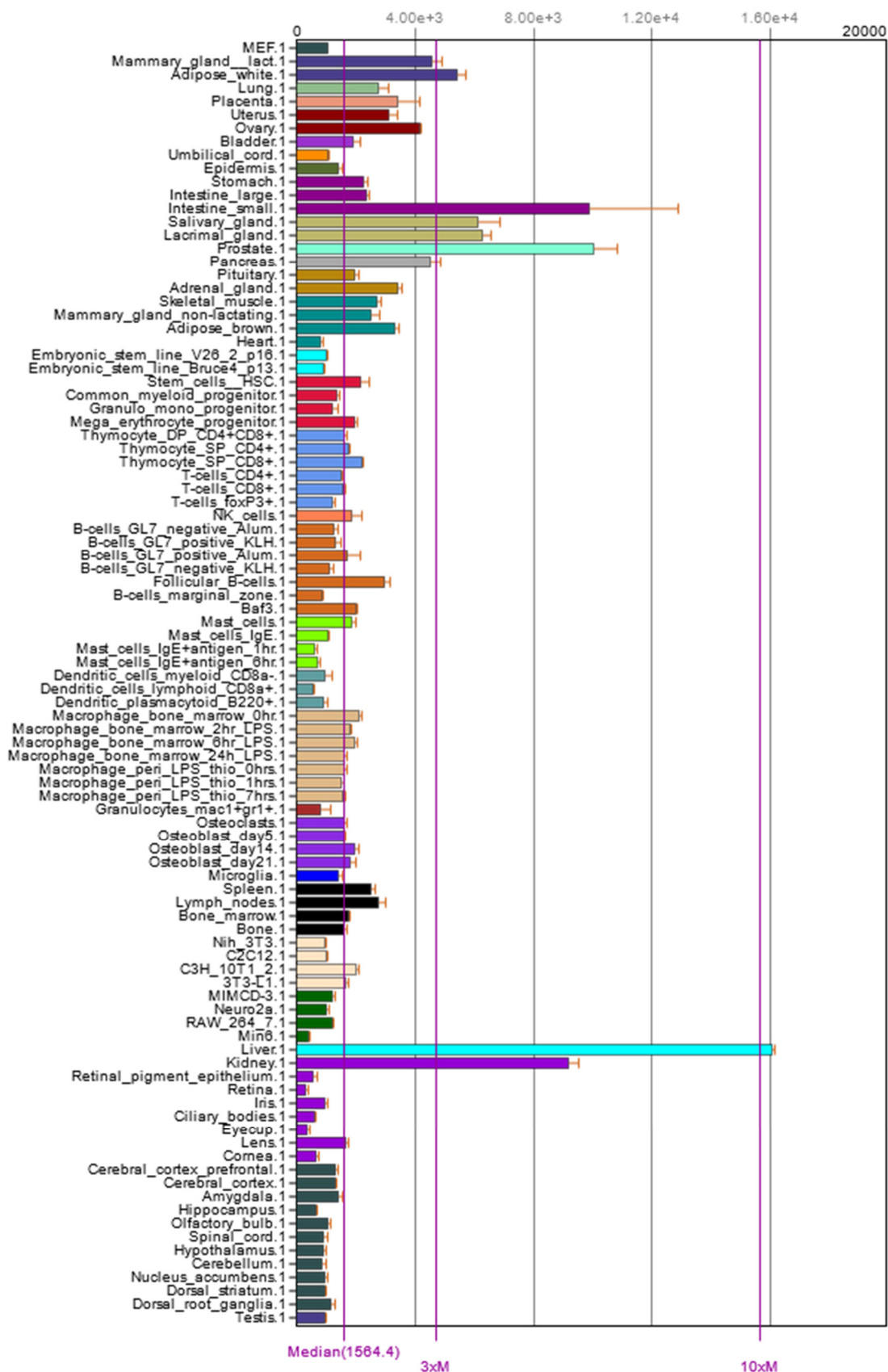


Abb. 7.16: MTARC2-Expression muriner Gewebe (Wu et al., 2016).

7.7 Charakterisierung anatomischer Merkmale der *MTARC2*-KO Mäuse

Merkmal	Weibchen			Männchen		
	WT	<i>MTARC2</i> -KO	<i>p</i> -Wert	WT	<i>MTARC2</i> -KO	<i>p</i> -Wert
Körperlänge (cm)	19	18.5	0.197205	18.75	19.5	0.023147
Schwanzlänge (cm)	8.5	8.5	0.339626	8.5	9	0.006788
Dünndarmlänge (cm)	44	39	0.000161	41.75	40	0.035148
Dickdarmlänge (cm)	8	8.5	0.287601	8	8.5	0.004891
Leber (g)	1.168	0.879	0.001199	1.275	1.437	0.355791
Niere (g)	0.288	0.252	0.011655	0.337	0.339	0.711787
Milz (g)	0.108	0.081	0.000184	0.071	0.093	0.003113
Herz (g)	0.136	0.111	0.001124	0.138	0.155	0.339268
Lunge (g)	0.166	0.143	0.014653	0.169	0.155	0.048462
Gehirn (g)	0.443	0.442	1	0.409	0.398	0.287314
Pankreas (g)	0.134	0.098	0.052306	0.125	0.121	0.324517

Tab. 7.1: anatomische Merkmale der *MTARC2*-KO Maus in Vergleich zum WT ($n \geq 11$). Daten wurden erhoben im Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center/ Institut für Onkologie in Warschau, Polen. Signifikante Differenzen ($p \leq 0,05$) sind fett dargestellt.

Erklärung zu §8 der Promotionsordnung

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

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

Mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

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

Publikation:

Rixen, S., Havemeyer, A., Tyl-Bielicka, A., Pysniak, K., Gajewska, M., Kulecka, M., Ostrowski, J., Mikula, M., Clement, B. (2019) Mitochondrial amidoxime-reducing component 2 (mARC2) has a significant role in N-reductive activity and energy metabolism. *J Biol Chem.* 294, 17593-17602.

Tagungsbeiträge:

Rixen, S., Havemeyer, A., Tyl-Bielicka, A.; Pysniak, K., Mikula, M., Clement, B. (2018) The mARC2 knockout mouse: A powerful tool to study N-reductive metabolism *Posterpräsentation*, DPhG Jahrestagung, Hamburg.

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

Rixen, S., Havemeyer, A., Ginsel, C., Tyl-Bielicka, A., Pysniak, K., Gajewska, M., Kulecka, M., Ostrowski, J., Mikula, M., Clement, B. (2019) Knockout studies with mARC: Influences on N-reductive activity and energy metabolism *Posterpräsentation + Kurzvortrag*, MoTEC 2019 - XI Molybdenum & Tungsten enzyme conference, Potsdam.

Kiel, November 2021



Sophia Rixen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Anleitung von Herrn **Prof. Dr. Bernd Clement** angefertigt.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Clement herzlichst, der mich schon als Masterstudentin in seinem Arbeitskreis willkommen geheißen hat. Ich danke für die freundliche Aufnahme, das entgegengebrachte Vertrauen, die Freiheit bei der Forschung und die stets erwiesene Unterstützung und Förderung.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Axel Scheidig dafür, dass ich die molekularbiologischen Arbeiten in seinem Arbeitskreis durchführen durfte. Ich habe mich immer willkommen gefühlt und bin sehr dankbar für diese Erfahrung. Danke für die immerwährende Diskussionsbereitschaft, die vielen hilfreichen Anregungen und für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt Antje für die unermüdliche Unterstützung während meiner gesamten Promotions- und der Masteranden-Zeit. Danke für dein Engagement, dafür, dass deine Tür mir immer offen steht, dass du für jedes Problem eine Lösung hast und dass du so herrlich unkompliziert bist.

Bei Herrn Assoc. Prof Dr. Michal Mikula und seinem Arbeitskreis möchte ich mich herzlich für die tolle Zusammenarbeit bedanken. Danke für die Kooperation bei den Tierversuchen, für die Bereitstellung der murinen Proben, danke für den regen Informationsaustausch, die zahlreichen Gespräche und Hilfestellungen.

Frau Prof. Dr. Hannele Yki-Järvinen danke ich für die wissenschaftlich anregende Zusammenarbeit und die Zurverfügungstellung des humanem Fettgewebes.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze für den regen Informationsaustausch in den Forschungsgruppensitzungen, für die nette und harmonische Zusammenarbeit im Biochemie-Praktikum und dafür, dass er immer ein Lachen in die Gesichter zaubert.

Bei der Studentenbetreuung des Biochemie-Praktikums hätte ich mir kein kompetenteres, humorvolleres und verständnisvolleres Team wünschen können und danke dafür Herrn Prof. Dr. Dennis Schade sowie Carsten, Inken, Madiha, Till, Daniel, Carmen und Thommy. Ich danke euch für die vielen Stunden, die wir gearbeitet, diskutiert und gelacht haben.

Was wäre ein Doktorand ohne seinen Arbeitskreis. Vor allem Antje, Jenny, Carsten, Inken und Patrick danke ich, dass sie mir den Anfang am Institut so leicht gemacht haben. Auch an die dazu gestoßenen Kolleg:innen Cathrin, Michel und Jonas richte ich ein großes Dankeschön für die hilfreichen Gespräche, Ratschläge und ihre Diskussionsbereitschaft.

Ein lieber Dank geht an Christian Kubitza, der mich bei den molekularbiologischen Arbeiten betreut hat und mir eine unglaublich große Hilfe war. Auch Alex möchte ich danken, dass er mir die murinen rekombinanten Proteine so zuverlässig und zügig zur Verfügung gestellt hat.

Meine lieben Laborpartner:innen der Zellkultur Linda, Till, Daniel, Carmen und Theo: Danke für die vielen wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen. Besonders die Arbeit

mit Linda *Bench* an *Bench* hat jeden noch so langen Tag im Labor kurzweiliger und erträglicher gemacht.

Ich danke meinem Büropartner Sven, der mir ein sehr guter Freund geworden ist. Danke für jedes aufbauende Wort und dass ich all‘ meine Freude und Sorgen mit dir teilen darf. Ich kann mir niemanden besseren an den Schreibtisch neben mir wünschen.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Kollege:innen und Mitarbeiter:innen bedanken, die dazu beigetragen haben aus den knapp vier Jahren dieser Promotion eine sehr schöne, unvergessliche Zeit zu machen. Danke an Sven, Stefan, Karsten, Britta, Linda, Till, Inken, Cathrin, Madiha und Patrick. Ihr seid das i-Tüpfelchen meiner Promotionszeit. Danke für aufheiternde Kaffee- (oder Bier-) Runden, anregende Gespräche und aufbauenden Worte.

Herzlich bedanken möchte ich mich für die Unterstützung durch die technischen Mitarbeiter:innen des Instituts. Ein besonderer Dank gebührt Petra für die Unterstützung im Labor. Sven danke ich für seine Hilfe und Unterstützung bei HPLC-Fragen und –Problemen.

Dirk, Kalle, Detlef und Volkmar danke ich für die Unterstützung bei technischen Problemen jeder Art. Für die Hilfe bei allen bürokratischen Problemen danke ich ganz herzlich Susanne und Britta. Ihr habt immer eine Lösung, für jedes Problem. Danke!

Ihr lieben Korrekturleser:innen, auch Euch möchte ich ganz herzlich danken. Danke an Antje, Cathrin, Inken und Mats für das sorgfältige, zügige und unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit und die überaus konstruktiven und hilfreichen Hinweise.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Mann Mats. Ich danke euch, dass ihr auf jedes Problem, jede Schwierigkeit und jede Sorge mit Unterstützung, Verständnis und bedingungsloser Liebe antwortet. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und immer an meiner Seite seid. Ihr seid mein sicherer Hafen und mein größter Rückhalt.

Ich danke euch allen von Herzen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sophia Rixen
Geburtsdaten	15.03.1993 in Itzehoe
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

08/1999 bis 07/2003	Grundschule Brokstedt
08/2003 bis 06/2012	Integrierte Gesamtschule Faldera, Neumünster
06/2012	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2012 bis 09/2016	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
01/2017 bis 06/2017	<i>Master of Science</i> : Arzneimittelforschung an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
07/2017 bis 12/2017	Pharmaziepraktikum in der Gorch-Fock-Apotheke Kiel
02/2018	Erteilung der Approbation als Apothekerin

Promotion und Weiterbildung

seit 01/2018	wissenschaftliche Mitarbeiterin am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Prof. Dr. B. Clement
seit 03/2018	Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik und Technologie

Zusammenfassung

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente mARC wurde 2006 als ein bis dahin unbekanntes molybdänhaltiges Protein identifiziert. Alle annotierten Säugetiergenome enthalten zwei mARC-Gene: *MTARC1* und *MTARC2*, die für die beiden Proteine mARC1 und mARC2 kodieren. In Gegenwart von NADH üben sie, zusammen mit den beiden mitochondrialen Elektronentransportproteinen Cytochrom b5 B und der Cytochrom b5-Reduktase Isoform 3, reduktive Aktivität gegenüber einer Vielzahl oxygenierten Substraten aus. Der reduktive Metabolismus wurde bereits ausgiebig untersucht und auch die physiologische Funktion von mARC ist bereits lange Gegenstand der Forschung, dennoch ist sie weitestgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche biologische Testsysteme etabliert, um zum einen die paralogen sowie orthologen humanen und murinen Proteine zu charakterisieren und zum anderen die physiologische Funktion von mARC weiter zu ergründen. *In vitro* Studien zur Substratspezifität zeigten, dass eine eindeutige Zuordnung der orthologen Formen ,1‘ und ,2‘ zwischen murinen und humanen Proteinen nicht gemacht werden kann. Eine Schlüsselrolle von mARC am reduktiven Metabolismus konnte durch Studien mit mARC1- sowie mARC2-defizienten Mäusen gezeigt werden. Mittels CRISPR/Cas9 wurde erstmals ein stabiler *Knockout* eines *MTARC*-Gens in humanen Zellen erzeugt. *In cellulo* Studien zeigten eine signifikant verminderte *N*-reduktive Aktivität der mARC1-defizienten Zellen. Ebenfalls konnte eine Beteiligung von mARC1 sowohl am antioxidativen Stoffwechsel als auch detoxifizierenden Stoffwechsel, durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid und 6-*N*-Hydroxyaminopurin, detektiert werden. Hingegen zeigten die genetisch-manipulierten Zellen eine höhere Resistenz gegen eine Palmitat-induzierte Lipotoxizität. Zu sehen war, dass mARC1-exprimierende Zellen mehr intrazelluläre Lipidakkumulationen aufwiesen, während mARC1-defiziente Zellen einen signifikant höheren Anteil amphiphiler Lipiden zeigten. Murine *in vivo* Studien ergaben eine *MTARC2*-KO-vermittelte Resistenz gegenüber hochkalorisch-induzierter Fettleibigkeit und mikrovesikulärer Steatose. Blutanalysen bestätigten einen KO-bedingten hepatoprotektiven Effekt durch verminderte Leberenzymwerte und zeigten zudem verminderte Gesamtcholesterin-, Glucose- und Triglycerid-Werte.

Zusammenfassend konnte eine eindeutige Beeinflussung des Lipidstoffwechsels durch mARC bestätigt und mARC als ein vielversprechendes *Target* zur Behandlung von Fettlebererkrankungen identifiziert werden. Zudem konnte ein KO Mausmodell als ein leistungsfähiges Instrument zur Vorhersage des mARC-vermittelten Arzneimittelstoffwechsels identifiziert werden.

Abstract

The mitochondrial amidoxime-reducing component mARC was identified in 2006 as a hitherto unknown molybdenum-containing protein located in the outer mitochondrial membrane. All annotated mammalian genomes contain two *MTARC* genes: *MTARC1* and *MTARC2*, which encode the two proteins mARC1 and mARC2. These enzymes exert *N*-reductive activity towards a variety of *N*-oxygenated substrates together with the two mitochondrial electron carrier proteins cytochrome b_5 B and cytochrome b_5 reductase isoform 3. Although the physiological function of mARC has been subject of research since its discovery and its reductive metabolism has been studied extensively, it remains largely unknown.

In this thesis, different biological assays were established in order to characterize the paralogous and orthologous human and murine proteins in one hand, and to further establish the physiological function of mARC on the other.

In vitro studies directly compared human and murine recombinant enzymes and showed that a cross-species comparison of the orthologous forms '1' and '2' based on reductase activity is not feasible. Studies in mARC1- and mARC2-deficient mice show a key role of mARC in reductive metabolism. Using CRISPR/Cas9, the (to date) first stable knockout of a *MTARC* gene was generated in human cells. *In cellulo* studies showed a significantly reduced *N*-reductive activity of mARC1-deficient cells. In addition, mARC1 was found to be involved in both antioxidant and detoxifying metabolism through the reduction of hydrogen peroxide and 6-*N*-hydroxyaminopurine. In contrast, the CRISPR-engineered cells showed higher resistance to palmitate-induced lipotoxicity. Histological examination showed more intracellular lipid accumulation in mARC1-expressing wild-type cells, while mARC1-deficient cells harbor a higher content of amphiphilic lipids, which are generally located in the cellular membrane.

Murine *in vivo* studies revealed *MTARC2*-KO-mediated resistance to high-fat-induced obesity and micro-vesicular steatosis. Blood analyses confirmed a hepatoprotective effect through reduced liver enzyme levels and showed reduced total cholesterol, glucose and triglyceride levels.

In conclusion, this work confirms a clear link between mARC and lipid metabolism, and identifies mARC as a new promising target for the treatment of fatty liver disease. In addition, the *MTARC2*-KO mouse model is validated as a powerful tool for predicting mARC-mediated drug metabolism.