

NEUE ANALYTISCHE VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MARC-SUBSTRATEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Cathrin Klopp

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Kiel, 2024

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Matthias Leippe

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Axel J. Scheidig

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Bernd Clement

Datum der Disputation: 11.09.2024

„Ich weiß, dass ich nichts weiß.“

Sokrates

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Strukturformelverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	1
1 Einleitung	2
1.1 Enzymaktivität.....	2
1.2 Biotransformation.....	6
1.3 Molybdänhaltige Enzyme	9
1.3.1 Übersicht	9
1.3.2 Xanthindehydrogenase.....	10
1.3.3 Aldehydoxidase	11
1.3.4 Sulfinoxidase	12
1.3.5 mARC.....	13
1.3.5.1 Übersicht	13
1.3.5.2 Lokalisation.....	16
1.3.5.3 Einfluss auf den Energiestoffwechsel.....	17
1.3.6 Nitratreduktase	21
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2 Fluoreszenzbasierter Assay.....	24
2.1 Einleitung	24
2.2 Publikation	26
3 H₂O₂.....	43
3.1 Einleitung	43
3.2 Publikation	44
4 Hydroxyurea	56
4.1 Einleitung	56
4.2 Publikation	57
5 TMAO Isotopeneffekte	74
5.1 Einleitung	74
5.1.1 mARC-katalysierte Umsetzung.....	79
5.1.1.1 Material.....	79
5.1.1.2 Methoden.....	81

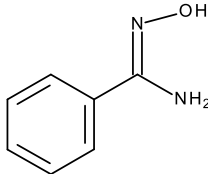
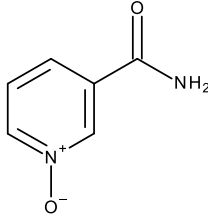
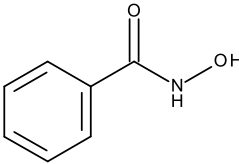
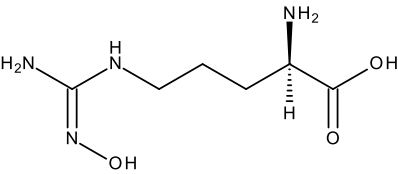
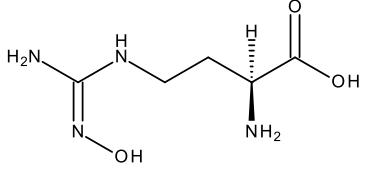
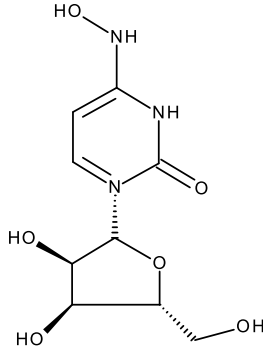
5.2	<i>torZ</i>	83
5.2.1	Material	83
5.2.2	Methoden	84
5.2.2.1	Proteinreinigung.....	84
5.2.2.2	Methylviologen-Assay	85
5.3	Ergebnisse und Diskussion.....	86
5.4	Ausblick	97
6	Literaturverzeichnis	99
7	Anhang	110
7.1	Liste getesteter Substrate	110
7.2	Plasmidkarte für die Expression von <i>torZ</i>	112
7.3	Plasmidsequenz <i>torZ</i>	112
8	Darstellung des Eigenanteils gemäß § 8 der Promotionsordnung.....	116
9	Danksagung	118
10	Zusammenfassung	120
11	Abstract	122

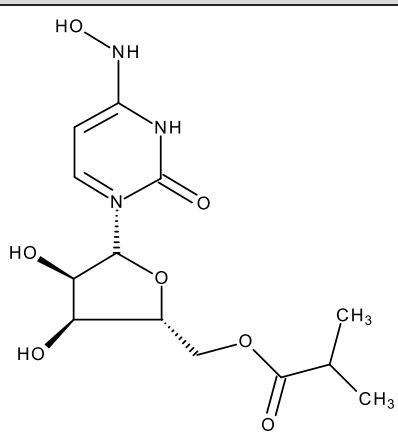
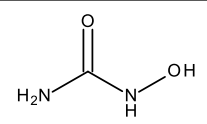
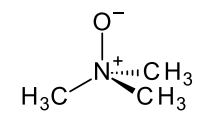
Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	
AO	Aldehydoxidase
BAO	Benzamidoxim
BIS-MGD	Bis-Pterin Cofaktor mit <u>G</u> uanin <u>D</u> inukleotid Koordination
cPMP	zyklisches Pyranopterinmonophosphat
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
Cyb5B	Cytochrom b5 B
Cyb5R3	Cytochrom b5 Reduktase 3
CYP450	CytochromP450
ER	endoplasmatisches Retikulum
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
KI	<i>Knock-in</i>
KO	<i>Knock-out</i>
MAM	Mitochondrien-assoziierte Membran
mARC	<i>mitochondrial amidoxime reducing component</i>
MASH	<i>metabolic dysfunction-associated steatohepatitis</i>
MASLD	<i>metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease</i>
MoCD	<i>molybdenum cofactor deficiency</i>
Moco	Molybdän-Kofaktor
MOS	Molybdän-Kofaktor-Sulfurase
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>non alcoholic steatohepatitis</i>
NO	Stickstoffmonoxid

Abkürzung	
NR	Nitratreduktase
QDS	Quantendynamische <i>Selektion (Quantum dynamical selection)</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SMX	Sulfamethoxazol
SMX-HA	Sulfamethoxazol-Hydroxylamin
SO	Sulfitoxidase
SOD	Superoxid-Dismutase
TMA	Trimethylamin
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid
WT	Wildtyp
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase

Strukturformelverzeichnis

Verbindung	Struktur
Benzamidoxim	
Nicotinamid- <i>N</i> -Oxid	
Benzhydroxamsäure	
<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-Arginin	
<i>N</i> ^ω -Hydroxy-nor-L-Arginin	
<i>N</i> ⁴ -Hydroxy-Cytidin	

Verbindung	Struktur
Molnupiravir	 <p>The structure of Molnupiravir consists of a pyrimidine ring with a hydroxyl group at position 6 and a ribose sugar at position 4. The ribose sugar is linked to an isopropoxy group via an ester bond. The pyrimidine ring is shown in a tautomeric form with a carbonyl group at position 2 and a hydroxyl group at position 4.</p>
Hydroxyharnstoff	 <p>The structure of Hydroxyharnstoff (hydroxyurea) is a central carbonyl group (C=O) bonded to an amino group (NH₂) on one side and a hydroxyl group (OH) on the other.</p>
Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid	 <p>The structure of Trimethylamin-<i>N</i>-Oxid is a central nitrogen atom with a positive charge, bonded to three methyl groups (CH₃) and an oxygen atom with a negative charge (O⁻).</p>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: NAD ⁺ / NADH-Strukturformeln mit R1 = Ribose-P-P-Adenosin	3
Abbildung 2: Absorptionsspektrum von NADH und NAD ⁺ im Vergleich	3
Abbildung 3: NADH-Fluoreszenzspektrum	4
Abbildung 4: Biotransformation	7
Abbildung 5: Enzymfamilien	10
Abbildung 6: Elektronenfluss im mARC-Enzymsystem	15
Abbildung 7: Prodrug-Prinzip	21
Abbildung 8: Reduktion von TMAO zu TMA	75
Abbildung 9: Funktionweise und Ablauf des Methylviologen-Assays	76
Abbildung 10: Entstehung von TMAO im menschlichen Körper	78
Abbildung 11: Enzymatische Umsetzung von ¹² C-TMAO durch hmARC1	87
Abbildung 12: Enzymatische Umsetzung von ¹² C-TMAO durch hmARC1 mit reduzierter eingesetzter Proteinmenge wie in 5.1.1.2.2 beschrieben.	87
Abbildung 13: Enzymatische Umsetzung von ¹² C-TMAO durch hmARC1 mit reduzierter eingesetzter Proteinmenge wie in 5.1.1.2.2 beschrieben in 100 mM MES pH 6.	88
Abbildung 14: Michaelis-Menten-Kinetik von kommerziellem ¹² C-TMAO durch die enzymatische Umsetzung von TorZ	89
Abbildung 15: Michaelis-Menten Sättigungskurven von der Reduktion von ¹² C-TMAO durch TorZ	90
Abbildung 16: Michaelis-Menten Sättigungskurve für die Reduktion von 1x ¹³ C-TMAO durch TorZ	91
Abbildung 17: Michaelis-Menten Sättigungskurve von 2x ¹³ C-TMAO durch TorZ	91
Abbildung 18: Michaelis-Menten Sättigungskurve von 3x ¹³ C-TMAO durch TorZ	92
Abbildung 19: Zusammenfassung der Abbildungen 15-18 in einem Graphen.	92
Abbildung 20: K _M -Werte im Überblick	93
Abbildung 21: V _{max} -Werte im Überblick	94
Abbildung 22: Boltzmann-Fit des kommerziellen ¹² C-TMAOs	95
Abbildung 23: Ermittelte K _M -Werte aus Michaelis-Menten Fit und Boltzmann Fit in der Übersicht.	96
Abbildung 24: Plasmidkarte torZ	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionelle Gruppen mit Beispielen, die durch das hmARC-Enzysystem umgesetzt werden.	19
Tabelle 2: Materialien.....	79
Tabelle 3: Reagenzien	80
Tabelle 4: Software	80
Tabelle 5: Materialien für die torZ-Analytik	83
Tabelle 6: Reagenzien für die torZ Analytik.....	84
Tabelle 7: Michaelis-Menten-Parameter aus den Abbildungen 15-18.....	93
Tabelle 8: Enzymkinetische Parameter aller TMAO-Derivate aus Michaelis-Menten-Fit und Boltzmann-Fit im Überblick.	95
Tabelle 9: Substanzen, die durch hmARC-1 reduziert werden	110
Tabelle 10: Substanzen, die nicht durch hmARC-1 reduziert werden	110

1 Einleitung

1.1 Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wird in Katal ($\text{kat} = \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) gemessen und beziffert die Umsetzung von einer Stoffmenge (Mol) pro Zeiteinheit (Sekunde). Klassisch nutzt man gelegentlich noch Enzymeinheiten (Unit, U). Sie beziffern den Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute. Von spezifischer katalytischer Aktivität spricht man, wenn man die Enzymaktivität auf die Proteinmenge bezieht. Die dazugehörigen Maßeinheiten sind dann Unit pro Milligramm ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) bzw. Katal pro Kilogramm ($\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$) (Bisswanger, 2014).

Zur Quantifizierung von Enzymaktivitäten braucht man ein physikalisches Signal, das den Verbrauch eines Substrates oder die Bildung eines Produktes anzeigt. Häufig nutzt man dazu optische Signale wie Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz, aber auch elektrische Signale, wie Spannung und Leitfähigkeit oder auch mechanische wie Gasdruck und Masse lassen sich je nach Art der enzymatischen Umsetzung nutzen (Bisswanger, 2014). Es gibt aber auch enzymatisch katalysierte Reaktionen, die sich nicht direkt messen lassen, denen man eine sogenannte Indikatorreaktion nachschaltet. Dabei handelt es sich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion, die das Produkt der eigentlich zu messenden Reaktion umsetzt und die leicht messbar ist (Bisswanger, 2014).

Enzymkatalysierte Redox-Reaktionen, bei denen NAD(P)H der Elektronendonator ist, lassen sich besonders gut über die Absorption bei 340 nm (Abbildung 1 und Abbildung 2) oder über Fluoreszenz (Abbildung 3) quantifizieren (Chance, 1991).

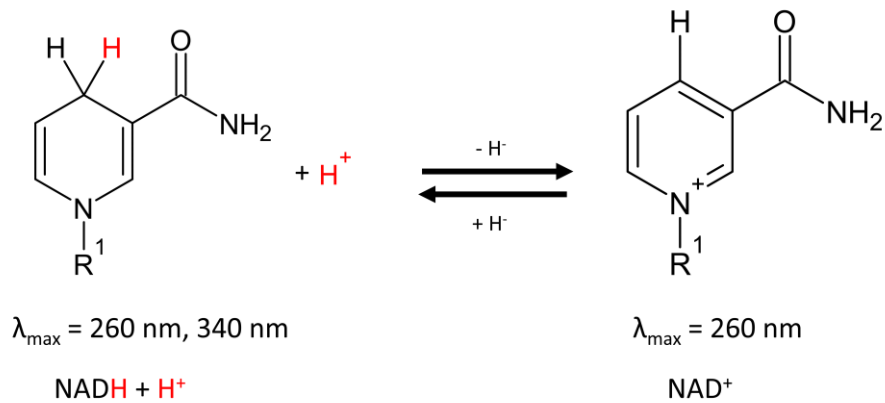


Abbildung 1: NAD⁺/ NADH-Strukturformeln mit R₁ = Ribose-P-P-Adenosin

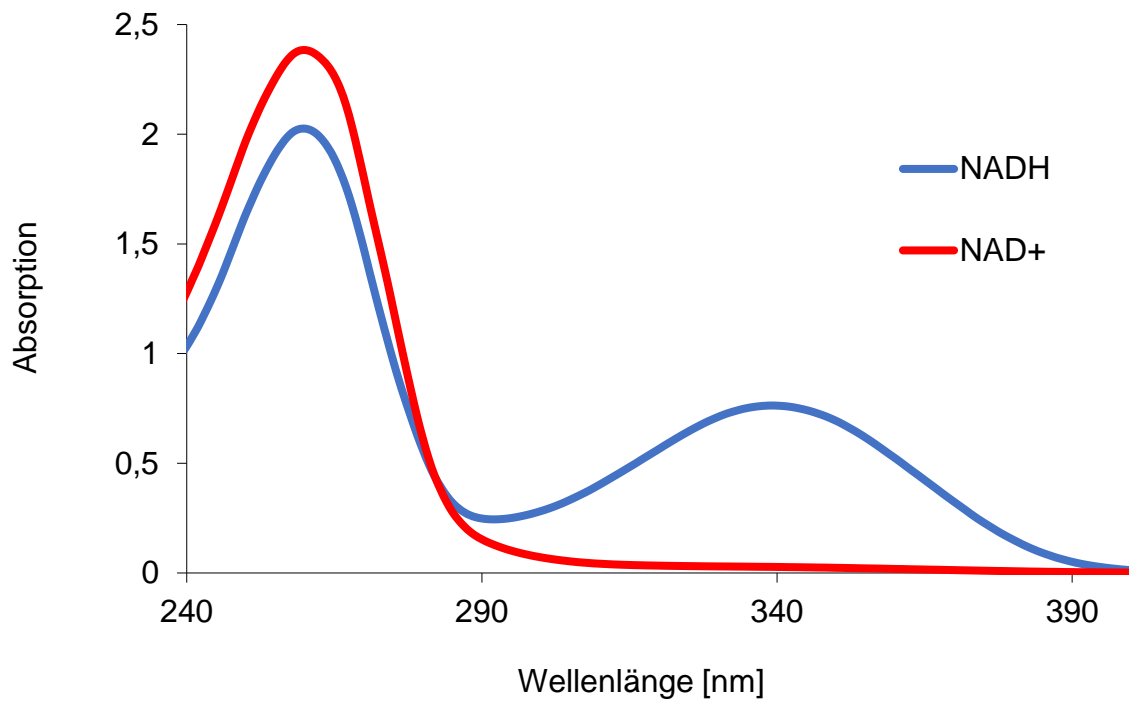


Abbildung 2: Absorptionsspektrum von NADH und NAD⁺ im Vergleich

Das Spektrum wurde in einer Quarzküvette bei 30 °C in einem UV-2600i Spektrophotometer mit einer Konzentration von 200 µM aufgenommen.

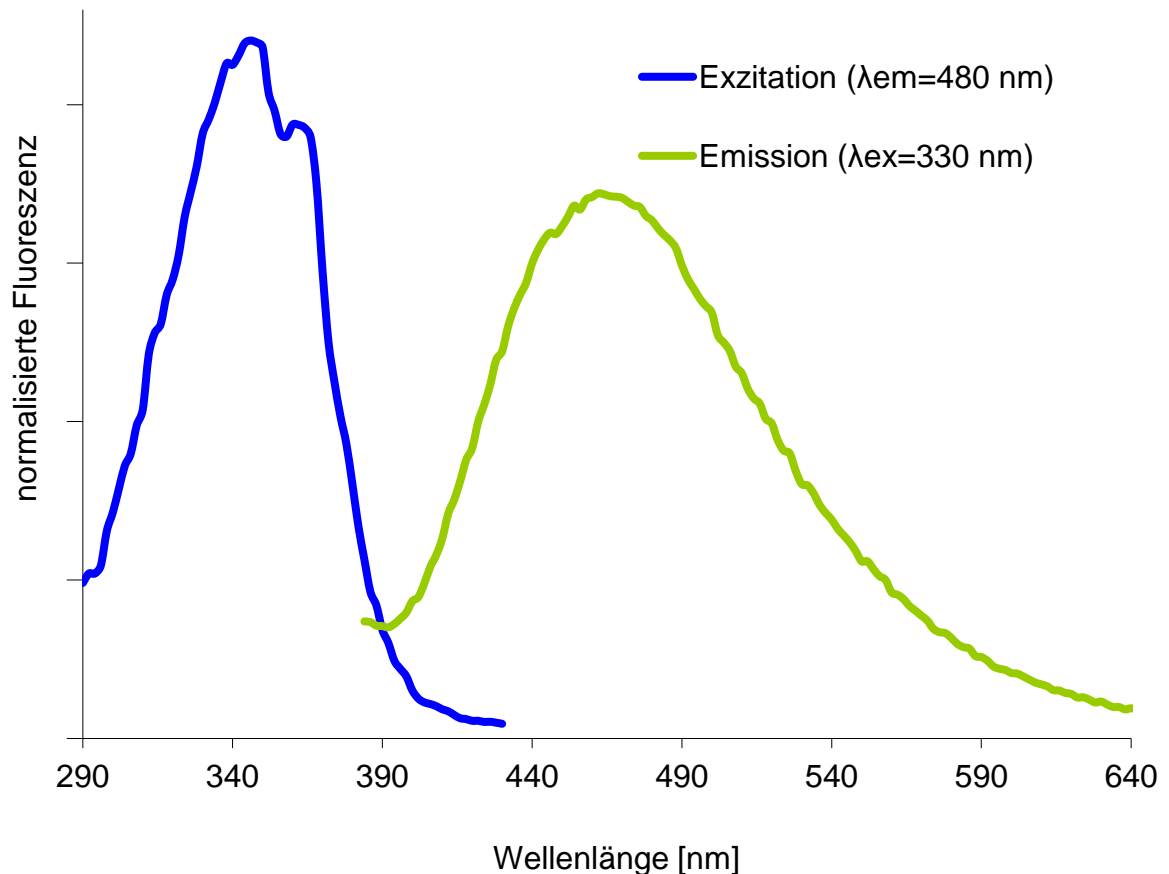


Abbildung 3: NADH-Fluoreszenzspektrum

Exzitation ist die (auf die Fläche normierte) Fluoreszenzintensität gemessen bei konstanter Emissionswellenlänge (480 nm); Emission ist die (auf die Fläche normierte) Fluoreszenzintensität gemessen bei konstanten Anregungswellen. Aufgenommen mit einem Platerader Tecan Infinite 200Pro in 96-well-Polystyrolplatten. Beide Spektren wurden jeweils aus 13 normierten Spektren gemittelt.

Wird bei einer (enzymatischen) Reaktion NADH verbraucht, so kann man die Absorptionsabnahme photometrisch gut verfolgen und entsprechend enzymatische Umsetzungsraten quantifizieren.

Um Enzyme näher zu charakterisieren, misst man ihre Aktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei ansonsten konstant gehaltenen Reaktionsparametern. Eine Auftragung der gemessenen Aktivität über der Substratkonzentration ergibt im einfachsten Fall eine hyperbolische Sättigungskurve, die mit der Michaelis-Menten Gleichung beschrieben werden kann:

$$V = V_{\max} \cdot \left(\frac{[S]}{K_M + [S]} \right) \quad (\text{Gleichung Nr. 1}) \quad (\text{Michaelis et al., 1913}).$$

Darin ist V_{\max} die Maximalaktivität bei Substratsättigung des Enzyms und die Michaelis-Menten-Konstante K_M ist die Substratkonzentration, bei der halbmaximale Aktivität erreicht wird.

Eine halblogarithmische Auftragung (Aktivität über dem Logarithmus der Substratkonzentration) ergibt eine sigmoidale Kurve, die mit einer logistischen Gleichung beschrieben werden kann:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + e^{(\ln(10) \cdot (pS - pK_M))}} \quad (\text{Gleichung Nr. 2})$$

Diese Gleichung kann durch einfache algebraische Umformung aus der Michaelis-Menten-Gleichung Nr.1 abgeleitet werden. pS und pK_M sind die mit -1 multiplizierten dekadischen Logarithmen von S und K_M .

Um die spezifische Enzymaktivität genauer klassifizieren zu können, wird die Wechselzahl k_{cat} (*turnover number*) und der Quotient aus der Wechselzahl und dem K_M -Wert errechnet.

k_{cat} wird aus der maximalen Umsatzrate V_{\max} und der Enzymkonzentration $[E]_0$ in der Einheit mol/l berechnet:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]_0} \quad (\text{Gleichung Nr. 3})$$

Zur näheren Charakterisierung eines Enzyms verwendet man oft den Quotienten k_{cat}/K_M . Je höher dieser Wert ist, umso größer ist die katalytische Effizienz (Eisenthal et al., 2007). Dieser Quotient ist diffusionskontrolliert limitiert, denn die Umsetzungen können nur so schnell erfolgen, wie Substrate und Enzyme miteinander kollidieren (Pettersson, 1989). Die Brauchbarkeit dieses Quotienten zur Charakterisierung von Enzymen wurde aber infrage gestellt (Carrillo et al., 2010).

Gelegentlich haben (multimere) Enzyme mehrere Substratbindestellen und zeigen ein kooperatives Verhalten. Positive Kooperativität ($n > 1$) liegt vor, wenn nach Bindung des ersten Liganden die Bindung weiterer Liganden erleichtert ist. Bei einer negativen Kooperativität ($n < 1$) ist die Bindung weiterer Liganden erschwert (Whitty, 2008). Dies wird durch die Hill-Gleichung beschrieben, die im Prinzip eine durch einen Exponenten erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung ist.

$$V = V_{\max} \cdot \left(\frac{[S]^n}{K_M^n + [S]^n} \right) \quad (\text{Gleichung Nr. 4})$$

Dies lässt sich wie oben in eine logistische Funktion umwandeln:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + e^{(n \cdot \ln(10) \cdot (pS - pK_M))}} \quad (\text{Gleichung Nr. 5})$$

Ist bei Substratabwesenheit ($[S] = 0$) eine Hintergrundaktivität V_0 zu verzeichnen, so kann man diese Gleichung mit V_0 erweitern, um diesem Umstand Rechnung zu tragen:

$$V = \frac{V_{\max} - V_0}{1 + e^{(n \cdot \ln(10) \cdot (pS - pK_M))}} + V_0 \quad (\text{Gleichung Nr. 6})$$

Damit ergibt sich eine 4-parametrische logistische Funktion (Y_{4PL}), die man zur Anpassung von Kurven an Messdaten nutzen kann.

1.2 Biotransformation

Lipophile Substanzen können renal nicht (oder nur in einem sehr geringen Maße) eliminiert werden, da sie während der glomerulären Filtration fast vollständig rückresorbiert werden. Daher müssen diese Substanzen zunächst in hydrophilere Substanzen umgewandelt werden. Dieses erfolgt im Rahmen der Biotransformation (Katzung, 2010). Die IUPAC definiert Biotransformation allgemein als die chemische Umwandlung von Stoffen durch lebende Organismen oder Enzympräparate (Wermuth et al., 1998).

Die Biotransformation wird unterteilt in Phase I und Phase II. Phase I Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen, bei denen polare funktionelle Gruppen eingeführt werden. Phase II sind Konjugationsreaktionen, bei denen die Produkte aus den Phase I Reaktionen an hydrophile Verbindungen konjugiert werden und als wasserlösliche Substanzen ausgeschieden werden können. Im Menschen werden die Produkte aus Phase I zum Beispiel oft an Glucuronsäure konjugiert. Dieses Konzept wird teilweise um die Aufnahme (Phase 0) und der Elimination aus der Zelle (zB.

mittels *ATP-binding-cassette-transporter*, *Multidrug-resistance related protein*) um die Phase III erweitert (siehe Abbildung 4) (Döring and Petzinger, 2014) .

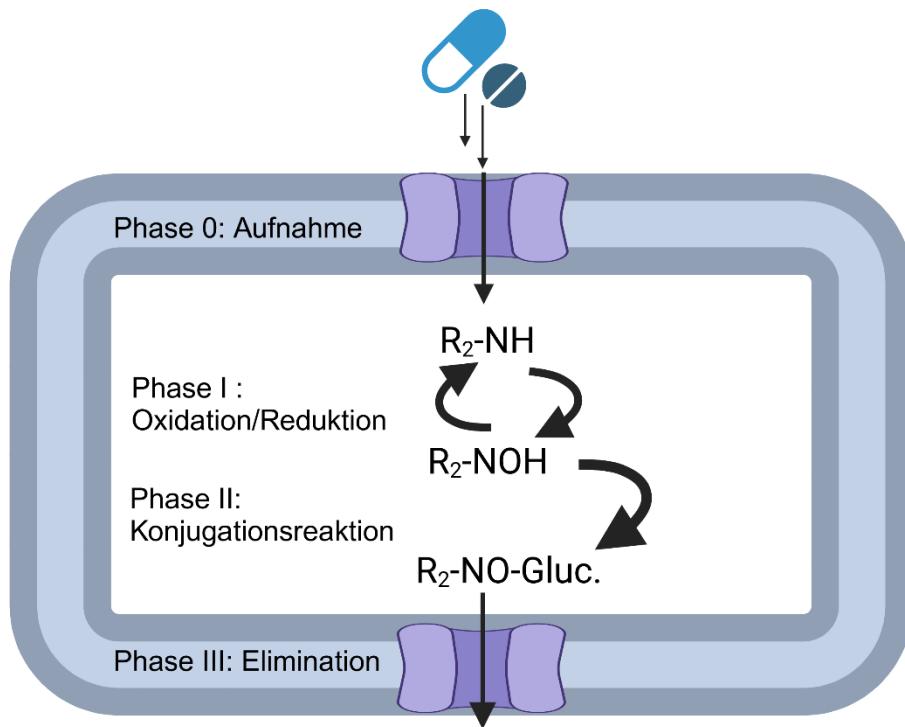


Abbildung 4: Biotransformation

Nach Aufnahme in Phase 0 werden die Substanzen (z.B. R_2-NH) zunächst in Phase I Reaktionen oxidiert zu R_2-NOH und anschließend in Phase II z.B. an Glucuronsäure (=Gluc) konjugiert ($R_2-NO-Gluc.$), um schließlich in Phase III Reaktionen aus der Zelle eliminiert zu werden. (Abbildung erzeugt mit BioRender)

Die Funktionalisierungsreaktionen in Phase I erfolgen entweder durch Einführung neuer polarer funktioneller Gruppen oder durch den Austausch oder Demaskierung bestehender funktioneller Gruppen durch Oxidations-, Reduktions- oder hydrolytische Reaktionen. Phase I Reaktionen werden oftmals durch CytochromP450-Enzyme (CYP 450) oder durch die Flavinhaltige Monooxygenase (FMO) vermittelt (Kebamo and Tesema, 2015).

Cytochrom P450-Enzyme sind membrangebundene Häm-Proteine. Die meisten von ihnen sind Monooxygenasen. Der Name der Cytochrom P450 Enzyme resultiert aus dem im reduzierten Zustand vorliegenden Absorptionsmaximum bei 450 nm, wenn das Eisen-Ion im aktiven Zentrum Kohlenmonoxid koordiniert. Die CYP-Enzyme werden nach ihrer Aminosäuresequenz bezeichnet und in Familien und Unterfamilien eingeteilt (Manikandan and Nagini, 2018). Im Arzneistoffmetabolismus sind vor allem CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 besonders relevant (Waring, 2020).

Die FMOs stellen neben den CYP-Enzymen ebenfalls eine wichtige Klasse im Arzneistoffmetabolismus dar. Von den FMOs existieren 5 Isoformen (FMO1-5), von denen die FMO3- und FMO5-Gene am häufigsten in der menschlichen Leber vorkommen. Die FMO6 wird als Pseudogen eingestuft, weil es nicht in der Lage ist, eine korrekt gespleißte mRNA zu produzieren. Die FMOs stellen Monooxygenasen dar, welche vor allem die Oxygenierung von nukleophilen Heteroatomen katalysiert. Die FMO1 katalysiert beispielsweise Oxidationen im Sinne einer Bayer-Villinger-Reaktion. Im Gegensatz zu den CYP-450-Enzymen sind die Enzyme der FMO nicht induzierbar (Phillips and Shephard, 2017).

Werden zwei Arzneistoffe über das gleiche Enzymsystem metabolisiert, kann es zu Wechselwirkungen kommen, welche möglicherweise zu unerwünschten Effekten führen. Umfassend untersucht ist dieses Phänomen zum Beispiel bei dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Simvastatin. Dieser wird überwiegend über CYP3A4 metabolisiert. Bei Applikation eines zweiten Arzneistoffes, welcher auch über CYP3A4 verstoffwechselt wird, kommt es zu einer deutlich erhöhten Blutplasmakonzentration des Arzneistoffes, welche unter anderem zu der gefährlichen Nebenwirkung der Rhabdomyolyse führen kann (Rowan et al., 2009). Um Vorhersagen bezüglich der Verträglichkeit, Bioverfügbarkeit oder bezüglich der möglichen Kombination von Arzneistoffen für einen Patienten machen zu können, sind *in-vitro*-Studien notwendig. Um möglichst viele Arzneistoffe und deren Umsetzungen vorhersagen zu können, ist das Screening vieler Substanzen mit hohem Durchsatz in der Forschung essentiell (Carnero, 2006; Benet et al., 2019).

1.3 Molybdänhaltige Enzyme

1.3.1 Übersicht

Das Übergangsmetall Molybdän (Mo, Ordnungszahl 42) ist in einer Vielzahl von Metalloenzymen Teil des aktiven Zentrums und ist in dieser Funktion in allen Lebensformen zu finden. Molybdänhaltige Enzyme übernehmen nicht nur Schlüsselfunktionen in Stickstoff-, Kohlenstoff- und Schwefelkreisläufen und sind damit essentiell für das Leben, sondern sind auch an biogeochemischen Zyklen von Arsen, Chlor, Selen, Iod und Antimon beteiligt (Mendel and Kruse, 2012; Wells et al., 2023).

Molybdän zählt zu den Spurenelementen, da es nur in sehr geringen Mengen vorliegt. In den meisten Gesteinen und Böden liegen Konzentrationen von 1-10 mg/kg vor. Im offenen Meerwasser hingegen ist Molybdän das am häufigsten vorkommende Übergangsmetall mit Konzentrationen von bis zu 10 mg/L. Die hohe Abundanz ist zum einen auf die hohe Wasserlöslichkeit und zum anderen auf die geringe chemische Reaktivität des Molybdat-Ions (MoO_4^{2-}) zurückzuführen (Smedley and Kinniburgh, 2017). Bioverfügbar ist Molybdän, indem es als Molybdat (MoO_4^{2-}) vorliegt. Um biologische und entsprechend katalytische Aktivität zu erhalten, muss das Molybdän in einem Pyranopterin koordiniert werden, wodurch eine prosthetische Gruppe gebildet wird, die als Molybdän-Kofaktor (Moco) bezeichnet wird (Mendel and Kruse, 2012). Eine Ausnahme stellt die bakterielle Nitrogenase dar, bei der das Molybdän in einem Eisen-Schwefel-Cluster $[\text{MoFe}_7\text{S}_9]$ eingebaut ist und in dieser Form biologisch aktiv ist (Mendel and Kruse, 2012; Hille et al., 2014).

Von den zahlreichen bekannten, molybdänabhängigen Enzymen sind die meisten in Bakterien zu finden – von den eukaryotischen molybdänhaltigen Enzymen sind nur wenige bekannt (Mendel and Kruse, 2012).

Die meisten bekannten molybdänhaltigen Enzyme sind mononuklear. Durch den Einbau des Molybdäns in einen Eisen-Schwefel-Cluster $[\text{MoFe}_7\text{S}_9]$ stellt die bakterielle Nitrogenase die einzige Ausnahme dar (Hille et al., 2014). In der Regel katalysieren molybdänhaltige Enzyme 2-Elektronen-Übergänge, wobei sich die Oxidationszahl des Molybdäns (als Reduktionsmittel) von Mo^{IV} zu Mo^{VI} ändert (Mendel and Kruse, 2012). Häufig werden die molybdänhaltigen Enzyme anhand der Koordinierung ihres katalytischen Molybdat-Ions in 3 Familien eingeteilt: die Sulfitoxidase, die Xanthinoxidase und die DMSO-Reduktase (Hille et al., 2014).

Wie in Abbildung 5 gezeigt, zählen zu den Vertretern der Xanthinoxidase die Xanthindehydrogenase und die Aldehydoxidase. Den Sulfitoxidasen werden die Nitratreduktase, Sulfitoxidase und die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente (mARC) zugeordnet.

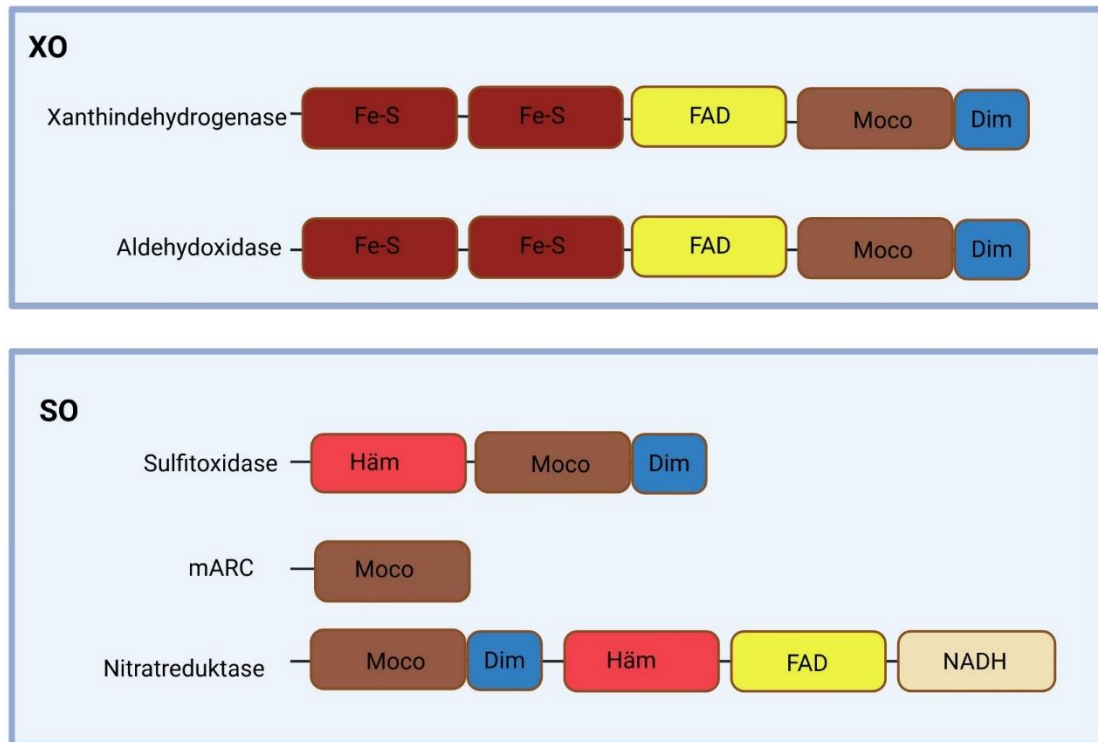


Abbildung 5: Enzymfamilien

SO = Sulfitoxidase; XO = Xanthinoxidase nach (Mendel and Kruse, 2012) mit Fe-S = Eisen-Schwefel-Cluster, FAD = FAD-Domäne, Moco = Molybdän-Kofaktor bindende Domäne, Dim = Dimerisierungsdomäne, Häm = Häm-Domäne (Abbildung erzeugt mit BioRender)

1.3.2 Xanthindehydrogenase

Die Xanthindehydrogenase (XDH) besteht aus zwei Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Domänen, einer FAD-bindenden Domäne sowie einer Moco-bindenden Domäne und einer Dimerisierungsdomäne. Die Moco-Bindungsdomäne ist dabei mit der Dimerisierungsdomäne fusioniert (siehe Abbildung 5). Die Mitglieder der Xanthinoxidase-Familie weisen ein breites Substratspektrum auf und katalysieren vor allem die Umsetzung von Aldehyden und aromatischen Heterozyklen. Die bei der Oxidation von Substraten freiwerdenden Elektronen werden in die intramolekulare Elektronentransferkette eingespeist und von der FAD-bindenden Domäne entweder

auf NAD^+ oder auf molekularen Sauerstoff übertragen, sodass ein Superoxidanion entsteht (Mendel and Kruse, 2012).

Im Gegensatz zu Pflanzen kann in Säugetieren das (reduzierende) Enzym XDH in das (oxidierende) Enzym XO umgewandelt werden. Diese Umwandlung kann entweder reversibel durch die Oxidation von Thiolen zu Disulfiden oder irreversibel durch leichte Proteolyse erfolgen (Hille et al., 2014).

Molekularer Sauerstoff kann bei Säugetieren (nicht bei Pflanzen) von der XO als Elektronenakzeptor verwendet werden. Dabei entsteht ebenfalls ein Superoxidanion. NAD^+ hingegen ist der bessere Elektronenakzeptor und wird von der XDH unter Bildung von NADH genutzt (Mendel and Kruse, 2012).

Die Xanthinoxidase (XO) katalysiert im Purinstoffwechsel den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, indem es Hypoxanthin zu Xanthin und anschließend Xanthin zur Harnsäure umwandelt (Day et al., 2016).

1.3.3 Aldehydoxidase

Die Aldehydoxidase (AO) ist ein cytosolisches Enzym und ist evolutionär durch Genduplikation von XDH in Eukaryonten entstanden. Damit einhergehend weisen die AO und die XO eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit (>50 %) auf (Rodríguez-Trelles et al., 2003; Dalvie and Di, 2019). Entsprechend besitzen diese die gleichen prosthetischen Gruppen (Abbildung 5).

Die AO weist ein großes Substratspektrum auf und katalysiert nicht nur die Oxidation von Aldehyden in deren entsprechende Carbonsäuren, sondern auch die Oxidation von Heterozyklen (Garattini et al., 2008).

Im Gegensatz zu XDH kann AO NAD^+ nicht als Elektronenakzeptor nutzen und überträgt die Elektronen, so wie XO, auf molekularen Sauerstoff. Die entstehenden Superoxidanionen disproportionieren mit Halbwertszeiten im Millisekundenbereich zu H_2O_2 und O_2 . Diese Reaktion wird in den meisten Lebensformen durch Superoxid-Dismutasen (SOD) noch beschleunigt (Elstner, 1991).

Obwohl bereits zahlreiche Substrate bekannt sind, ist die physiologische Funktion der AOs noch nicht vollständig erforscht (Dalvie and Di, 2019). Unter anderem wird angenommen, dass AO (genauer die Aldehydoxidase 1, AOX1) eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Adipozyten spielt (Weigert et al., 2008). Weiterhin

wird vermutet, dass AOX1 für die Adipogenese unerlässlich ist und somit einen wichtigen Einfluss im Energiestoffwechsel besitzt (Weigert et al., 2008). Im Hinblick auf den Arzneimittelmetabolismus sind die AOs ein interessantes pharmazeutisches Target (Dalvie and Di, 2019).

1.3.4 Sulfitoxidase

Im Laufe der Evolution haben sich bei den Eukaryoten verschiedene Formen der Sulfitoxidase (SO) entwickelt. Die SO-Reaktionsmechanismen sind jedoch sowohl bei pflanzlichen als auch bei tierischen SOs gleich: Die SOs katalysieren die Reaktion $\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$, welches den wichtigen Endschrift beim oxidativen Abbau von Cystein, Methionin und Membranbestandteilen wie Sulfatiden darstellt (Nowak et al., 2004). Dabei ändert sich der Oxidationszustand des Molybdäns im aktiven Zentrum von Mo^{VI} zu Mo^{IV} (Hille, 1996).

Tierische SOs bestehen aus zwei Domänen, welche unterschiedliche prosthetische Gruppen binden. Dazu zählen die N-terminale Häm-(Cytochrom b5)-Bindungsdomäne sowie die C-terminale Moco-Bindungsdomäne (Abbildung 5). Den meisten pflanzlichen SOs fehlt hingegen die N-Terminale Häm-Domäne, sodass diese nur den Moco als prosthetische Gruppe besitzen (Mendel and Kruse, 2012). Zudem ist die menschliche SO im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert und überträgt seine Elektronen auf Cytochrom c, während die pflanzliche SO ein peroxisomales Enzym darstellt und durch das Fehlen der Häm-Domäne seine Elektronen nicht auf Cytochrom c überträgt, sondern auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Superoxidanion. Als mögliche Ursache wird angenommen, dass dieses dem Schutz der Katalase dient, da diese durch geringe Sulfitkonzentrationen bereits gehemmt wird (Hänsch et al., 2006).

Sulfit ist ein starkes Nukleophil und kann mit einer Vielzahl von Zellbestandteilen reagieren. Somit dient die SO der Entgiftung von Sulfit (SO_3^{2-}), indem es dieses zu Sulfat (SO_4^{2-}) oxidiert (Nowak et al., 2004).

Die Bedeutung des Molybdän-Kofaktors wird anhand der Sulfitoxidase deutlich: Kann der menschliche Organismus nicht ausreichend Moco synthetisieren, kommt es sehr früh nach der Geburt zu neurologischen Fehlentwicklungen (Johannes et al., 2022). Verantwortlich hierfür ist eine verminderte SO-Aktivität, die aus einer nicht ausreichenden Moco-Synthese resultiert. Das klinische Krankheitsbild wird mit MoCD

(MoCD- *molybdenum cofactor deficiency*) beschrieben (Atwal and Scaglia, 2016). Die fehlende Aktivität der SO resultiert in einem Anstieg schwefelhaltiger Metabolite wie S-Sulfocystein und Thiosulfat sowie einem Rückgang an Cystein und Cystin, der oxidierten Form (Disulfid) des Cysteins (Misko et al., 1993, updated 2023; Johannes et al., 2022). Die Synthese des Moco erfolgt in drei Schritten (Hille, 1996). Je nachdem, welcher Biosyntheseschritt fehlerhaft ist, klassifiziert man in MoCD Typ A, B, oder C. Dieses ist für die Behandlung entscheidend, denn es gibt bisher lediglich eine Therapie für MoCD Typ A (Johannes et al., 2022). Dieser kann mithilfe einer Substitutionstherapie von zyklischem Pyranopterinmonophosphat (cPMP) behandelt werden. Chemisch synthetisiertes cPMP wurde erstmalig im Jahr 2021 unter der Bezeichnung Fosdenopterin von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen und kam unter dem Namen Nulibry® auf den Markt (Misko et al., 1993, updated 2023; Johannes et al., 2022).

1.3.5 mARC

1.3.5.1 Übersicht

Die mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (*mitochondrial amidoxime reducing component* - mARC) wurde erstmals 2006 entdeckt. Dazu isolierten Havemeyer *et al.* ein ca. 35 kDa großes Protein aus der äußeren mitochondrialen Membran und konnten zeigen, dass die Fähigkeit, N-O-Bindungen zu reduzieren auf dieses Protein zurückzuführen ist (Havemeyer et al., 2006).

mARC1 und mARC2 sind Paraloge. In Säugetieren gibt es zwei Gene (*MTARC1* und *MTARC2*), welche für zwei Proteine (mARC1 und mARC2) kodieren und beim Menschen eine Tandemorientierung auf dem Chromosom 1 aufweisen. Beide Gene weisen eine Übereinstimmung von 66 % hinsichtlich ihrer Sequenzidentität und 80 % ihrer Ähnlichkeit auf (Wahl et al., 2010).

Anhand von datenbankgestützten Sequenzanalysen können Proteine verschiedenen Familien zugeordnet werden. Danach konnten die mARC-Proteine der Moco-Sulfurase-Familie zugeordnet werden (Hille et al., 2014).

Für diese Einteilung entdeckten Aravind und Anantharaman 2002 diese neue Superfamilie mit Domänen, welche reich an beta-Faltblattsträngen sind. In dieser Superfamilie werden Molybdän-Kofaktor-Sulfurase (MOS) und weitere andere

Proteine sowohl aus Prokaryoten als auch aus Eukaryoten einsortiert (Anantharaman and Aravind, 2002). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der enthaltenen C-terminalen Domäne mit Moco-Sulfurase wurde diese als MOSC-Domäne bezeichnet. Es sind inzwischen zahlreiche MOSC-Domänenproteine beschrieben, welche funktionell unterschiedlich sind und kaum nachweisbare Sequenzidentität zwischen den Mitgliedern verschiedener Unterfamilien aufweisen. Es gibt nur eine einzige in allen Sequenzen konservierte Aminosäure, ein Cystein im aktiven Zentrum, welches bei bisher untersuchten MOSC-Proteinen das Molybdän-Ion im aktiven Zentrum koordiniert (Anantharaman and Aravind, 2002). Von diesem ist aufgrund von Strukturaufklärungen inzwischen bekannt, dass es an der Koordination des Molybdänions vom Moco-Kofaktor beteiligt ist (Struwe et al., 2023). Zudem können die Mitglieder dieser Familien weitere Proteindomänen enthalten. Auch mARC1 und mARC2 besitzen eine MOSC-Domäne und werden dieser Familie zugeordnet. In der Vergangenheit erfolgt die familiäre Einordnung primär anhand der Koordination des Molybdänzentrums. Danach würden MOSC-Domänen-Proteine und somit auch mARC der Sulfioxidase-Familie zugeordnet (Abbildung 5).

Bei Enzymen, die der XO-Familie angehören, ist es charakteristisch, dass eine Behandlung mit Cyanid zu einer Abstrahierung des terminalen Sulfidliganden in Form von Thiocyanat kommt, womit eine Inaktivierung des Enzyms einhergeht. Da dieses bei beiden mARC-Paralogen nicht eintritt, konnte eine Zugehörigkeit zur XO-Familie ausgeschlossen werden (Wahl et al., 2010; Ott et al., 2015). Anhand von EPR-Spektren wurde untersucht, ob mARC entsprechend zur SO-Familie zugeordnet werden kann. Obwohl eine vollständige Zuordnung nicht möglich war, ähneln die Spektren denen, die der SO -Familie angehören (Ott et al., 2015).

Somit wird mARC aktuell der SO-Familie zugeordnet, wenngleich Kubitza *et al.* anhand der Struktur von *hmARC1* diese Zuordnung kritisch sehen (Hille et al., 2014; Kubitza et al., 2018; Struwe et al., 2023).

Von den eukaryotischen Molybdoenzymen stellt mARC1 mit gerade einmal 337 Aminosäuren (*hmARC1* Gene ID: 64757) das kleinste dar. Es besitzt im Vergleich zu allen anderen eukaryotischen Molybdoenzymen keine Dimerisierungsdomäne, sondern nur eine Moco-Domäne (Abbildung 5) (Mendel and Kruse, 2012). Um dennoch einen Elektronenfluss zu gewährleisten, besteht das mARC-Enzymsystem insgesamt aus drei Komponenten: mARC, Cytochrom b5 B (Cyb5B) und Cytochrom

b5 Reduktase 3 (Cyb5R3). Cyb5B enthält als Kofaktor Häm und Cyb5R3 enthält als Kofaktor FAD.

Somit ist das funktionelle mARC-Enzymsystem hinsichtlich der genutzten Kofaktoren ähnlich aufgebaut wie die Nitratreduktase (siehe 1.3.6). Zudem ist auch der Elektronenfluss bei beiden Proteinen gleich: Als Elektronenlieferant dient der Kofaktor NADH. Dieser überträgt seine Elektronen auf FAD (Cyb5R3), von dem sie an das Häm weitergegeben werden. Im letzten Schritt werden die Elektronen auf Moco (mARC) übertragen, welches dann die Elektronen für die Reduktion seiner Substrate verwendet (siehe Abbildung 6) (Havemeyer et al., 2011; Plitzko et al., 2013).

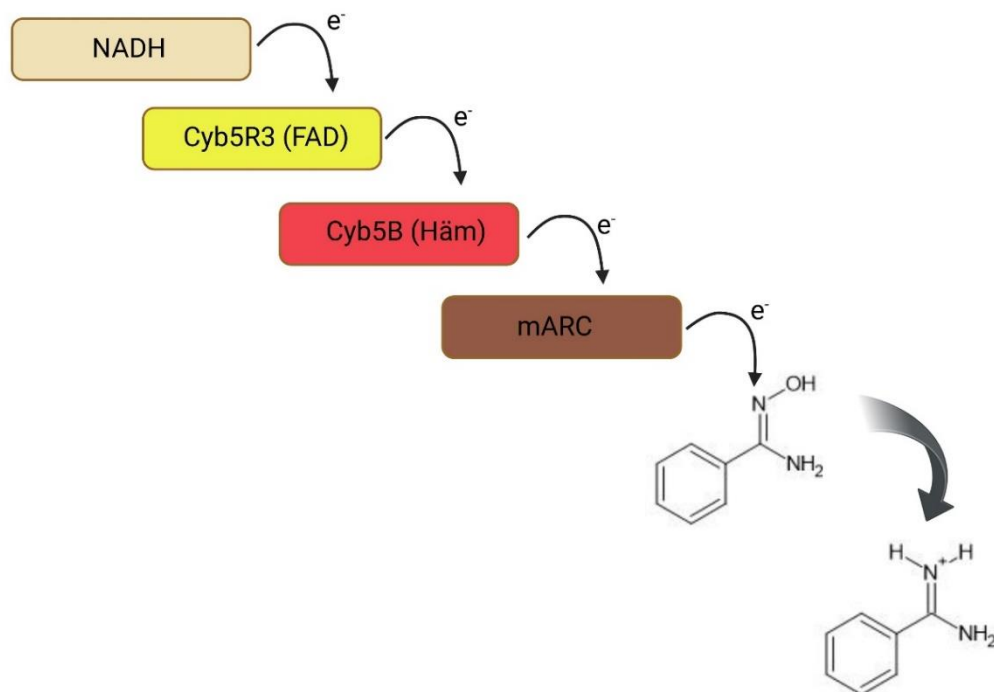


Abbildung 6: Elektronenfluss im mARC-Enzymsystem.

Ausgehend von NADH als Elektronendonator über Cyb5R (FAD) und Cyb5B (Häm) auf mARC (Moco), welches final seine Elektronen auf seine Substrate überträgt. (Abbildung erzeugt mit BioRender)

Cyb5B ist ein amphipathisches Protein und besteht aus zwei Domänen. Einer N-terminalen wasserlöslichen Häm-Bindungsdomäne und einer C-terminalen hydrophoben membranverankernden Domäne (Vergères et al., 1995). Es gibt zwei verschiedene Formen von Cyb5: Eine, die an der Membran des

endoplasmatischen Retikulums assoziiert ist (mikrosomales Cyb5 - TypA) und eines in der äußeren Membran der Lebermitochondrien (Typ B) (Altuve et al., 2001).

Von der humanen NADH Cyb5R existieren 2 Formen. Das *full-length*-Protein besteht aus 301 Aminosäuren mit einer N-terminalen membranbindenden Domäne, welche in der alternativen Spleiß-Variante mit 278 Aminosäuren fehlt (Wahl et al., 2010) .

1.3.5.2 Lokalisation

Humanes mARC1 und mARC2 werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Humanes mARC1 weist die höchste mARC-Expression in Adipozyten auf. Von dem humanen mARC2 sind die höchsten Expressions-Level in der Niere, der Schilddrüse, der Leber und dem Dünndarm zu finden. Insgesamt sind in menschlichen Zelllinien und Geweben überwiegend *hmARC1* zu finden und in den murinen vorwiegend *hmARC2* (Ott et al., 2015). *hmARC* ist an der dem Cytosol zugewandten Seite der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und weist eine $N_{(in)}-C_{(out)}$ -Orientierung in der Membran auf, resultierend aus einer N-terminalen α -Helix, welche als Anker in der äußeren mitochondrialen Membran dient (Klein et al., 2012). Zudem wurde es in der Mitochondrien-assoziierten Membran (MAM) und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) identifiziert (Dutta et al., 2024). Die katalytische Domäne ist in der C-terminalen Domäne (MOSC-Domäne) lokalisiert und entsprechend dem Cytosol zugewandt. Dieses stimmt auch mit der Lokalisation und Ausrichtung von Cyb5B und Cyb5R3 sowie der höchsten *N*-reduktiven Aktivität überein (D'Arrigo et al., 1993).

Eine weitere Lokalisation wurde bisher nur in den Peroxisomen von Ratten und Mäusen gefunden (Islinger et al., 2007; Wiese et al., 2007). Da bisher nicht bekannt ist, dass Cyb5B und Cyb5R3 auch in den Peroxisomen vorkommen, kann mARC dort möglicherweise anderen Funktionen nachkommen als einer *N*-reduktiven-Aktivität. Derzeit wird diskutiert, ob mARC an bisher unbekannten Redoxreaktionen beteiligt ist oder ob die Funktion von mARC mit der allgemeinen Aufgabe der Peroxisomen wie der Zellantwort oder der Reduktion von oxidativem Stress assoziiert ist. Weiterhin gilt auch ein Einfluss auf den Lipidstoffwechsel als mögliche Funktion (Ott et al., 2015).

1.3.5.3 Einfluss auf den Energiestoffwechsel

Kurz vor der Entdeckung von mARC 2006 durch Havemeyer *et al.* wurde bereits eine signifikante *N*-reduktive Aktivität in dem Fettgewebe von Ratten festgestellt (Andersson *et al.*, 2005; Havemeyer *et al.*, 2006). Die ersten Untersuchungen, bei denen ein Einfluss von mARC auf den Energiestoffwechsel entdeckt wurde, erfolgte 2007 durch Malik *et al.* Diese stellten einen Zusammenhang zwischen der Regulation des *MTARC2*-Gens in der Leber mit Diabetes mellitus Typ 2 her (Malik *et al.*, 2007). Bereits 2010 wurden die ersten genomweiten-Assoziationsstudien durchgeführt, bei denen ein Zusammenhang zwischen dem *MTARC1*-Gen und dem Lipidstoffwechsel hergestellt wurde (Teslovich *et al.*, 2010). Neve *et al.* entdeckten 2012 eine gesteigerte Expression des *MTARC2*-Gens nach Differenzierung von 3T3-L1-Zellen der Maus in Adipozyten sowie eine erhöhte *N*-reduktive Aktivität. Weiterhin ging eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von *MTARC2* und *Cyb5B* mit einer reduzierten Lipidsynthese einher (Neve *et al.*, 2012). Weitere Untersuchungen durch Jakobs *et al.* zeigten, dass die Expression der Proteine in der Leber von Mäusen an deren Nahrungsaufnahme gekoppelt ist. Fasten führte zu einer verringerten *N*-reduktiven Aktivität sowie einer verringerten Konzentration an mARC1 und mARC2. Im Gegensatz dazu führte eine *high fat diet* zu einer Erhöhung an mARC2 und der *N*-reduktiven Aktivität (Jakobs *et al.*, 2014b). Ein Jahr später entdecken Neve *et al.* auch im Menschen eine Korrelation: Im Fettgewebe adipöser Patienten führte eine Kalorienrestriktion zu einer verminderten Konzentration von mARC2-Protein (Neve *et al.*, 2015). Die Auswirkungen von mARC2 auf den Lipid-Metabolismus wurden in ersten Studien mit *MTARC2*-KO-Maus erforscht. Im Vergleich zum Wildtyp (WT) wiesen die *MTARC2*-KO-Mäuse bei einer *high fat diet* ein deutlich geringeres Körpergewicht auf. Zudem hatten diese eine erhöhte Körpertemperatur, verminderte Cholesterinwerte und erhöhte Glucose-Werte (Rixen *et al.*, 2019). Des Weiteren wurden zahlreiche genomweite Assoziationsstudien durchgeführt, welche aufzeigen, dass eine relativ häufige Mutation des *MTARC1*-Gens, bei der ein Alanin gegen ein Threonin ausgetauscht wird (mARC1 p.A165T) vor MASLD (*metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease* – früher NAFLD – *non alcoholic fatty liver disease*) schützt und das Fortschreiten des Krankheitsverlaufs bei MASH (*metabolic dysfunction-associated steatohepatitis* – früher NASH – *non alcoholic steatohepatitis*) verlangsamt. Darüber hinaus weisen Träger dieser Variante niedrigere Laborwerte bei der Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Transaminase, Alkalische Phosphatase, LDL-

Cholesterol und HDL-Cholesterol auf. Lediglich die Triglycerid-Werte sind erhöht (Emdin et al., 2020). Zahlreiche weitere Studien unterstützen diese Erkenntnisse, die in einem kürzlich erschienenen *Review* zusammengefasst sind (Struwe et al., 2023). Weiterhin führt die A165T-Variante zu einer veränderten Zusammensetzung hepatischer Phospholipide. Die erhöhte Konzentration an mehrfach ungesättigten Phospholipiden können auch zu dem Schutz vor MASLD beitragen (Luukkonen et al., 2020).

Bei Patienten mit MASH kann sich zudem eine Leberzirrhose oder ein hepatozelluläres Karzinom (HCC - *hepatocellular carcinoma*) entwickeln. Genomweite Assoziationsstudien zeigen eine schützende Korrelation zwischen der A165T-Variante und dem Risiko an HCC zu erkranken (Innes et al., 2022; Sveinbjornsson et al., 2022).

Obwohl der Einfluss von mARC auf den Lipidstoffwechsel belegt ist, sind bisher weder der Mechanismus noch entsprechende physiologische Substrate bekannt. Um Näheres zum Wirkmechanismus des Enzyms herauszufinden, ist es daher zunächst von hoher Bedeutung, die volle Bandbreite der Substanzklassen aller möglichen Substrate von mARC zu identifizieren.

Tabelle 1 zeigt, dass schon zahlreiche *N*-oxygenierte Stoffklassen und Substanzen sowie Arzneistoffe identifiziert wurden, die von dem mARC-Enzymsystem umgesetzt werden.

Tabelle 1: Funktionelle Gruppen mit Beispielen, die durch das *hm*ARC-Enzymsystem umgesetzt werden.

Funktionelle Gruppe	Beispiele	Quelle
Amidoxime	Benzamidoxim, Ximelagatran	(Clement, 2002; Havemeyer et al., 2006)
<i>N</i> - <i>OH</i> -Guanidine	<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-Arginin	(Clement et al., 2005; Kotthaus et al., 2011)
Hydroxamsäuren	Vorinostat, Bufexamac	(Ginsel et al., 2018)
Sulphydroxamsäuren	<i>N</i> -Hydroxy-valdecocib	(Havemeyer et al., 2010)
<i>N</i> - <i>OH</i> -Basenanaloga und Nucleoside	<i>N</i> ⁴ - <i>OH</i> -Cytidin, <i>N</i> ⁴ - <i>OH</i> -Cytosin, <i>N</i> ⁴ - <i>OH</i> -Adenin <i>N</i> ⁴ - <i>OH</i> -Adenosin	(Krompholz et al., 2012)
Oxime	(<i>E</i>)-/(<i>Z</i>)-2,4,6-Trimethylacetophenonoxim	(Jakobs et al., 2014a)
<i>N</i> -Hydroxyamidinohydrazone	Guanoxabenz	(Jakobs et al., 2014a)
<i>N</i> -Oxide	Nicotinamid- <i>N</i> -Oxid, Amitriptylin- <i>N</i> -Oxid Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid	(Jakobs et al., 2014a; Schneider et al., 2018)
Hydroxylamine	Sulfamethoxazol	(Ott et al., 2014)
<i>N</i> -Hydroxycarbamide	Hydroxyharnstoff	(Indorf et al., 2020)
Nitrite	Nitrit	(Sparacino-Watkins et al., 2014b)

Manche enzymatischen Umwandlungen führen zu einer Aktivierung oder zu einer Inaktivierung des jeweiligen Arzneistoffes. Arzneistoffe, die selber unwirksam sind und durch eine enzymatische Umwandlung in ihre Wirkform umgewandelt werden, bezeichnet man als *Prodrugs* (Clement, 2002).

Die Prodrug-Strategie findet beispielsweise bei Arzneistoffen Anwendung, welche bei oraler Einnahme schlecht oder gar nicht bioverfügbar sind. Bei physiologischem pH-

Wert ($7 < \text{pH} < 7,6$) liegen basische Substanzen und somit auch potentielle Wirkstoffe protoniert vor und sind entsprechend hydrophil (siehe Abbildung 7) (Clement, 2002). Für eine orale Absorption muss ein Arzneistoff lipophil vorliegen. Die Lipophilie einer Substanz S lässt sich durch den logarithmierten n -Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten beschreiben (Vraka et al., 2017).

$$\log(P) = \log\left(\frac{[S]_{\text{Octanol}}}{[S]_{\text{H}_2\text{O}}}\right)$$

Nach der *Rule of five* sollte ein Arzneistoff für eine gute orale Applikation lipophil, aber nicht zu lipophil mit einem $\log P < 5$ sein, also die Substanz höchstens 100.000-mal besser in Octanol als in Wasser löslich sein. Außerdem sollten folgende Kriterien für eine gute Absorption zusätzlich in einem Wirkstoff erfüllt sein: Molekulargewicht < 500 , weniger als 5-*H*-Brücken-Donatoren und weniger als 10-*H*-Brücken-Akzeptoren (Lipinski, 2004). In der Arzneistoffentwicklung versucht man, sich an diese Richtwerte zu halten: So kann ein *Prodrug* durch das Erfüllen der *Rule of five* eine gute Bioverfügbarkeit erhalten und durch enzymatische Umwandlungen im Rahmen der Biotransformation in seine Wirkform (*drug*) umgewandelt werden: Ein Amidoxim (z.B. Ximelagatran) liegt bei physiologischem pH-Wert ungeladen vor und kann absorbiert werden. Nach der Absorption wird das Amidoxim in seine Wirkform, das Amidin, reduziert (Melagatran). Ein in der Wirkform vorliegendes Amidium-Ion (Melagatran) würde bei direkter oraler Applikation durch seine positive Ladung die Membran nicht passieren können und ist folglich schlecht bioverfügbar (Clement, 2002; Havemeyer et al., 2011).

Carbonsäureester sind die am häufigsten verwendeten Prodrugs. Diese werden durch Esterasen in ihre aktive Wirkform, den Carbonsäuren, überführt. Beispielsweise sind die meisten ACE-Inhibitoren wie beispielsweise Enalapril Ethylester-Prodrugs (Hajnal et al., 2016).

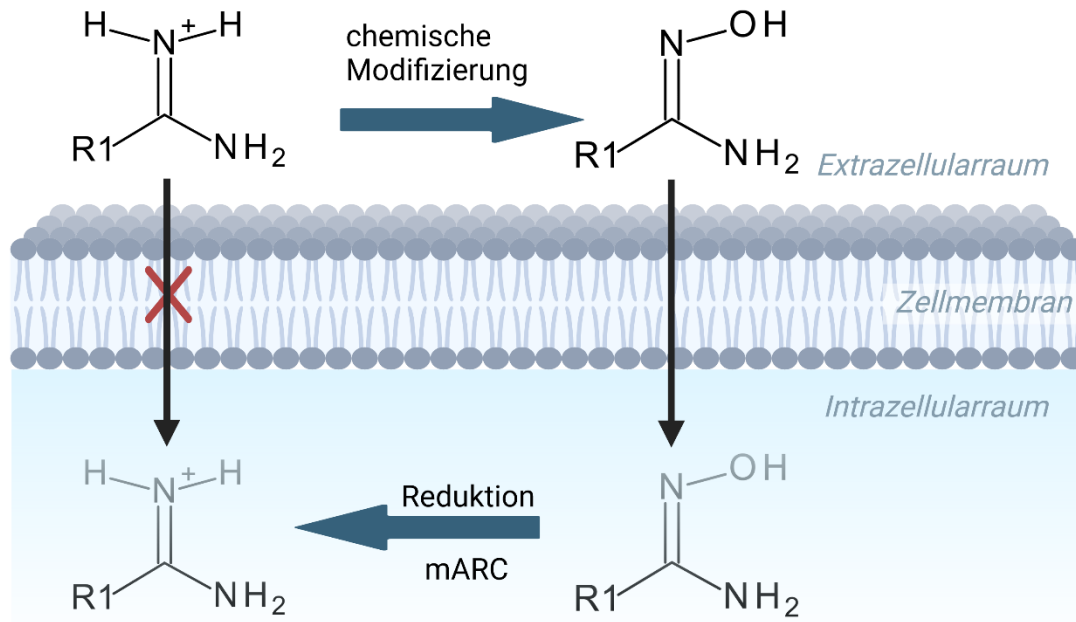


Abbildung 7: Prodrug-Prinzip

Aufgrund der Basizität des Amidins liegt dieses positiv geladen vor und kann die Membran nicht passieren. Dieses ist möglich durch chemische Modifizierung zum Amidoxim. Als ungeladenes Molekül kann dieses die Membran passieren und intrazellulär wieder in seine Wirkform, dem Amidin, durch mARC reduziert werden. (Abbildung erzeugt mit BioRender)

Enzymatische Umwandlungen können allerdings auch zu einer Toxifizierung oder zu einer Detoxifizierung führen. Trimethylamin-*N*-Oxid wird mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert. Eine Reduktion zu Trimethylamin führt somit zu einer Senkung dieses Risikos (Schneider et al., 2018). Das mARC-Enzymsystem kann aber auch an Toxifizierungsreaktionen beteiligt sein. Pyrrolizidinalkaloide (wie zum Beispiel Senecivernin-*N*-Oxid) liegen natürlicherweise als *N*-Oxid in der Pflanze vor. Eine Reduktion der Pyrrolizidinalkaloide führt zu einer Toxifizierung, da die reduzierte Form mit Leberschäden assoziiert ist (Indorf et al., 2020).

1.3.6 Nitratreduktase

Alle Nitratreduktasen (NR) haben gemeinsam, dass sie die Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu Nitrit (NO_2^-) katalysieren. Dennoch werden diese nach Taxonomie, Funktion, Position in der Zelle, Struktur und dem Endprodukt des von ihnen eingeleiteten Prozesses unterschieden (Stolz and Basu, 2002).

Es gibt eukaryotische und prokaryotische NR. Diese Unterscheidung auf taxonomischer Ebene geht mit einigen strukturellen Unterschieden einher: Während die eukaryotischen NR zu den mononukleären Enzymen der Sulfitoxidase-Familie gezählt werden (siehe Abbildung 5), werden die prokaryotischen NR der DMSO-Reduktase-Familie zugeordnet und enthalten einen Eisen-Schwefel-Molybdän-Cluster und einen Bis-Pterin-Cofaktor mit einer Guanin Dinukleotid (BIS-MGD) Koordination (Stolz and Basu, 2002; Moura et al., 2004).

Eukaryotische NR können aus Pflanzen und Pilzen isoliert werden. Obwohl die NR, wie Abbildung 5 zeigt, die gleichen Cofaktoren enthält, welche auch das mARC-Enzymsystem besitzt, ist eine Isolierung aus Tieren hingegen nicht möglich, da diese kein Gen für eine NR besitzen (Sparacino-Watkins et al., 2014a).

Es wird angenommen, dass die Elektronen von NADH/NADPH auf FAD übertragen werden und von dort durch Cytochrom b zum aktiven Zentrum gelangen. Die prokaryotischen NR sind hingegen anders aufgebaut. Beispielsweise enthält bakterielle NR den Molybdän-Kofaktor zusammen mit einem Eisen-/Schwefel-Cluster ([2Fe-2S]). Im Gegensatz zum eukaryotischen NR enthält die aktive Untereinheit in Prokaryoten jedoch kein Häm oder FAD (Stolz and Basu, 2002).

In Pflanzen trägt die Nitratreduktase zur Stickstoffassimilation bei (Liu et al., 2022). In Bakterien hingegen unterscheidet man in 3 verschiedene Typen: der periplasmatischen, der respiratorischen und der assimilatorischen Nitratreduktase (González et al., 2006) .

Das von der NR gebildete Nitrit wird überwiegend von der Nitritreduktase zu Ammoniumionen (NH_4^+) reduziert (Liu et al., 2022). Eine Reduktion zu Stickstoffmonoxid (NO) ist zudem auch möglich. Die NR (NADPH NR) ist aber auch in geringem Umfang selbst in der Lage, Nitrit zu NO zu reduzieren (Durner and Klessig, 1999; Mendel and Kruse, 2012), wohingegen im Menschen die NO-Generierung durch die NO-Synthase aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff wesentlich ist (Daff, 2010). Bei Tieren können NO mit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zusammenwirken, indem sie Apoptose auslösen oder Krankheitserreger abtöten. Dazu reagieren beispielsweise NO und Superoxid (O_2^-) zu Peroxynitrit (ONOO^-), welches die Pathogene abtöten kann (Durner and Klessig, 1999).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Da die genaue physiologische Funktion und auch das physiologische Substrat nach aktuellem Kenntnisstand noch immer unentdeckt sind, gewinnt deren Identifizierung vor allem im Hinblick auf die oben beschriebenen Einflüsse auf den Energiestoffwechsel und der Ausbildung von Lebererkrankungen immer mehr an Bedeutung. Daher war es Ziel dieser Arbeit, einen Assay zu entwickeln bzw. die bestehenden so zu optimieren, dass potentielle Substrate und Inhibitoren von mARC im hohem Durchsatz detektiert und kinetisch charakterisiert werden können.

Mit Hilfe des neu entwickelten, hochempfindlichen und schnell durchführbaren Fluoreszenzassays sollte zudem ein aufgrund quantenmechanischer Betrachtungen vorhergesagtes Phänomen näher untersucht werden. Hier geht es um geringe Unterschiede in den Umsetzungsraten von Molekülen mit 3-facher Symmetrie. Ziel der Arbeit war es daher, zu prüfen, ob der postulierte masseunabhängige Isotopenunterschied zwischen dem nicht isotopenmarkiertem ^{12}C -TMAO und den isotopenmarkierten TMAO-Derivaten ($1\times^{13}\text{C}$ -TMAO, $2\times^{13}\text{C}$ -TMAO, ^{13}C -TMAO) bei der Reduktion von TMAO zu TMA detektiert werden kann.

2 Fluoreszenzbasierter Assay

2.1 Einleitung

Dieses Kapitel wurde in Analytical Chemistry publiziert:

Cathrin Klopp, Michel A Struwe, Christoph Plieth, Bernd Clement, Axel J Scheidig,
New Design of an Activity Assay Suitable for High-Throughput Screening of
Substrates and Inhibitors of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component
(mARC), <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02109>

Seit der Entdeckung von mARC im Jahr 2006 erfolgten die Aktivitätsmessungen der mARC-katalysierten Reaktion mittels HPLC (Havemeyer et al., 2006). Die ursprüngliche Methode wurde mehrfach optimiert, sodass eine gut validierte Methode etabliert wurde. Diese lieferte insbesondere den Vorteil, dass Produkte und Edukte sowohl identifiziert als auch quantifiziert werden konnten (Kotthaus et al., 2011; Ginsel et al., 2018). Trotzdem resultieren erhebliche Nachteile aus der Methode, indem die Reaktion nicht im zeitlichen Verlauf verfolgt werden kann. Für die Messung der Aktivitäten ist es notwendig, mehrere Proben anzusetzen und diese zu verschiedenen Zeitpunkten abzustoppen, um die Reaktion im zeitlichen Verlauf abzubilden. Die zahlreichen Ansätze für eine Reaktion und das ohnehin schon sehr große Reaktionsvolumen gehen mit einem sehr hohen Zeit- und Materialaufwand einher.

Die Betrachtung der Reaktion im zeitlichen Verlauf wurde erstmals durch einen photometrischen Assay von Indorf *et al.* etabliert (Indorf et al., 2020). Mit der Durchführung in Küvetten bleibt weiterhin der Zeit- und Materialaufwand relativ hoch. Aufgrund dieses Aspektes sollte vor allem die Verwendung rekombinanter Proteine in Grenzen gehalten werden. Daher war es Ziel dieser Arbeit, einen Assay im Mikrotiterplattenformat zu entwickeln. Analog zu dem Assay von Indorf *et al.* erfolgt die Aktivitätsmessung über den Verbrauch von NADH. Folglich war der Assay auch limitiert für Substrate, die bei 340 nm absorbieren. Der neue fluoreszenzbasierte Assay bietet darüber hinaus die Vorteile, dass Material und insbesondere Zeit eingespart werden können, da mehrere Messungen zeitgleich erfolgen. Zudem konnte die eingesetzte Menge auf 6,5 µg hmARC1 pro Datenpunkt reduziert werden, während in dem Assay von Indorf *et al.* 15 µg hmARC1 und in der HPLC-Methode sogar 100 µg hmARC1 benötigt wurden (Gruenewald et al., 2008; Indorf et al., 2020).

Zeitgleich wurde mit der Entwicklung des Assay das Substrat/BAO-Ratio etabliert. Mit dem Standardsubstrat Benzamidoxim erfolgte die Entdeckung von mARC und seitdem wurde dieses mit jeder Methode zur Bestimmung der Enzymaktivitäten vermessen. Daher wird bei dem fluoreszenzbasierten Assay BAO stets mit vermessen und die Umsetzungsraten der Substrate auf BAO bezogen. Denn die Enzymaktivitäten schwanken stark in Abhängigkeit von der Charge, der Lagerung und insbesondere von den Einfrier-Auftauzyklen. Durch das Einführen des Substrat/BAO-Ratios können diese Unterschiede normalisiert werden und zudem verschiedene Substrate miteinander verglichen werden. Die Durchführung im Mikrotiterplattenformat bietet erstmals eine Aktivitätsbestimmung im hohen Durchsatz, welches vor allem im Hinblick auf die Entdeckung des physiologischen Substrats essentiell ist.

Darüber hinaus ist dieses Verfahren auch auf Gewebehomogenate anwendbar (Daten nicht gezeigt).

2.2 Publikation

New Design of an Activity Assay Suitable for High-Throughput Screening of Substrates and Inhibitors of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC)

Cathrin Klopp, Michel A. Struwe, Christoph Plieth, Bernd Clement,* and Axel J. Scheidig*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02109>

Read Online

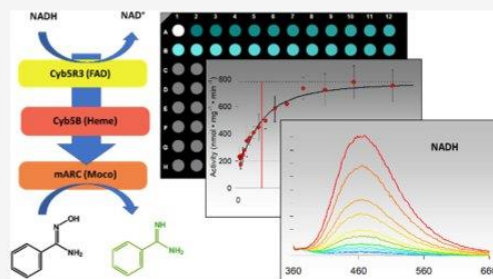
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC) is one of the simplest molybdenum-containing enzymes. mARC is among a few known reducing enzymes playing an important role in drug metabolism in mammals. Here, an assay based on the fluorescence of NADH is reported for the rapid detection of substrates and potential inhibitors of mARC. So far unknown inhibitors might be useful for the development of drugs assigned to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and similar diseases. Kinetics of reactions catalyzed by mARC can be recorded with high sensitivity and precision. On a microtiter plate scale, the assay presented could be applied for high-throughput screening of substance libraries and detection of novel mARC substrate candidates. For instance, molnupiravir was also identified as a new substrate by this assay. For better comparison for such substances, the inhibitor or substrate-to-BAO ratio was introduced. After normalization of enzyme activities to the standard benzamidoxime, substrates can reproducibly be classified.



■ INTRODUCTION

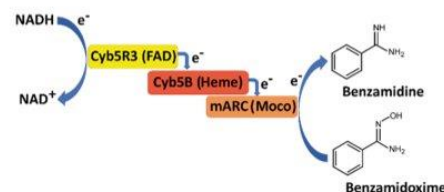
In vitro studies are essential in drug development to be able to characterize drug candidates regarding their efficacy, potential drug–drug interactions, dosing problems, as well as activation or inactivation by biotransformation reactions.¹

Biotransformation generally refers to the chemical conversion of substances by living organisms or enzyme preparations.² According to IUPAC “in medicinal chemistry, the term metabolism refers to the biotransformation of xenobiotics and particularly drugs”.² Biotransformation can facilitate the excretion of hydrophobic compounds by converting them into more water-soluble derivatives so that they can be excreted from the body. Biotransformation is divided in three phases: Phase I is functionalization, during which usually polar groups are incorporated into the substance so that it can be modified further in phase II.³ The most important enzymes which catalyze these modifications are redox enzymes and hydrolases.³ In phase I, oxidation is most commonly catalyzed by cytochrome P450 enzymes.⁴ These transformations can lead to both activation (e.g., tamoxifen) and inactivation of drug substances.⁵ Enzymes catalyzing the reduction of such metabolites are less prominent.⁶ For example, various dehydrogenases, e.g., carbonyl reductase can act as reductases under certain conditions.⁷ The toolbox of reducing biotransformation enzymes was expanded in 2006 through the discovery of the mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC) by Havemeyer et al.⁸ The mARC enzyme was identified during the search for reductive

activity toward *N*-hydroxylated compounds like benzamidoxime (BAO).⁸ *N*-hydroxylated compounds are frequently produced in vivo through (biotransformation) oxidation (e.g., pentamidine) and can be used as (pro)drugs (e.g., Ximelagatran).⁹

As shown in Scheme 1 the *N*-reducing enzyme system consists of three components, mARC, cytochrome b5B (Cyb5B), and cytochrome b5 reductase 3 (Cyb5R3).⁸ In

Scheme 1. Schematic Illustration of the Reduction Catalyzed by the mARC-Enzyme System for the Example of Benzamidoxime



Received: May 15, 2023

Accepted: July 26, 2023

mammals, two highly conserved paralogs of mARC are known. The *MTARC1* and *MTARC2* genes encode for the mARC-1 and mARC-2 proteins, respectively.⁶ The mARC enzyme system is localized at the outer mitochondrial membrane and reduces not only amidoximes but also *N*-hydroxyguanidines, hydroxamic acids, sulphydroxamic acids, *N*-oxides, hydroxylamines, and *N*-hydroxycarbamides.^{6,8,10,11} In this respect, mARC can act as a counterpart of cytochrome P450 and the flavin-containing monooxygenases by retro-reduction of oxygenated compounds. *N*-oxygenated compounds are often toxic or mutagenic, meaning that mARC performs detoxification (e.g., *N*-hydroxylated nucleobase analogues formed by reactive oxygen species). Or in other cases, it may catalyze toxification (e.g., the reduction of trimethylamine *N*-oxide to trimethylamine).^{8,10,12–17}

Within a drug discovery pipeline, the impact of biotransformation enzymes must be considered very early on. It is highly advisable to consider as many potential biotransformation pathways as possible. In addition, it is recommended to perform thorough in vitro studies using recombinant proteins before time- and cost-intensive in vivo studies are conducted.¹

The enzymatic characterization by mARC was initially studied using a method described by Clement et al. using time-consuming HPLC protocols for analysis of substrate and reduced product.^{8,18} This method was further optimized by Kotthaus et al. and Krompholz et al.^{11,16,18} An assay based on cyclic voltammetry with a mARC immobilized to an electrode surface was developed to be able to detect mARC catalyzed reduction without requiring the electron delivery component Cyb5R3 or even Cyb5B.^{19,20} A significant improvement for screening and kinetic characterization was introduced by Indorf et al., establishing a UV–vis spectroscopic method for the determination of mARC activity.⁶ It was shown that reduction of *N*-oxygenated substrates by mARC enzymes can be monitored in real time through the decrease of NADH absorbance (A_{340}). In these protocols (HPLC and NADH absorbance), the optimal stoichiometry of the proteins for well reduced substances was established. Plitzko et al. postulated an optimal ratio for the electron delivering system of Cyb5B: Cyb5R3 of 10:1.²¹ Regarding the amount of mARC enzymes, ratios from equimolar to 3-fold lower amount of Cyb5B-Cyb5R3 relative to mARC were used.^{6,22}

The mARC enzyme system not only plays a role in drug metabolism but may also have an impact on diseases: in the last years, genome-wide association studies have demonstrated that mutations in the *MTARC1* gene are related to protective effects against nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).^{23–25} Despite the fact that various endogenous and exogenous substances are reduced by mARC, the physiological role of mARC with respect to NAFLD still remains unclear. However, inhibitors of mARC may be useful in the treatment of NAFLD.²⁴ In this context, the development of a simple high-throughput screening protocol is necessary to identify previously unknown inhibitors, particularly of mARC-1, as shown by the influence of DMSO in Supporting Information Figure S13.

The participation of mARC in drug metabolism and its poorly understood role in fatty liver diseases underline the need for an even faster and more efficient enzymatic assay suitable for screening of large libraries of substances in a high-throughput format. Such an assay would accelerate the search for new substrates and inhibitors, allowing comprehensive insight into the (natural) substrate spectrum of mARC.

Here, we present a fluorescence-based NADH assay that has been developed to measure the mARC-catalyzed transformation in a 96-well microtiter plate. With the presented assay in a high-throughput format, either many substrates can be measured simultaneously or kinetics of individual substrates can be recorded.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Unless otherwise described, materials were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO) or Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany). Molnupiravir (Merck Sharp & Dohme) was purchased from Biomol GmbH (Hamburg, Germany). Water was purified using the in-house ultra-pure system PURELABflex 1 (Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Berlin).

Fluorescence Assay. The change in NADH fluorescence ($\lambda_{ex} = 340$ nm; $\lambda_{em} = 365$ nm) was monitored with a TECAN Infinite 200 M Pro plate reader. If not otherwise stated, the reaction volume was 50 μ L in black 96-well microtiter plates (Greiner Bio-One, #655209). Assays contained 193 pmol (= 6.5 μ g) *hmARC*-1 or 191 pmol (= 6.5 μ g) *hmARC*-2, 65 pmol *hCyb5B* (heme), 6.5 pmol *hCyb5R3* (FAD), 0.2 mM of NADH in each well and the substrate to be tested in 20 mM MES buffer, pH 6.0. Substrate concentrations are specified in the results section. For examining substances poorly soluble in water, the addition of 4% DMSO (v/v) of the final assay volume was required. Higher amounts of DMSO have inhibitory effects on *hmARC*.⁶ The reaction mixtures containing all components except *hCyb5R3* were preincubated at 37 °C for 3 min. The reactions were started by adding *hCyb5R3* using a multichannel pipette, and NADH fluorescence was recorded for 15 min at 37 °C. In order to provide homogeneous mixing, the plate shaker function of the plate reader was used at the beginning of the preincubation and before the measurement. BAO reduction was always measured in parallel as a reference substrate. In addition, an NADH calibration series was included on each microtiter plate in 40 μ M steps to allow calculation of enzyme activities.

For *hmARC*-1 and *hmARC*-2 kinetics with BAO as the substrate, the total volume was increased to 75 μ L. First, a master mix consisting of 289.5 pmol (9.75 μ g) *hmARC*-1 or 286.5 pmol (= 9.75 μ g) *hmARC*-2, 97.5 pmol *hCyb5B* (heme), and 75 nmol NADH in 20 mM MES buffer pH 6 per well was prepared. Kinetics were established using serial dilution series with a dilution factor of 0.75. After brief shaking, the plate was preincubated for 3 min. The reaction was started using a stepper pipette with 9.75 pmol *hCyb5R3* (FAD). After shaking again, fluorescence was monitored for 5 min.

Data Processing. All assays were measured as triplicates. Initially, the established ratios for *hmARC*, *hCyb5B*, and *hCyb5R3* (x:1:0.1) were adopted. In all data related to the amount of protein, reference is made exclusively to the amount of *hmARC* used, since *hmARC* ultimately performs the analyzed reaction. Low background consumption of NADH by *hCyb5B* and *hCyb5R3* alone were observed in control reactions and corrected accordingly. In addition, a triplicate negative control without *hmARC*, but containing only *hCyb5B* and *hCyb5R3* was always performed. The conversion rates were calculated from the fluorescence intensity decay corrected by the negative control slope (Figure 1). The decay of the NADH fluorescence was deduced from the corrected fluorescence curve taking into account the inner filter effect of NADH at higher concentrations (Supplementary Informa-

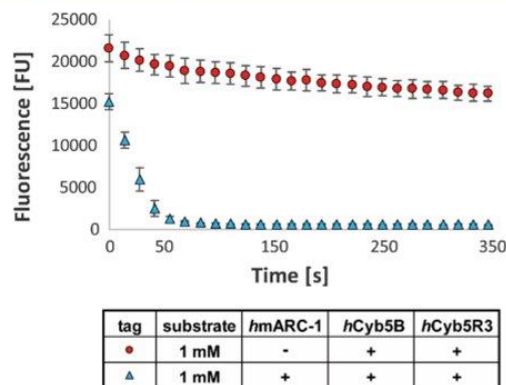


Figure 1. Fluorescence time diagram showing the decrease of NADH-fluorescence due to the enzymatic conversion of 1 mM benzamidoxime by hmARC-1. The control experiment does not contain hmARC-1. The assay conditions were as specified in the Experimental section. Fluorescence readings are mean \pm standard deviation of three independent measurements.

tion, Figure S16). The resulting activity was related to the used amount of hmARC-protein. Curve fitting was performed using standard functions of Origin (OriginLab Corporation Northampton, MA, USA) and Excel 2019 (Microsoft, Inc.).

Protein Source. Recombinant soluble hmARC-1, hmARC-2, hCyb5B, and hCyb5R3 were expressed in *Escherichia coli* and purified by column chromatography (metal-chelate affinity and size exclusion) essentially as described previously by Wahl et al.¹³ Protein concentrations were determined using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher #23225) with bovine serum albumin as a standard. The heme content was determined according to the method of Estabrook and Werringloer by recording a difference spectrum from the oxidized and reduced forms of the cofactor.²⁶ FAD content

determination was performed using a calibration line according to Whitby.²⁷

RESULTS AND DISCUSSION

The NADH fluorescence assay was developed on the one hand to detect substrates for the mARC enzyme system in the high-throughput format and on the other hand to allow time-efficient kinetic characterization of substrates or inhibitors. The discovery of the mARC enzyme system was based on the reduction of benzamidoxime (BAO). Since then, this substrate has served as a reference substrate.⁸ Analogous to the absorption-based assay of Indorf et al., the consumption of NADH is monitored over time. In this assay, the measurement is made by the fluorescence of NADH.⁶

Figures 1 and S1 show that for both paralogues hmARC-1 and hmARC-2, the consumption of NADH is much higher compared to the negative control lacking hmARC but still containing hCyb5B and hCyb5R3. The enzyme activity is calculated as follows: the slope of the control reaction without hmARC is subtracted from the slope of the complete reaction. The resulting calculated enzyme activity is thus related to the amount of NADH consumed by the delivery of its electrons to hmARC.

Of note, the enzyme activities also vary depending on the method used: for example, an activity for hmARC-1 of 34.3 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ is given for the standard substrate benzamidoxime by Kotthaus et al.¹¹ In comparison, Krompholz et al. give an enzyme activity of 159.4 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ and Indorf et al. of 499.8 nmol·mg⁻¹·min⁻¹.¹⁶

Optimization of the presented fluorescence assay also revealed fluctuations in the activity assay due to variations within the protocol for expression and purification, variations of saturation with the Mo-ion of the Moco-cofactor and the number of freeze–thaw cycles of the enzymes. Furthermore, the stoichiometric ratio between the three components mARC: Cyb5B: Cyb5R3 varied. For example, Plitzko et al. and Schneider et al. used a ratio of 1:1:0.1, albeit in different

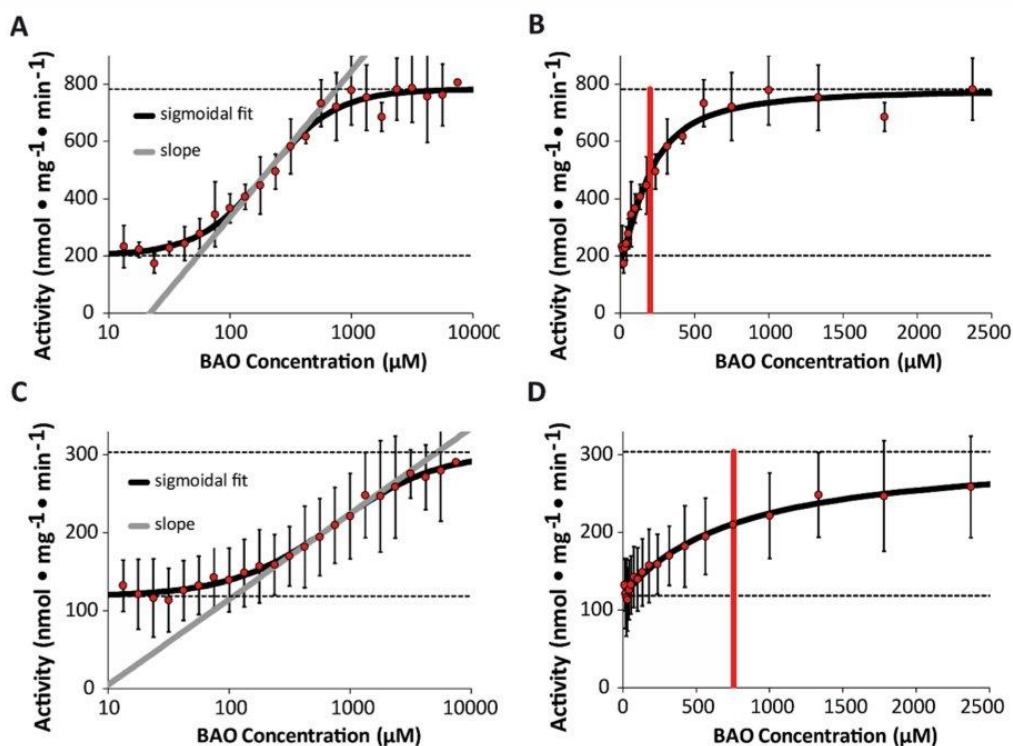
Table 1. Activities of hmARC Enzymes Obtained with Different Substrates and Normalized by the Corresponding BAO-Derived Activity^a

substrate ^b	hmARC-paralogue	concentration [mM]	activity [nmol·mg ⁻¹ min ⁻¹]	BAO-activity [nmol·mg ⁻¹ min ⁻¹]	substrate/BAO-ratio
BAO ⁸	1	1	890 \pm 45	890	1.000
	2	1	400 \pm 40	400	1.000
nicotinamide- <i>N</i> -oxide ³¹	1	3	350 \pm 5	775	0.447
	1	2	250 \pm 10	645	0.393
	1	1	230 \pm 25		0.356
	1	0.8	180 \pm 15		0.282
benzhydroxamic acid ²²	1	1	170 \pm 25	910	0.189
	1	2	200 \pm 35		0.218
	1	3	130 \pm 15	615	0.208
	2	1	150 \pm 10	580	0.262
<i>N</i> ^ω -hydroxy-L-arginine ¹¹	1	1	870 \pm 10	665	1.308
	2	1	315 \pm 10	525	0.598
<i>N</i> ^ω -hydroxy-nor-L-arginine ¹¹	1	1	400 \pm 5	380	1.051
molnupiravir	1	1	240 \pm 100	290	0.839
<i>N</i> ⁴ -Hydroxy-cytidin ¹⁶	1	1	205 \pm 5		0.710
trimethylamine- <i>N</i> -oxide ¹⁷	1	50	135 \pm 15	330	0.404
	1	500	310 \pm 30	465	0.666

^aAll other assay conditions were as specified in the experimental section. Average values are means \pm standard deviation of three independent measurements. ^bReference to the first publication of the respective substrate characterization is given.

Table 2. Michaelis–Menten Parameters of Model Substances of *hmARC-1* and *hmARC-2* Obtained by Assays as Described in the Experimental Section^a

substrate	<i>hmARC</i> -paralogue	K_M [mM]	V_{max} [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ ·M ⁻¹]
benzamidoxime (BAO)	1	0.20 ± 0.05	580 ± 6	17.9	9.0 × 10 ⁴
	2	0.89 ± 0.34	185 ± 5	5.7	6.4 × 10 ³
nicotinamide- <i>N</i> -oxide	1	0.47 ± 0.13	400 ± 30	8.3	1.7 × 10 ⁴
benzhydroxamic acid	1	0.91 ± 0.05	230 ± 10	4.8	5.2 × 10 ³

^aAverage values are means ± standard deviation of three independent measurements.**Figure 2.** Michaelis–Menten saturation curves for the reduction of BAO by *hmARC-1* (A and B) and *hmARC-2* (C and D). Readings are means ± standard deviation of at least four independent measurements. The two horizontal dashed lines represent the upper and lower asymptote as derived from the sigmoidal fit. The lower asymptote represents the background activity without *hmARC* enzymes. The panels B and D represent the same data sets as shown in panels A and C, respectively, but with a linear *x*-axis scaling. Derived values are $K_M = 0.202$ mM, $V_{max} = 580$ nmol·mg⁻¹·min⁻¹, $R^2 = 0.984$ (*hmARC-1*) and $K_M = 0.756$ mM, $V_{max} = 185$ nmol·mg⁻¹·min⁻¹, $R^2 = 0.992$ (*hmARC-2*), respectively. For these experiments, an assay volume of 75 μ L was used.

final volumes.^{17,21} The HPLC studies of Ginsel et al. were performed with an enzyme mixture composed of 7.5 μ g of *hmARC* (equals to 224 pmol), 75 pmol *hCyb5B*, and 7.5 pmol *hCyb5R3*, giving a ratio of 3:1:0.1.²² The NADH-based UV/vis-assay introduced by Indorf et al. used the same protocol as Ginsel et al.^{6,22}

The exact amounts used are not only crucial for an optimal read-out of the assay but also for the calculation of the kinetic values. In the current presentation, we refer the values to the amount of the mARC enzyme alone (under given stoichiometric ratio). It should be mentioned that under the used ratio of 3:1:0.1 mARC is not saturated with its electron partners. Increasing the concentration of *Cyb5B* and *Cyb5R3* leads to higher conversion rates (Supporting Information, Figure S2). However, using the ratio of 3:1:0.1, the side reactions catalyzed

by *Cyb5R3* alone are significantly reduced and the evaluation is easier facilitated.²¹

To overcome these limitations for comparing various protein batches and larger substance libraries, we introduce the “substrate-to-BAO-ratio” value. Accordingly, the conversion of the standard substrate BAO was monitored in parallel within the same 96-well microtiter plate. Low mARC enzyme activities with poorly converted substrates could only be detected when the related BAO standard control reaction displayed a reasonably high activity of the enzyme system. In those cases, an increase of the concentration of *Cyb5B* and *Cyb5R3* to equimolar is advisable.

The comparison of different substrates is based on the normalization of the substrate activity toward BAO conversion. For that, the mARC-activity obtained with any substrate is

D

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02109>
Anal. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

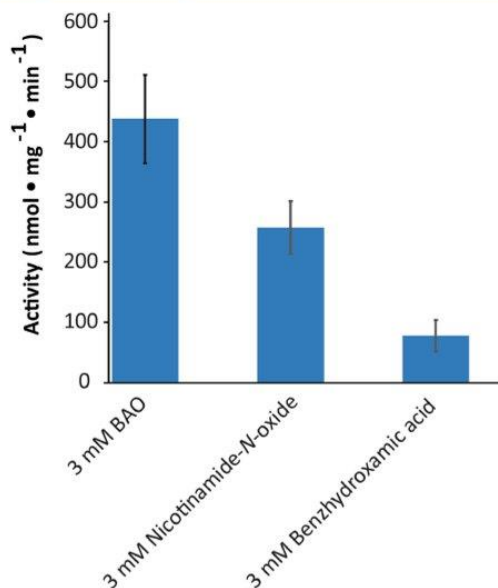


Figure 3. Screening diverse substrates with regard to their ability to evoke *hmARC*-1 activity. The assay conditions were as specified in the Experimental section. Readings are means \pm standard deviation of three independent measurements.

divided by the control activity obtained in parallel with BAO. The resulting ratio is used for classification of the substrate. Thus, variations in *mARC* performance is canceled out. This “substrate-to-BAO-ratio” allows a direct and quantitative comparison of different substrates with each other and with regard to their ability to generate electron transfer in the *mARC* enzyme system. Table 1 displays *hmARC* activities obtained with different substrates (4th column) together with their BAO-derived control activity (5th column) and the corresponding ratio (6th column). From all substrates, the corresponding fluorescence measurements over time can be found in the Supporting Information (Figures S1, S3–S11).

As an example, we tested the potential SARS-CoV2-virustaticum molnupiravir (Lagevrio). Molnupiravir is a prodrug.²⁸ Through an ester cleavage, it is converted into the active form *N*⁴-hydroxy-cytidine.²⁹ This compound had already been identified as a substrate for *hmARC* in our laboratory previously.¹⁶ Both substances are hydroxylamines and thus are potential *hmARC*-1 substrates. The *hmARC* activity obtained with molnupiravir is low (243 nmol•mg⁻¹•min⁻¹). However, the corresponding BAO control activity of 289.2 nmol•mg⁻¹•min⁻¹ in this experiment was low as well and leads to a molnupiravir/BAO ratio of 0.8. To verify this observation, the conversion was analyzed as well with the method established by Indorf et al.⁶ Using a more active *hmARC*-1 protein aliquot, the same molnupiravir/BAO ratio of 0.8 was obtained (Supporting Information, Figure S12). This confirms molnupiravir as a newly identified *hmARC*-1-substrate and the valuable importance of the “substrate-to-BAO-ratio” as a comparative value. The detection of molnupiravir as a substrate of *hmARC*-1 confirms its reductive metabolism, which has not been previously studied.³⁰

Of note, not only “good” substrates (equally well converted as BAO) can be measured with this assay. For example,

nicotinamide-*N*-oxide produces an enzyme activity of *hmARC*-1 corresponding to 42% activity as obtained with BAO at concentrations of 3 mM according to Indorf et al. and is therefore classified as an “intermediate” substrate.⁶ Table 1 shows that the fluorescence-based NADH assay achieves similar results and works at even lower substrate concentrations of around 1 mM. The corresponding data are displayed in Figure S3.

According to Ginsel et al. benzhydroxamic acid is also a substrate that is poorly converted by the *mARC* enzyme system.²² However, the assay design proposed here allows to detect *mARC* activity even for “poor” substrates. Nevertheless, for good linear kinetics, concentrations above 1 mM are preferable in case of poor metabolized substrates (Table 1 and Supporting Information, Figures S4 and S5).

Trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) has already been tested by Schneider et al. For quantification, derivatization of the reaction product trimethylamine was necessary, followed by HPLC-MS.¹⁷ TMAO can be identified as a substrate of *hmARC*-1 using the NADH-fluorescence assay, although very high concentrations are required for linear kinetics (Table 1). Kinetic data with TMAO at concentrations of 50 mM and 500 mM are presented in the Supporting Information, Figures S10 and S11.

The assay is not suitable for substances with fluorescence properties similar to those of NADH. For these, an HPLC-MS analysis as described by Ginsel et al. or the voltammetry based assay as described by Zapiter et al. would be more appropriate.^{19,22} Both methods are useful for detecting novel substrates for the *mARC* enzyme system. Neither method is suitable for high throughput, but they are valuable methods for verifying turnover. While the method of Zapiter et al. provide substrate detection without Cyb5B and Cyb5R3, the assay of Ginsel et al. allows identification of reaction products by MS. We could verify that this three-component system does not run with NADPH as the electron donor (Supporting Information, Figure S14), although NADPH exhibits fluorescence like NADH. Light-sensitivity and poor solubility of substrates are other properties which limit their use with the protocol proposed here. Poorly soluble substrates could be solubilized by DMSO. However, it should be noted that DMSO concentrations above 5% inhibit the catalytic activity of *hmARC*.⁶ When measured in the presence of 4% DMSO in the final preparation, the *hmARC* enzyme system remains active (Supporting Information, Figure S13). This also demonstrates the suitability of the method to find inhibitors of *mARC*.

Furthermore, Michaelis–Menten kinetics were recorded from benzamidoxime, nicotinamide *N*-oxide, and benzhydroxamic acid (Table 2, Figure 2). The reduction of BAO by *hmARC*-1 results in the lowest *K*_M-value of 0.20 mM followed by nicotinamide-*N*-oxide with 0.47 mM and benzhydroxamic acid with 0.91 mM. Figure 3 provides an overview of these *hmARC*-1 substrates at fixed concentrations measured on one plate. It is therefore clear that enzyme activity with benzhydroxamic acid at a concentration of 3 mM is significantly lower than that with nicotinamide-*N*-oxide or benzamidoxime at the same concentrations.

Of note, at higher concentrations, *hmARC*-2 kinetics show a minor indication of product inhibition (Supporting Information, Figure S15). In this respect, the determined *K*_M values have to be considered as apparent values as long as a thorough kinetic characterization has not been performed.

Nicotinamide-*N*-oxide and *N*^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA), which have already been studied by Kotthaus et al. and Jakobs et al. represent further *hm*ARC-1 substrates.^{11,15} The presented assay can help identify new substrates for *m*ARC which could serve as potential biomarkers for *m*ARC-related diseases.^{32,33} The advantages of the presented assay are, first, that colored substances can be analyzed and, second, the execution in a 96-well-format for efficient data collection as well as third the usage of the reduction of BAO as a reference within the same data collection.

Furthermore, the fluorescence-based microtiter plate assay requires sample volumes of 50 to 75 μ L instead of 300 μ L for cuvettes in the absorption-based assay. Thus, the plate reader assay not only saves time but also material, i.e., precious recombinant protein. In addition, the presented fluorescence-based assay provides higher sensitivity in comparison to the UV-vis-based absorption assay due to its lower background.

CONCLUSIONS

The presented new assay-design in the 96-well microtiter plate format can be performed in a very convenient format, enabling true high-throughput applications for the first time. Due to its increased sensitivity compared to absorption-based assays, it is advantageous for poorly converted substrates. It allows the screening of even large substance libraries to unveil novel *m*ARC substrates such as molnupiravir and, potentially, inhibitors of *m*ARC in future studies.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.3c02109>.

Fluorescence time diagrams for various substrates; reaction conditions and *hm*ARC paralogs; verification of the substrate-to-BAO ratio on the basis of molnupiravir; product inhibition of *hm*ARC-2 by benzamidine; and calibration curve for the fluorescence of NADH (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Bernd Clement – Pharmaceutical Institute – Medicinal Chemistry, Kiel University, 24118 Kiel, Germany; orcid.org/0000-0003-1412-6117; Email: bclement@pharmazie.uni-kiel.de

Axel J. Scheidig – Zoological Institute – Structural Biology, Kiel University, 24118 Kiel, Germany; orcid.org/0000-0002-2382-8818; Email: axel.scheidig@strubio.uni-kiel.de

Authors

Cathrin Klopp – Pharmaceutical Institute – Medicinal Chemistry, Kiel University, 24118 Kiel, Germany; Zoological Institute – Structural Biology, Kiel University, 24118 Kiel, Germany

Michel A. Struwe – Pharmaceutical Institute – Medicinal Chemistry, Kiel University, 24118 Kiel, Germany; Zoological Institute – Structural Biology, Kiel University, 24118 Kiel, Germany

Christoph Plieth – Centre for Biochemistry and Molecular Biology, Kiel University, 24118 Kiel, Germany

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.3c02109>

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

M.S. acknowledges financial support by the German Academic Scholarship Foundation and the Joachim Herz Foundation.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Brigitte Bittner for the excellent support in the enzyme expression and purification.

ABBREVIATIONS

<i>hm</i> ARC	human mitochondrial amidoxime reducing component
Cyb5B	cytochrome b5
Cyb5R3	cytochrome b5 reductase 3
BAO	benzamidoxime
TMAO	trimethylamine <i>N</i> -oxide
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NOHA	<i>N</i> ^ω -hydroxy-L-arginine

REFERENCES

- (1) Shanu-Wilson, J.; Evans, L.; Wrigley, S.; Steele, J.; Atherton, J.; Boer, J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 2087.
- (2) Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129.
- (3) Phang-Lyn, S.; Llerena, V. A., Eds.; StatPearls [Internet]; StatPearls Publishing, 2022.
- (4) Kebamo, S.; Tesema, S. J. *Drug Metab. Toxicol.* **2015**, *6*, 5.
- (5) Huttunen, K. M.; Mähönen, N.; Raunio, H.; Rautio, J. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2346.
- (6) Indorf, P.; Kubitz, A. J.; Scheidig, A. J.; Kunze, T.; Clement, B. J. *Med. Chem.* **2020**, *63*, 6538.
- (7) Oppermann, U. C.; Maser, E. *Toxicology* **2000**, *144*, 71.
- (8) Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B. J. *Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34796.
- (9) Clement, B.; Lopian, K. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *1*, 487.
- (10) Froriep, D.; Clement, B.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Reichmann, D.; Schmalix, W.; Havemeyer, A. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 2013.
- (11) Kotthaus, J.; Wahl, B.; Havemeyer, A.; Kotthaus, J.; Schade, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R.; Bittner, F.; Clement, B. *Biochem. J.* **2011**, *433*, 383.
- (12) Gruenewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Scherwing, U.; Mendel, R. R.; Clement, B. J. *Med. Chem.* **2008**, *51*, 8173.
- (13) Wahl, B.; Reichmann, D.; Niks, D.; Krompholz, N.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Messerschmidt, T.; Rothkegel, M.; Biester, H.; Hille, R.; Mendel, R. R.; Bittner, F. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37847.
- (14) Ott, G.; Havemeyer, A.; Clement, B. J. *Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 265.
- (15) Jakobs, H. H.; Mikula, M.; Havemeyer, A.; Strzalkowska, A.; Borowa-Chmielak, M.; Dzwonek, A.; Gajewska, M.; Hennig, E. E.; Ostrowski, J.; Clement, B. *PLoS One* **2014**, *9*, No. e105371.
- (16) Krompholz, N.; Krischkowski, C.; Reichmann, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R.-R.; Bittner, F.; Clement, B.; Havemeyer, A. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2443.
- (17) Schneider, J.; Girreser, U.; Havemeyer, A.; Bittner, F.; Clement, B. *Chem. Res. Toxicol.* **2018**, *31*, 447.
- (18) Clement, B.; Mau, S.; Deters, S.; Havemeyer, A. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1740.

- (19) Zapiter, J.; Harmer, J. R.; Struwe, M.; Scheidig, A.; Clement, B.; Bernhardt, P. V. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 9208.
- (20) Kalimuthu, P.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Kubitz, C.; Scheidig, A. J.; Bernhardt, P. V. *Electrochem. Commun.* **2017**, *84*, 90.
- (21) Plitzko, B.; Havemeyer, A.; Bork, B.; Bittner, F.; Mendel, R.; Clement, B. *Drug Metab. Dispos.* **2016**, *44*, 1617.
- (22) Ginsel, C.; Plitzko, B.; Froriep, D.; Stofa, D. A.; Jung, M.; Kubitz, C.; Scheidig, A. J.; Havemeyer, A.; Clement, B. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, *46*, 1396.
- (23) Schneider, C. V.; Schneider, K. M.; Conlon, D. M.; Park, J.; Vujkovic, M.; Zandvakili, I.; Ko, Y.-A.; Trautwein, C.; Center, R.; Carr, R. M.; Strnad, P.; Thaiss, C. A.; Rader, D. J. *Medicine* **2021**, *2*, 851.e3.
- (24) Lewis, L. C.; Chen, L.; Hameed, L.; Kitchen, R. R.; Maroteau, C.; Nagarajan, S. R.; Norlin, J.; Daly, C. E.; Szczerbinska, I.; Hjuler, S. T.; Patel, R.; Livingstone, E. J.; Durrant, T. N.; Wondimu, E.; BasuRay, S.; Chandran, A.; Lee, W.-H.; Hu, S.; Gilboa, B.; Grandi, M. E.; Toledo, E. M.; Erikat, A. H.; Hodson, L.; Haynes, W. G.; Pursel, N. W.; Coppieters, K.; Fleckner, J.; Howson, J. M.; Andersen, B.; Ruby, M. A. *JHEP Rep.* **2023**, *5*, No. 100693.
- (25) Emdin, C. A.; Haas, M. E.; Khera, A. V.; Aragam, K.; Chaffin, M.; Klarin, D.; Hindy, G.; Jiang, L.; Wei, W.-Q.; Feng, Q.; Karjalainen, J.; Havulinna, A.; Kiiskinen, T.; Bick, A.; Ardissino, D.; Wilson, J. G.; Schunkert, H.; McPherson, R.; Watkins, H.; Elosua, R.; Bown, M. J.; Samani, N. J.; Baber, U.; Erdmann, J.; Gupta, N.; Danesh, J.; Saleheen, D.; Chang, K.-M.; Vujkovic, M.; Voight, B.; Damrauer, S.; Lynch, J.; Kaplan, D.; Serper, M.; Tsao, P.; Mercader, J.; Hanis, C.; Daly, M.; Denny, J.; Gabriel, S.; Kathiresan, S. *PLoS Genet.* **2020**, *17*, No. e1008629.
- (26) Estabrook, R. W.; Werringloer, J. *Methods Enzymol.* **1978**, *52*, 212.
- (27) Whitby, L. G. *Biochem. J.* **1953**, *54*, 437–442.
- (28) Johnson, D. M.; Brasel, T.; Massey, S.; Garron, T.; Grimes, M.; Smith, J.; Torres, M.; Wallace, S.; Villasante-Tezanos, A.; Beasley, D. W.; Comer, J. E. *Antiviral Res.* **2023**, *209*, No. 105492.
- (29) Wen, W.; Chen, C.; Tang, J.; Wang, C.; Zhou, M.; Cheng, Y.; Zhou, X.; Wu, Q.; Zhang, X.; Feng, Z.; Wang, M.; Mao, Q. *Ann. Med.* **2022**, *54*, 516.
- (30) Hernandez-Santiago, B. I.; Beltran, T.; Stuyver, L.; Chu, C. K.; Schinazi, R. F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4636.
- (31) Jakobs, H. H.; Froriep, D.; Havemeyer, A.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Clement, B. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2381.
- (32) Real, A. M.; Hong, S.; Pissios, P. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 550.
- (33) Mohan, S.; Patel, S.; Greenstein, I.; Ng, C.; Frazier, K.; Nguyen, G.; Harding, L.; Barlow, D. *Amino Acids* **2018**, *50*, 1629.

Supporting information

New design of an activity assay suitable for high-throughput screening of
substrates and inhibitors of the
mitochondrial amidoxime reducing component (mARC)

Cathrin Klopp^{1,2}, Michel A. Struwe^{1,2}, Christoph Plieth³, Bernd Clement², Axel J. Scheidig¹

¹Pharmaceutical Institute - Medicinal Chemistry, Kiel University, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany

²Zoological Institute - Structural Biology, Kiel University, Am Botanischen Garten 9, 24118 Kiel, Germany

³Centre for Biochemistry and Molecular Biology, Kiel University, Am Botanischen Garten 9, 24118 Kiel, Germany

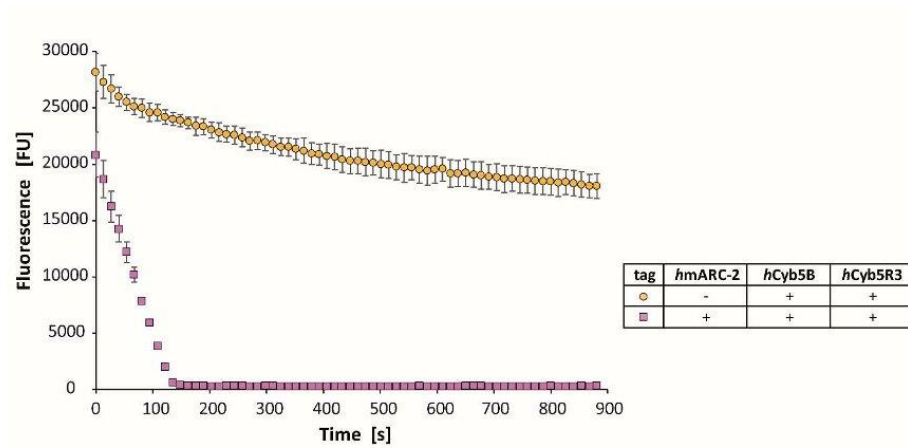


Figure S1: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of 1 mM benzamidoxime by *hmARC-2*. Assay conditions are 191 pmol *hmARC-2*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3* and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

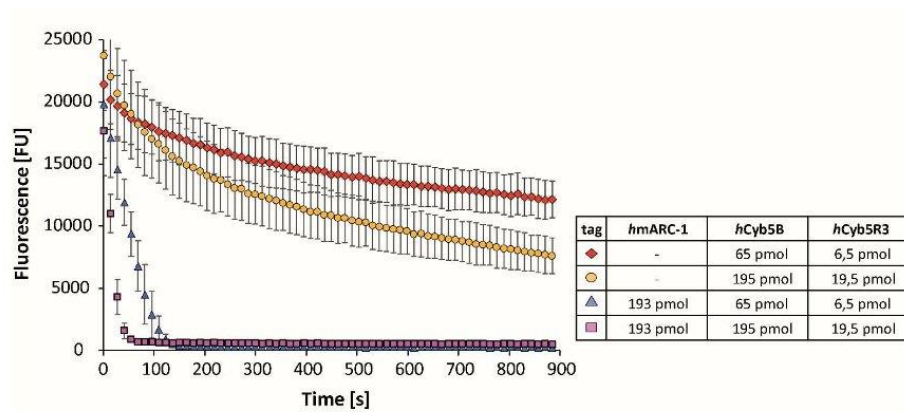


Figure S2: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of benzamidoxime by *hmARC-1* with different amounts of *hCyb5B* and *hCyb5R3*, respectively. The amounts of protein used in 50 μ l are given in the inset. The substrate and cofactor concentrations were 1 mM BAO and 0.2 mM NADH, respectively.

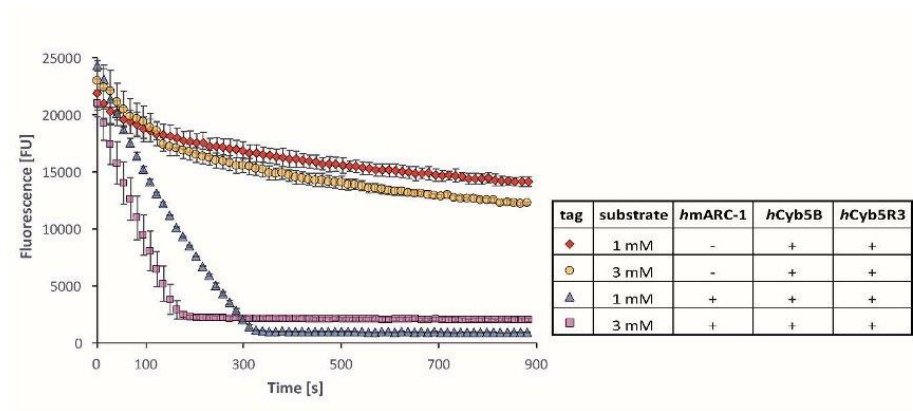


Figure S3: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of the substrate nicotinamide-*N*-oxide by *hmARC-1*. Two different substrate concentrations were used. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM or 3 mM nicotinamide-*N*-oxide and 0.2 mM NADH.

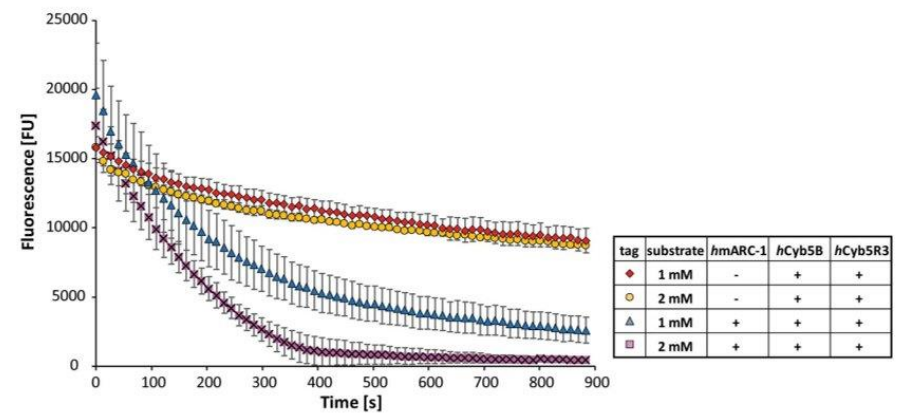


Figure S4: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of benzhydroxamic acid by *hmARC-1*. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM or 2 mM benzhydroxamic acid and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

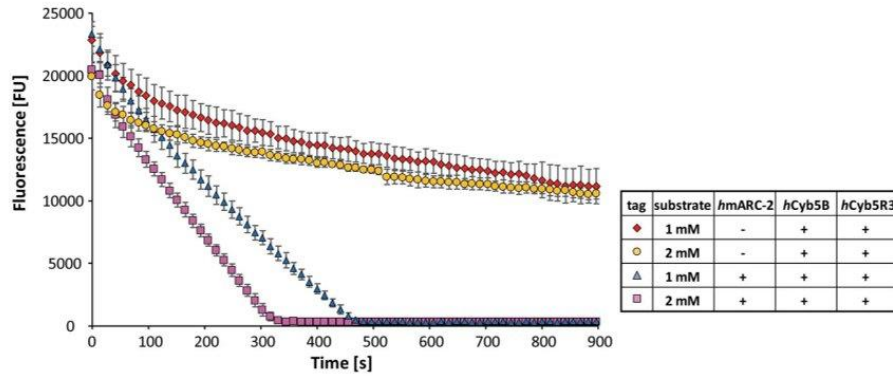


Figure S5: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of benzhydroxamic acid by *hmARC-2*. Assay conditions are 191 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM or 2 mM benzhydroxamic acid and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

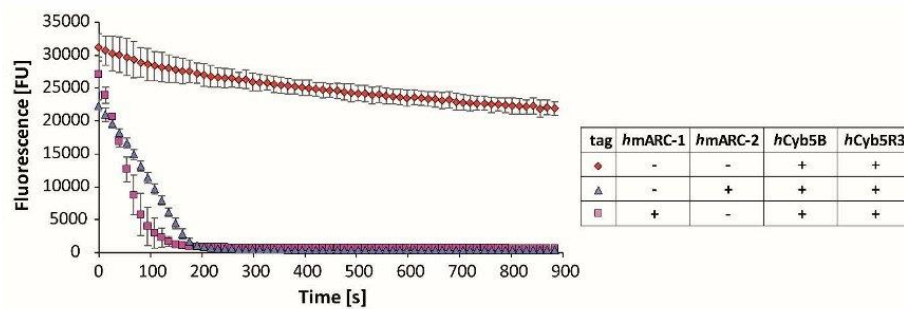


Figure S6: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of *N^ω*-hydroxy-*L*-arginine by *hmARC-1* and *hmARC-2*. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1* or 191 pmol *hmARC-2*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM *N^ω*-hydroxy-*L*-arginine and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

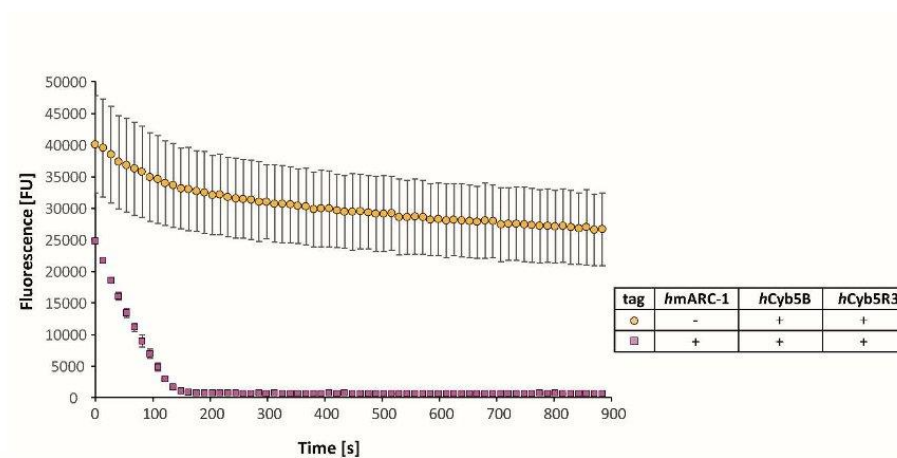


Figure S7: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of N^{ω} -hydroxy- L -nor-arginine by *hmARC-1*. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM N^{ω} -hydroxy- L -nor-arginine and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

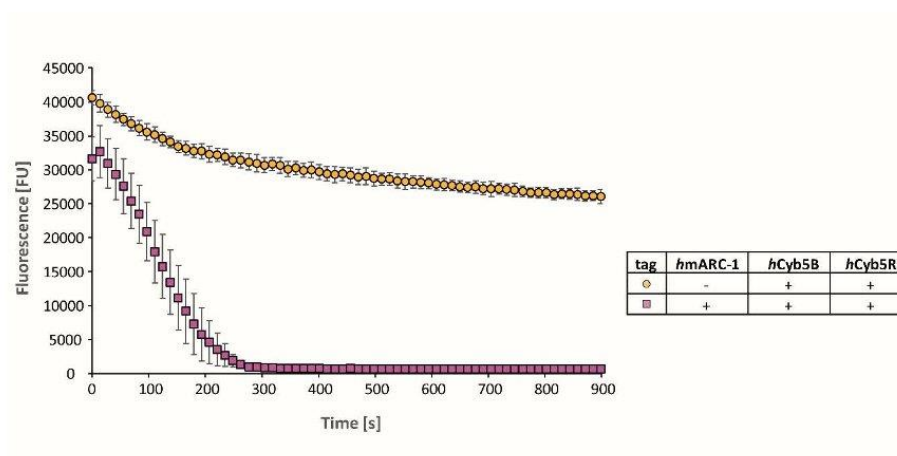


Figure S8: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of Molnupiravir by *hmARC-1*. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM Molnupiravir and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

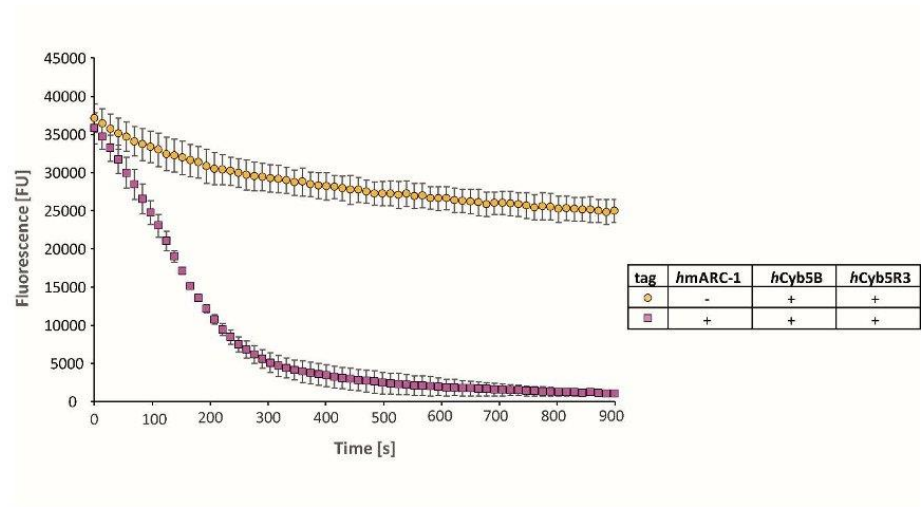


Figure S9: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of *N*⁴-hydroxy-cytidin by *hmARC-1*. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM *N*⁴-hydroxy-cytidin and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

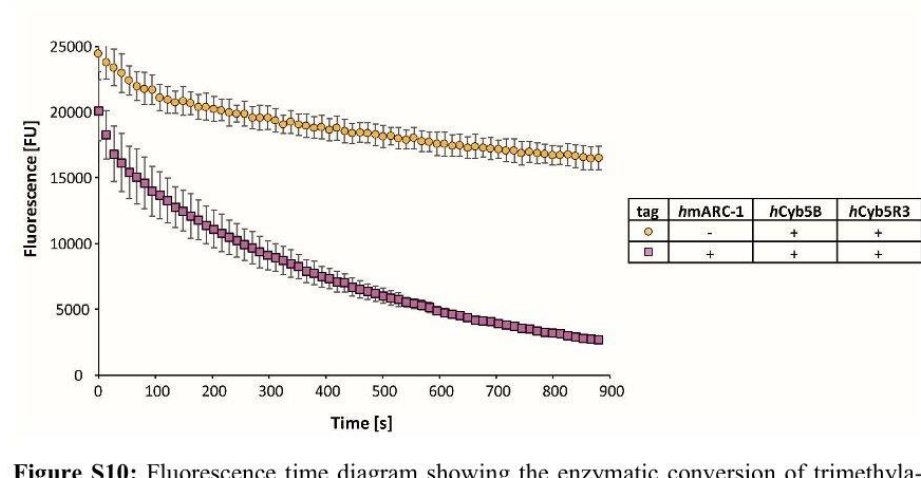


Figure S10: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of trimethylamine-*N*-oxide by *hmARC-1*. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 50 mM trimethylamine-*N*-oxide and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

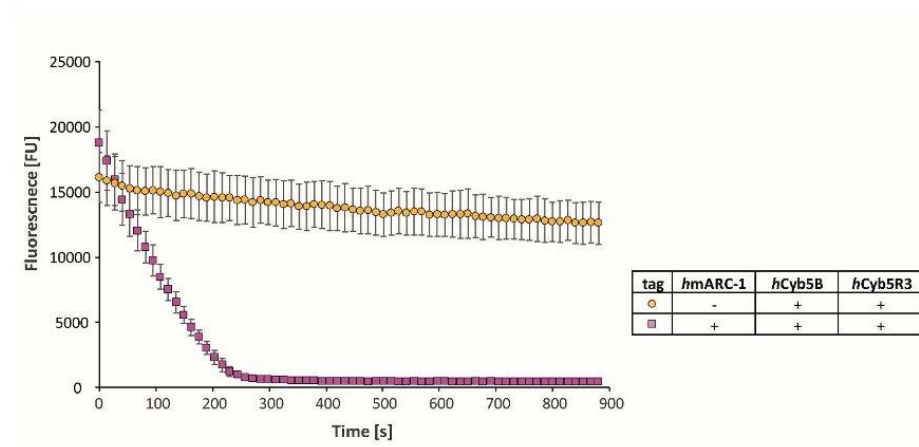


Figure S11: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of trimethylamine-*N*-oxide by *hmARC-1*. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 500 mM trimethylamine-*N*-oxide and 0.2 mM NADH as specified in the Experimental section.

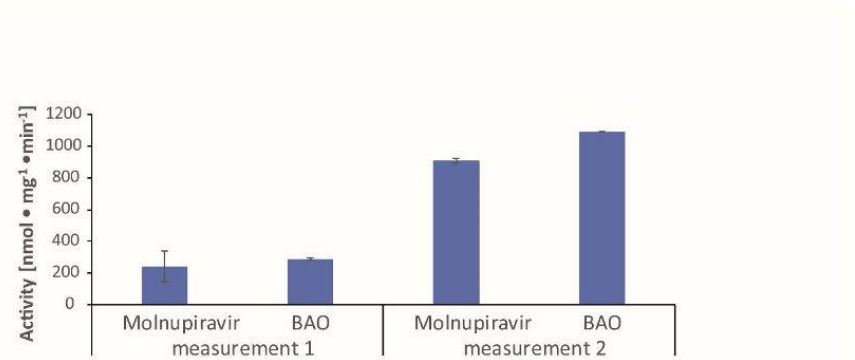


Figure S12: Enzymatic activity of *hmARC-1* for the substrates Molnupiravir and BAO. The two measurements are using different enzyme concentrations. Assay conditions for measurement 1 are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM substrate (Molnupiravir or BAO) and 0.2 mM NADH. Assay conditions for measurement 2 are 444.5 pmol *hmARC-1*, 150 pmol *hCyb5B*, 15 pmol *hCyb5R3*, 3 mM substrate (Molnupiravir or BAO) and 0.2 mM NADH.

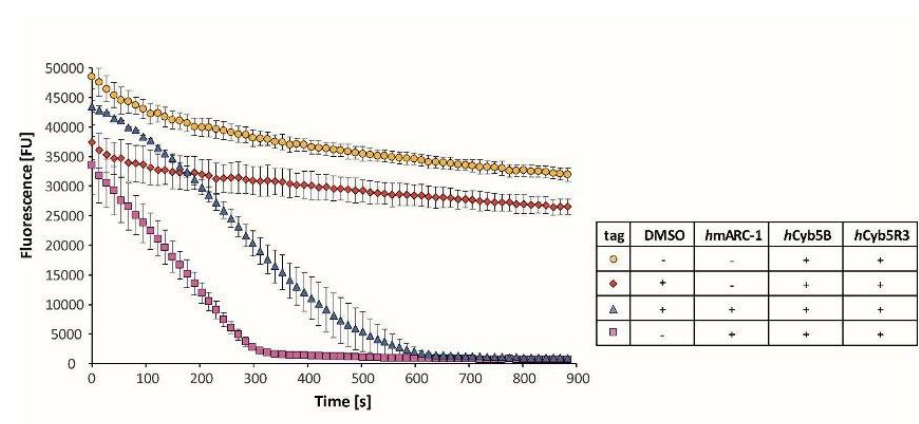


Figure S13: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of benzamidoxime by *hmARC-1* under the influence of DMSO. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 3 mM benzamidoxime and 0.2 mM NADH. If DMSO was added the final concentration was 10% (v/v) (i.e., 1408 mM).

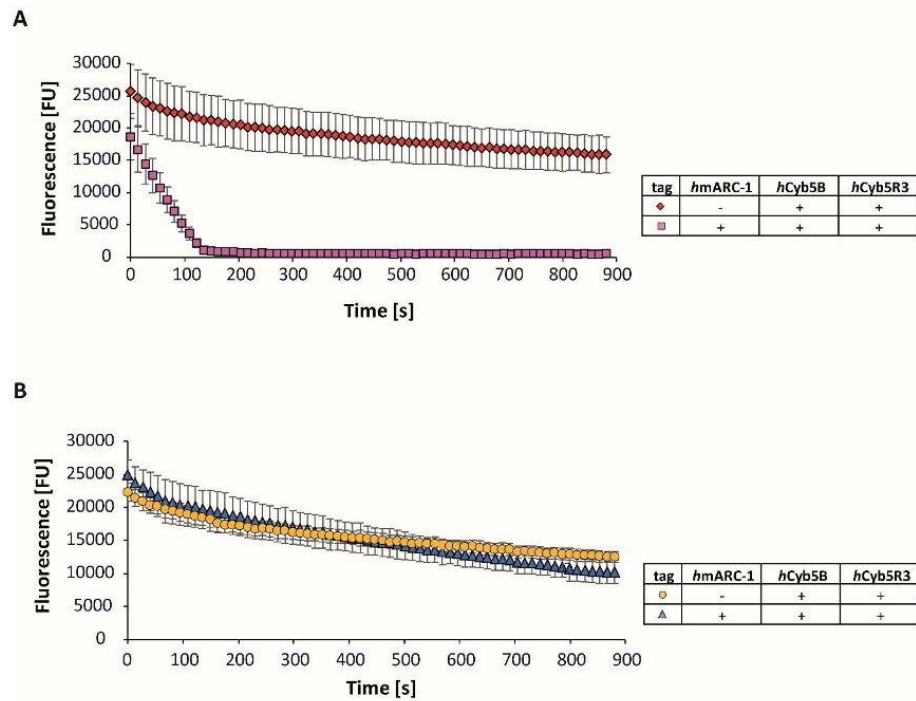


Figure S14: Fluorescence time diagram showing the enzymatic conversion of benzamidoxime by *hmARC-1* using (A) NADH or (B) NADPH. Assay conditions are 193 pmol *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 1 mM benzamidoxime and (A) 0.2 mM NADH or (B) 0.2 mM NADPH.

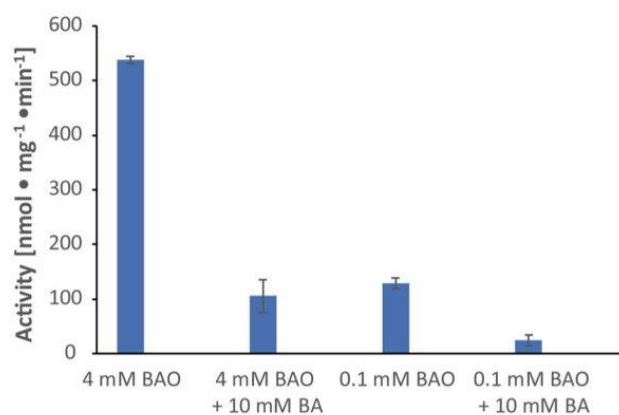


Figure S15: Enzymatic activity of *hmARC-2* for the substrate benzamidoxime (BAO) in the presence of higher concentrations of benzamidine (BA), the end product of the catalytic conversion (test of product inhibition). Assay conditions are 193 pmol *hmARC-2*, 65 pmol *hCyb5B*, 6.5 pmol *hCyb5R3*, 0.2 mM NADH, and 4 mM or 0.1 mM BAO. If benzamidine was added the final concentration was 10 mM BA.

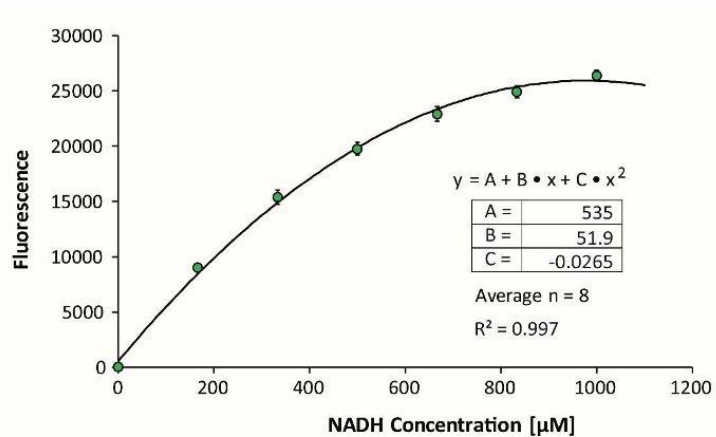


Figure S16: Calibration curve for the fluorescence of NADH. Polynomial fit second grade to address the concentration dependency of the fluorescence reading of NADH.

3 H₂O₂

3.1 Einleitung

Dieses Kapitel wurde in *Molecules* im August 2023 publiziert:

Rixen, S.; Indorf, P. M.; Kubitza, C.; Struwe, M. A.; Klopp, C.; Scheidig, A. J.; Kunze, T.; Clement, B. Reduction of Hydrogen Peroxide by Human Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzymes. *Molecules* 2023, 28 (17)., DOI: 10.3390/molecules28176384

Bisher sind zahlreiche Substanzen bekannt, die durch das mARC-Enzymsystem reduziert werden. In Kapitel 1.3.5.3 sind zahlreiche funktionelle Gruppen und Beispielsubstanzen aufgelistet, welche durch das mARC-Enzymsystem umgesetzt werden. Bei allen Verbindungen handelt es sich um eine *N*-O-Bindung.

Anhand von *MTARC1*-KO-Zellen wurde erkannt, dass der NADH-Verbrauch in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei diesen niedriger war im Vergleich zu den WT-Zellen. Weitere Untersuchungen zeigen, dass das mARC-Enzymsystem H₂O₂ umsetzt. Damit wurde erstmals ein Substrat mit einer O-O-Bindung (Peroxid) entdeckt.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass der K_M-Wert deutlich niedriger (im µM-Bereich) im Vergleich zu den Substanzen mit *N*-O-Bindungen ist. Da das physiologische Substrat von mARC weiterhin unentdeckt ist, liefert dieser Nachweis erste Hinweise auf weitere funktionelle Gruppen, die durch mARC reduziert werden. Darüber hinaus gilt zu berücksichtigen, dass Wasserstoffperoxid zu den reaktiven Sauerstoffspezies zählt (ROS), welche zu Schäden in der Zelle führen. Eine Reduktion von H₂O₂ würde eine Detoxifizierung darstellen. Islinger und Wiese entdecken die Lokalisation von mARC in den Peroxisomen, einer Organelle in eukaryotischen Zellen, welche Sauerstoff verwerten und hochreaktive Metabolite bildet (Islinger et al., 2007; Wiese et al., 2007). In Anbetracht der weiterhin unverstandenen physiologischen Funktion von mARC liefert dieses Paper mit dem Nachweis der Wasserstoffperoxid-Reduktion erste Hinweise für eine potentielle Funktion im Organismus.

3.2 Publikation



Article

Reduction of Hydrogen Peroxide by Human Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzymes

Sophia Rixen ^{1,†}, Patrick M. Indorf ^{1,†}, Christian Kubitz ², Michel A. Struwe ^{1,2}, Cathrin Klopp ^{1,2}, Axel J. Scheidig ², Thomas Kunze ¹ and Bernd Clement ^{1,*}

¹ Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Institute, Kiel University, 24118 Kiel, Germany; srixen@pharmazie.uni-kiel.de (S.R.); pindorf@pharmazie.uni-kiel.de (P.M.I.); mstruwe@strubio.uni-kiel.de (M.A.S.); cklopp@strubio.uni-kiel.de (C.K.); tkunze@pharmazie.uni-kiel.de (T.K.)

² Department of Structural Biology, Zoological Institute, Kiel University, 24118 Kiel, Germany; ckubitz@strubio.uni-kiel.de (C.K.); axel.scheidig@strubio.uni-kiel.de (A.J.S.)

* Correspondence: bclement@pharmazie.uni-kiel.de

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is a human molybdoenzyme known to catalyze the reduction of various *N*-oxygenated substrates. The physiological function of mARC enzymes, however, remains unknown. In this study, we examine the reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) by the human mARC1 and mARC2 enzymes. Furthermore, we demonstrate an increased sensitivity toward H₂O₂ for HEK-293T cells with an *MTARC1* knockout, which implies a role of mARC enzymes in the cellular response to oxidative stress. H₂O₂ is a reactive oxygen species (ROS) formed in all living cells involved in many physiological processes. Furthermore, H₂O₂ constitutes the first mARC substrate without a nitrogen–oxygen bond, implying that mARC enzymes may have a substrate spectrum going beyond the previously examined *N*-oxygenated compounds.

Keywords: reactive oxygen species; hydrogen peroxide; molybdenum enzyme



Citation: Rixen, S.; Indorf, P.M.; Kubitz, C.; Struwe, M.A.; Klopp, C.; Scheidig, A.J.; Kunze, T.; Clement, B. Reduction of Hydrogen Peroxide by Human Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzymes. *Molecules* **2023**, *28*, 6384. <https://doi.org/10.3390/molecules28176384>

Academic Editor: Domenico Osella

Received: 1 August 2023

Revised: 23 August 2023

Accepted: 29 August 2023

Published: 31 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The human mARC enzyme was first described in 2006 as the third component of the *N*-reducing complex together with hemoprotein cytochrome b5 (Cyb5B) and flavoprotein cytochrome b5 reductase (Cyb5R3) [1]. Together with these two electron carrier proteins, mARC enzymes reduce various *N*-hydroxylated substrates like amidoximes, *N*-hydroxyguanidines, hydroxylamines, *N*-oxides or hydroxamic acids [2]. mARC utilizes a Mo-molybdopterin cofactor (Moco), the coordination of the catalytic molybdenum ion being very similar to that observed in sulfite oxidase (SO) [3,4] despite not sharing many other characteristics with SO. Thus, mARC enzymes are classified as part of a separate, new family of molybdenum enzymes, the MOSC domain family [5,6]. All mammalian genomes encode two paralogues of mARC: mARC1 and mARC2 (gene names *MTARC1*, *MTARC2*) [4].

Hydrogen peroxide (H₂O₂) is the major reactive oxygen species (ROS) in eukaryotic cells and some 37 human enzymes are known to generate H₂O₂ by the two-electron reduction of dioxygen [7]. Interestingly, among these H₂O₂-producing enzymes are the eukaryotic molybdenum enzymes xanthine oxidase (XO) [8], aldehyde oxidase (AO) [9] and sulfite oxidase (SO) [10].

While high concentrations of H₂O₂ cause oxidative damage to cells, it is considered to be a physiologically relevant signaling molecule at lower concentrations. These different effects of H₂O₂ have been reviewed in detail elsewhere [7].

Various cell compartments contain H₂O₂-degrading enzymes, ensuring tight regulation of H₂O₂ concentrations. Examples are catalase or myeloperoxidase, which, due to their high *K_M* values, are suitable for degrading high H₂O₂ concentrations, e.g., in

peroxisomes [11,12]. Other enzymes like GPx1 or peroxiredoxins act at much lower H₂O₂ concentrations characteristic for their respective cell compartments [13,14].

Until now, no H₂O₂-degrading enzyme has been identified in the outer mitochondrial membrane (OMM), where mARC enzymes are localized [15].

The mARC enzyme system is known best for its reductive activity toward *N*-oxygenated compounds. However, some studies have shown links between mARC and ROS. For example, the common mARC1 p.A165T variant is associated with higher levels of lipid peroxidation, while the total antioxidant activity (TAA) in serum and expression of catalase are increased [16].

In this work, we present the NADH-dependent degradation of H₂O₂ by the human mARC1 and mARC2 enzymes in concert with their electron carriers Cyb5B and CYB5R3 using recombinant proteins. We go on to show the effect of an *MTARC1* knockout on the viability of HEK-293T cells in the presence of high external H₂O₂ concentrations.

2. Results

2.1. Molybdenum-Containing mARC1 and mARC2 Both Reduce H₂O₂

To assess the reduction of H₂O₂ by mARC enzymes, we compared the NADH consumption, measured in the NADH assay, and the amount of residual H₂O₂, quantified by the fluorometric assay, for several different setups. Importantly, extensive control reactions were examined to unambiguously identify the effect of molybdenum-containing mARC enzymes. The results from these assays are visualized in Figure 1. Note that different H₂O₂ concentrations (50 μ M for mARC1 and 80 μ M for mARC2) were used due to different stabilities of the enzymes toward high H₂O₂ concentrations.

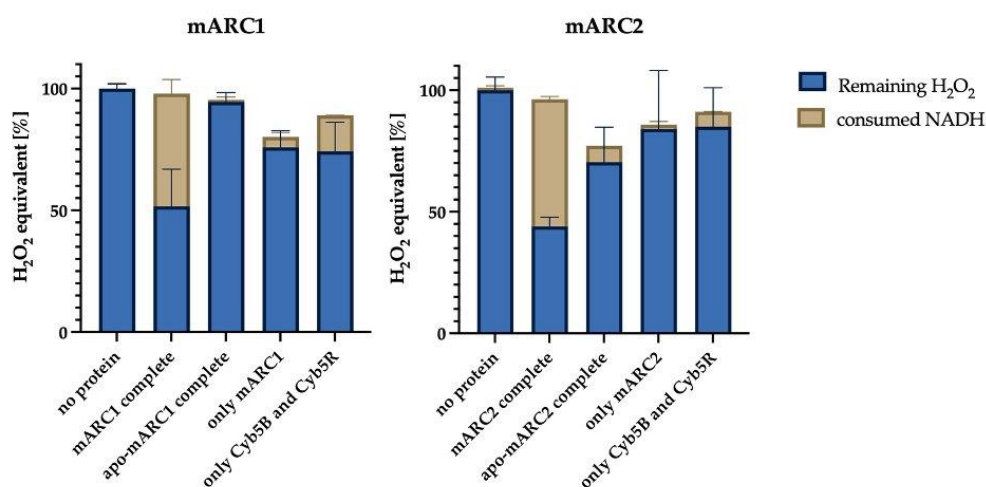


Figure 1. Stacked bar-chart representing the consumption of NADH (brown columns) on top of the residual amount of H₂O₂ (blue columns) for mARC1 (panel A) and mARC2 (panel B). The individual setups compared to each other are (from left to right): no protein—assay containing only NADH and H₂O₂ but no enzymes; mARC1/2 complete—contains mARC1 or mARC2 and both electron carrier proteins; apo-mARC1 complete—same as before but with molybdenum-free apo-mARC; only mARC1/2—just mARC1/2, but no electron carriers; only Cyb5B and Cyb5R—only electron carriers but no mARC enzymes.

It is clearly observed that, for both mARC1 and mARC2, the by far greatest depletion of NADH is observed when the complete, reconstituted mARC1/2 enzyme systems are used. Correspondingly, in these reactions, the lowest concentrations of residual H₂O₂ were found, which confirms that NADH consumed by the mARC enzyme system does

in fact reduce H₂O₂. The control reactions indicate that only holo-mARC enzymes with a molybdopterin prosthetic group can reduce H₂O₂ in concert with Cyb5B and Cyb5R3.

2.2. Kinetics of mARC-Dependent H₂O₂ Reduction

Both mARC1 and mARC2 display Michaelis–Menten kinetics for H₂O₂ reduction, as is shown in Figure 2. The turnover rates and K_M values for H₂O₂ reduction by mARC1 and mARC2 are comparable, with mARC1 showing a slightly lower K_M but higher turnover rates.

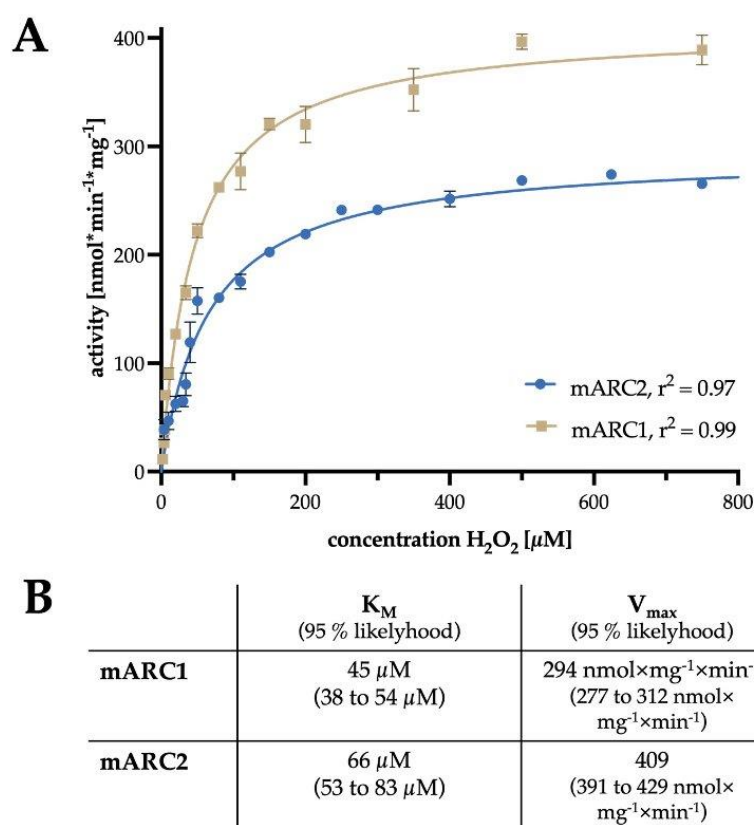


Figure 2. (A) Kinetic profile of mARC1- and mARC2-catalyzed H₂O₂ reduction. (B) Kinetic parameters obtained from fitting to the Michaelis–Menten equation. Values in parentheses indicate the 95% likelihood interval for K_M and V_{max}.

Using our recently established fluorescence-based high-throughput assay [17], we were able to measure very similar conversion rates for the mARC-catalyzed reduction of hydrogen peroxide.

2.3. MTARC1 Knockout Decreases Cell Viability in Presence of H₂O₂

To determine whether or not the reduction of H₂O₂ by recombinant mARC enzymes is relevant in cellulo, we examined the impact of different H₂O₂ concentrations on cell viability using an HEK-293T-based knockout model. Since HEK-293T cells express only very low levels of mARC2, the MTARC1 knockout results in cells practically devoid of mARC activity (mARC2 expression levels do not increase to compensate the MTARC1

knockout. The knockout was shown to be effective on the protein level by Western blot analysis (Figure 3). Before incubation with H₂O₂, some cells were treated with buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of glutathione synthesis.

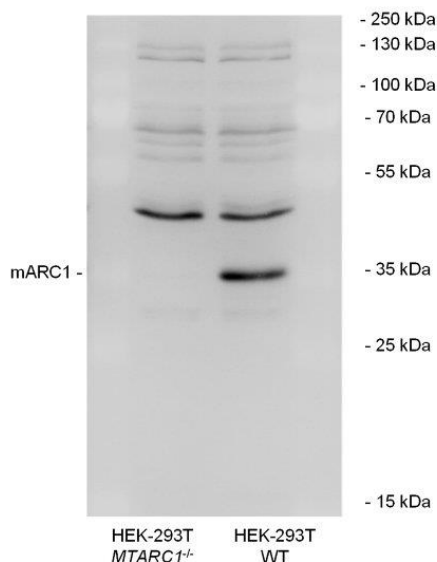


Figure 3. Protein production to verify *MTARC1* KO. *MTARC1*^{−/−} and WT cells were lysed, 36 µg of protein was applied per lane and Western blot analyses were performed using an anti-mARC1 antibody.

Differences seen between wildtype and knockout cells are already reflected by cell morphology. A changed cell morphology induced by H₂O₂, which can be observed in KO cells at 20 µM, only occurs in WT cells at 30 µM, while the KO cells at 30 µM can hardly be considered morphologically alive (Figure 4). Furthermore, Hoechst staining revealed that knockout cells treated with 30 µM H₂O₂ had higher nuclear condensation and thereby an increased apoptosis rate compared to wildtype cells (Figure 5C).

This observation was confirmed in a resazurin-based cell viability assay. While low concentrations of H₂O₂ do not appear to have a negative influence on cell viability in either WT or KO cells, when increasing H₂O₂ concentrations above 10 µM, WT and KO cells clearly show divergence, with the viability of WT cells being significantly higher (Figure 5A,B). A decreased viability of knockout cells can already be observed after 8 h and only becomes even more pronounced after longer incubation periods. After 48 h, KO cells are not viable at 30 µM H₂O₂, whereas the same is observed with WT cells at a concentration of 80 µM H₂O₂. At a concentration of 30 µM, the viability of the WT cells is still approx. 70%.

These findings show that H₂O₂ degradation by the mARC1 enzyme does occur in cell culture, and it has a measurable effect on cell physiology at high extracellular H₂O₂ concentrations.

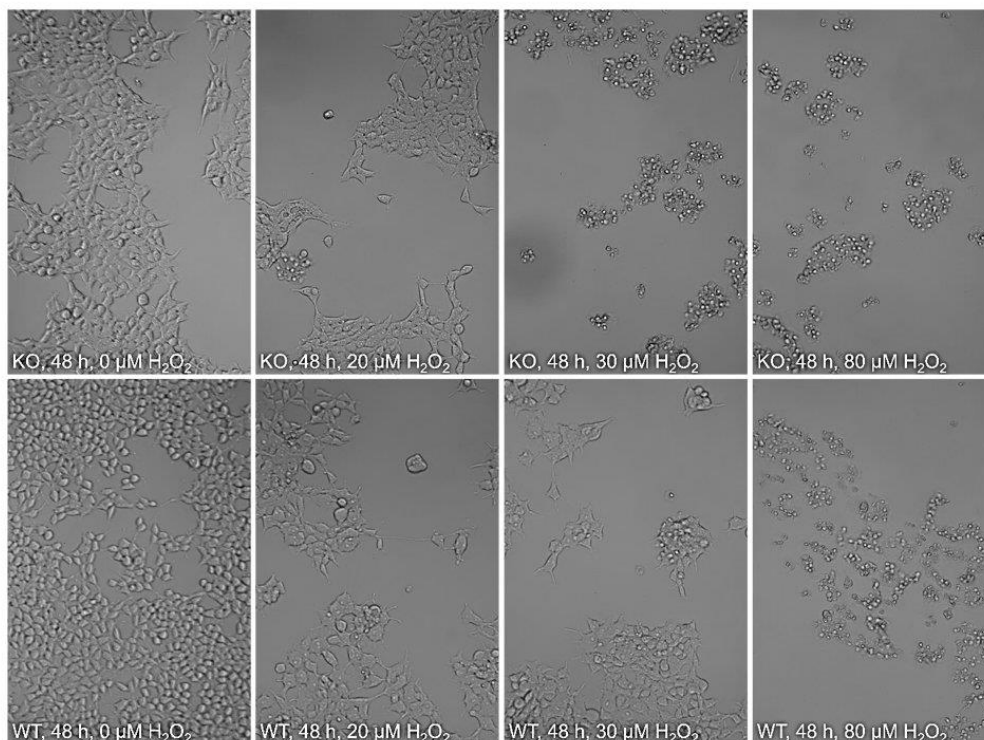


Figure 4. Cytotoxicity of H₂O₂ to HEK-293T MTARC1-KO and WT cells. Cells were seeded onto 96-well plates and incubated with medium containing 0.3 mM BSO for 16 h, followed by incubation with medium containing 20–80 μM H₂O₂. After 48 h of incubation, cell morphology was examined microscopically. At 0–20 μM H₂O₂, both WT and KO cells have very similar morphologies. However, when the H₂O₂ concentration is increased to 30 μM, morphology of KO cells changes drastically, whereas the WT cells look largely unaffected. At 80 μM, both cell lines display strong morphological differences, resembling the changes already seen at 30 μM for KO cells.

Further, an influence on cell proliferation could be observed. Extracellular concentrations of 10 μM H₂O₂ showed no impairment on cell proliferation. An extracellular H₂O₂ concentration of 20 μM did lead to impaired cell proliferation: after 24 h, the proliferation of both WT and KO cells was decreased compared to control cells without H₂O₂ treatment. This impairment on cell proliferation was more pronounced in mARC1-deficient cells, where, after 24 h, only 50% could be counted compared to cells treated with the medium only; thus, in purely arithmetical terms, no cell division of the KO cells had taken place in the last 24 h. The number of WT cells was reduced to approx. 70%. After 72 h, both WT and KO cells were reduced to approx. 35%. At a H₂O₂ concentration of 30 μM, no measurable cell division occurred in either the KO or WT cells (Figure 6).

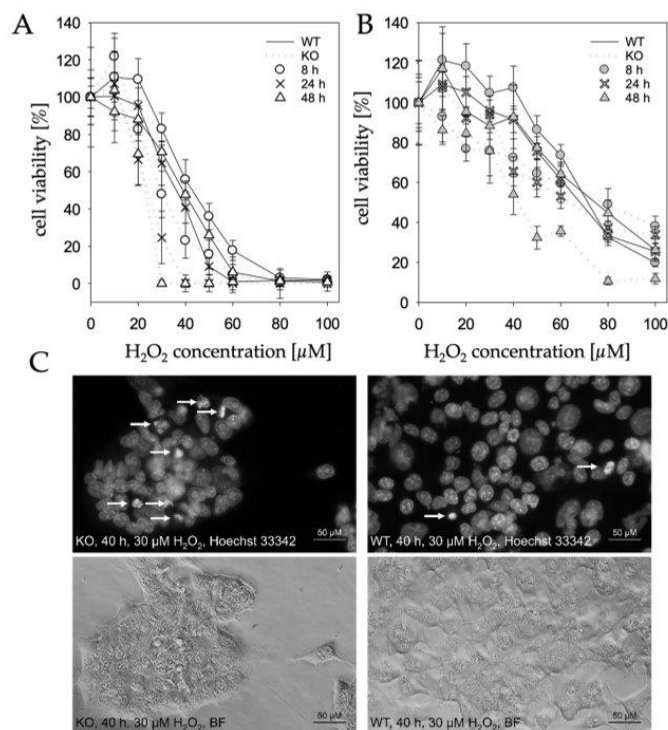


Figure 5. Cell viability and Hoechst 33342 staining. Cells were treated with different concentrations of H_2O_2 and examined after 8 h, 24 h, 48 h and 72 h by resazurin assay. Cells treated with medium without supplemented H_2O_2 were defined as 100% viability. (A) Cell viability after prior treatment with 0.3 mM BSO; (B) cell viability without prior treatment with BSO; (C) fluorescence and bright film microscopy of HEK-293T *MTARC1* KO and WT cells in a 40 \times objective magnification. Cells were treated for 48 h with 30 μM H_2O_2 . The white arrows mark cell nuclei with clear chromatin condensation.

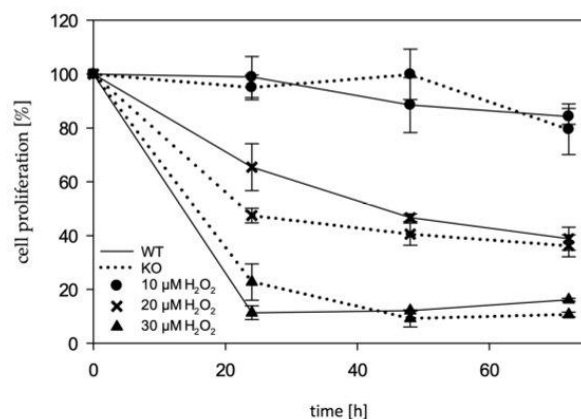


Figure 6. Cell proliferation. Cells were treated with different concentrations (10 μM , 20 μM , 30 μM) of H_2O_2 . After 24 h, 48 h and 72 h, the cell number was determined on the ImageXpress[®] (λ_{ex} : 358, λ_{em} : 461) (Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA).

3. Discussion

The study presented here identifies H₂O₂ as a new substrate for the human mARC1 and mARC2 proteins. The degradation of H₂O₂ was demonstrated in vitro with recombinant enzymes and confirmed in a more complex environment by in cellulo knockout studies. Thus, for the first time, a reduction of O-O bonds by the mARC enzyme system is described. Molybdenum enzymes like mARC typically characterize two-electron transfer reactions; therefore, the product of this reaction is likely water.

While we cannot at this point conclude that H₂O₂ or other reactive oxygen species are the physiological substrate of eukaryotic mARC enzymes, this finding is important nonetheless. Compounds with O-O bonds are a completely novel group of potential mARC substrates that have not previously been studied. So far, all mARC-catalyzed reactions described in the literature are N-reductions cleaving N-O bonds [18].

The turnover rates of the mARC-catalyzed H₂O₂ reduction are relatively low compared to other H₂O₂-degrading enzymes. It should be noted, however, that turnover rates determined with the soluble recombinant proteins without their OMM-anchoring sequences are typically much lower for human mARC enzymes compared with proteins isolated from organ homogenates [19]. Thus, in vivo H₂O₂-reducing activities of human mARC enzymes can be expected to be significantly higher than the values reported here. On another note, the K_M values for H₂O₂ reduction by recombinant human mARC proteins (approx. 50 µM) are very low compared to those for the well-studied N-hydroxylated compounds.

Hydrogen peroxide has fundamentally important functions in humans. Depending on the intracellular concentration, it initiates, inter alia, cell proliferation, cell shaping, migration and angiogenesis [20–22]. On the other hand, the accumulation of higher concentrations of hydrogen peroxide and other ROS leads to oxidative stress, a condition of imbalance between pro-oxidants and antioxidants. ROS pass through cell membranes and cause oxidative damage to lipids, proteins and DNA, as well as mitochondrial dysfunction, all of which can lead to the loss of essential cell functions and initiate the caspase-mediated apoptosis pathway [23–25].

In this study, a coupled enzyme assay was established. Two parameters were measured: the amount of NADH oxidized by the mARC-mediated reduction and, to confirm the results, the remaining concentration of hydrogen peroxide. Thus, it was shown that both mARC proteins can reduce H₂O₂.

Considering the enzyme kinetics of this reaction, it is striking that the K_M values of both mARC proteins are remarkably lower when compared to well-known H₂O₂-depleting enzymes such as catalase or peroxiredoxin [26,27].

An in cellulo *MTARC1* knockout model was generated and established to verify whether the absence of mARC1 leads to cellular impairment upon exposure to H₂O₂. A significantly reduced cell physiology of mARC1-deficient cells and thus a higher sensitivity toward H₂O₂ compared to corresponding WT cells could be observed. Also, higher apoptosis levels and lower cell viability levels were seen. These findings could be confirmed by light and fluorescence microscopy showing altered cell morphology and declined nuclear condensation. While the H₂O₂ concentrations used in our cell culture experiments certainly exceed those expected in vivo, it is still possible that the regulation of ROS is a physiological function of mARC enzymes.

The complex mechanisms of hydrogen peroxide regulation with a large number of enzymes in various cell organelles demonstrate the need for different approaches to control the intracellular concentration. While major hydrogen peroxide transforming enzymes like catalase, GPx or peroxiredoxins are present in the endoplasmic reticulum, cytosol, nucleus, peroxisomes, the intermembrane space (IMS), inner mitochondrial membrane (IMM) and mitochondrial matrix, mARC stands out through its localization at the OMM [13,15,28–30], although there are some reports about GPx also being localized at the OMM [31].

mARC might thus be involved in protecting the OMM from ROS. Since ROS are formed in high concentrations in the IMS and the cytosol by different enzymes, a protective mechanism for the undesired oxygenation of the OMM—for example, against lipid

peroxidation to prevent oxidative stress and mitochondrial dysfunction—is conceivable. This was also described earlier for GPx-4 at the IMM [28]. There are also some known enzymes at the OMM, such as the monoamine oxidase MAO, that form hydrogen peroxide as a secondary product [28]. It is thus also possible that mARC influences the free diffusion between IMS and cytosol diffusion and the transport of H₂O₂ through voltage-dependent anion channels (VDACs) and poroxiporins due to its high affinity to H₂O₂.

Kagan and colleagues highlighted the significance of ROS for apoptosis by identifying the releasing pathway of proapoptotic factors from the OMM. A H₂O₂-dependent cardiolipin-specific peroxidase activity of cytochrome c is required for the permeabilization of the OMM, demonstrating again the significance of hydrogen peroxide regulation in the OMM for critical cell processes [32]. Also, H₂O₂ is formed in the peroxisomal β -oxidation of fatty acids [33]. Various studies in mice and rats also suggest the possibility of a dual localization of mARC in mitochondria and peroxisomes [34,35]; thus, this colocalization could suggest that mARC has a regulatory function in hydrogen peroxide and antioxidant metabolism in peroxisomes as well.

In conclusion, the reduction of H₂O₂ by mARC is certainly very interesting, as it indicates that the spectrum of substrates that these enzymes can reduce could go far beyond the previously studied *N*-oxygenated substrates. The in cellulo studies confirm that H₂O₂ is also reduced by the native mARC enzyme in its cellular context. We do not claim that H₂O₂ or other reactive oxygen species are the physiological substrates of mARC. An involvement in the cellular regulation of H₂O₂ is conceivable, but data available on this point are not sufficient to claim this to be the enzymes' function. Due to their involvement in liver disease, mARC enzymes have recently gained much attention. However, it remains unknown what the physiological function of mARC actually is and how exactly it exerts its influence on lipid metabolism and liver disease. In the future, a search for mARC's physiological substrate that might not have previously been associated with mARC should be considered.

4. Materials and Methods

4.1. Protein Sources

Recombinant human mARC1, mARC2, Cyb5B and Cyb5R3 were expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) and purified by column chromatography, essentially as described previously [36]. For mARC1 and mARC2 with bound molybdopterin cofactor (*holo*-mARC1/2), the *E. coli* TP1000 strain [37] was used. Proteins without molybdopterin were expressed in RK5202 [38]. Protein concentrations were determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with bovine serum albumin for calibration. Loading of Cyb5B with heme and Cyb5R3 with flavin adenine dinucleotide (FAD) was quantified as published [36].

4.2. Photometric Assay

Reduction of H₂O₂ by the reconstituted mARC enzyme system was assayed using the previously published protocol [2]. Reactions contained 7.5 μ g (224 pmol) of either mARC1 or mARC2, 3.5 μ g (210 pmol) Cyb5B and 0.08 μ g (2.4 pmol) Cyb5R3 and 200 μ M NADH in 20 mM Na-MES buffer, pH 6.0. The total reaction volume was 300 μ L. Consumption of NADH at 37 °C was monitored by recording the absorption spectrum from 300 to 400 nm in 15 s intervals. The reaction was stopped by heating 200 μ L of the incubation mix to 95 °C for 5 min in a water bath. Turnover rates were calculated through the change in absorption at 340 nm over a timespan of 2 min. Kinetic parameters were determined by fitting the Michaelis–Menten equation to the turnover rates at different H₂O₂ concentrations in GraphPad Prism 9.5.1. All measurements were performed in triplicate.

4.3. Fluorometric Activity Assay

Alternatively, the enzyme activity was assayed by monitoring NADH consumption through a recently established fluorometric protocol [17]. Briefly, time-dependent change

in NADH fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 365 \text{ nm}$) was monitored with a TECAN Infinite 200 M Pro plate reader. The reaction volume was 50 μL . Assays contained 193 pmol (=6.5 μg) *hmARC-1*, 65 pmol *hCyb5B* (heme), 6.5 pmol *hCyb5R3* (FAD), 0.2 mM of NADH and the substrate to be tested in 20 mM Na-MES buffer, pH 6.0. The reaction mixtures containing all components except *Cyb5R3* were pre-incubated at 37 °C for 3 min. The reactions were started by adding *Cyb5R3*, and NADH fluorescence was recorded for 15 min at 37 °C. BAO was always used in parallel as a reference substrate.

4.4. Peroxide Assay

To confirm degradation of H_2O_2 by the mARC enzyme system, residual H_2O_2 concentrations were quantified using a fluorometric peroxidase assay [39]. Samples from the photometric activity assays were cooled on ice for 1 min and then pre-incubated at 37 °C for 2 min. Then, 10 μL of 20 mM Na-MES buffer, pH 6.0, 30 μL of 20 mM 4-hydroxyphenylacetic acid and 30 μL of a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ horseradish peroxidase solution were added and incubation at 37 °C was continued for 10 min. Afterwards, 10 μL of 10 M NaOH and 850 μL distilled water were added. A total of 150 μL was transferred to Perkin Elmer quartz SUPRASIL cuvettes. Fluorescence spectra from 340 to 450 nm were measured in a Perkin Elmer LS 55 Fluorescence Spectrometer using an excitation wavelength of 320 nm. The peak at 408 nm was used for evaluation. Correlation between the intensity of this peak and the H_2O_2 concentration was proven using a calibration curve.

4.5. Molecular Biology

Knockout of the *MTARC1* gene in HEK-293T cells was achieved by the CRISPR-Cas9 method [40]. A sequence encoding sgRNA for sgRNA addressing exon 2 of the *MTARC1* gene (5'-GTGGCCAAAACCGAACACTAGT-TGG-3', PAM sequence underlined) was cloned into the *Esp3I* site of the plentiCRISPRv2 plasmid (Addgene #49535) using standard cloning methods [41]. Correct insertion of the sgRNA-encoding sequence was confirmed by Sanger sequencing using the primer 5'-GAGGGCCTA-TTCCCCATGATTCC-3'.

4.6. Mammalian Cell Culture

Human embryonic kidney cells (HEK-293T) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) in a humidified incubator at 37 °C in presence of 5% CO_2 . HEK-293T cells were verified by SNP analysis and confirmed to be mycoplasma-free.

For transfection, target cells were seeded at 2×10^5 cells/well in a 6-well plate. Twenty-four hours after seeding, the cultivation medium was replaced with DMEM containing 2% FCS. The transfection mix consisted of 100 μL Opti-MEM, 1 μg DNA (plentiCRISPRv2 containing the sgRNA sequence) and 3 μL Lipofectamine 2000[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Medium was exchanged for DMEM incl. 10% FCS after 6 h. After further 18 h, medium was replaced again by DMEM incl. 10% FCS, supplemented with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin. Cells were cultivated and selected in puromycin-containing medium for 6 days.

HEK-293T KO lines were isolated by serial dilution in 96-well plates (0.5 cells/well). After three weeks of expansion, DNA was isolated with the peqGOLD microspin tissue DNA kit (VWR, Darmstadt, Germany), the region of interest was amplified by PCR and the knockout was validated by Sanger sequencing. Primers for both amplification of the gene region of interest as well as sequencing were 5'-AAGCTCCTCCAGGGTCTGGCTTC-3' and reverse 5'-CGACCTGCCCTTTCCTTACCTGC-3'.

For immunoblot analysis, cells were detached using ice-cold Dulbecco's PBS (DPBS), centrifuged, and resuspended in NP-40 lysis buffer (containing 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 50 mM Tris). After 30 min shaking at 4 °C, the lysate was centrifuged again and the protein concentration in the supernatant was quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

4.7. SDS-PAGE and Immunoblotting

Samples containing 36 µg of total protein were separated by SDS-PAGE on hand-cast MiniProtean gels supplemented with 0.5% trichloroethanol (TCE) (*v/v*) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to standard protocols. TCE was used as an unspecific protein staining. It reacts with tryptophan residues of the proteins under UV radiation for 5 min to a fluorescent product [42]. After electrophoresis, proteins were transferred onto Hybond-P polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The membranes were blocked in TRIS-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST) and 5% milk powder, incubated with primary antibodies and washed with TBST. Antibodies used were anti-mARC1 (Abgent, San Diego, CA, USA; AP9754c, 1:1000 dilution) and a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Ely, UK). Fluorescence and chemiluminescence were detected on a ChemoStar Touch ECL and Fluorescence Imager (Intas Science Imaging, Göttingen, Germany).

4.8. Viability Assay

Both wildtype and *MTARC1* knockout HEK-293T cells were seeded at 3000 cells per well into 96-well plates containing 80 µL DMEM (with 10% FCS). Twenty-four hours after seeding, adherent cells were incubated with medium containing 0.3 mM BSO for 16 h, followed by incubation with medium containing 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 µM H₂O₂. Cell viability was assayed using a water-soluble resazurin assay (Sigma Aldrich) after 8, 24 and 48 h. A total of 11 µL of a 0.01% resazurin solution in PBS was added directly to the culture medium (10% of the culture medium volume, 0.001% resazurin). After 180 min incubation at 37 °C, the amount of converted resazurin was measured fluorometrically ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) in a spark[®] multimode microplate reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). The fluorescence measured for cells treated with 0 µM H₂O₂ were defined as 100% viability. mARC1 itself does not significantly contribute to resazurin reduction.

4.9. Proliferation Assay

To determine the influence of H₂O₂ on cell proliferation, the same number of cells were seeded in black 96-well microtiter plates with transparent bottom. Cells were fixed and stained with Hoechst 33342 after further 24 h, 48 h and 72 h of incubation with 10 µM, 20 µM and 30 µM H₂O₂. For this purpose, 50 µL of 100 µL culture medium was removed and replaced by 50 µL of an 8% PFA, 0.002% Hoechst 33342 solution in DPBS. After 10 min of incubation at RT, the supernatant was completely removed, and each well was washed twice with DPBS. Cells were overcoated with DPBS and counted on the ImageXpress[®] (λ_{ex} : 358, λ_{em} : 461) (Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA).

4.10. Microscopy

After 40 h of incubation at 37 °C, cells were imaged live at 20× objective magnification on an Olympus CK2 microscope. For Hoechst 33342 staining, 1500 cells were seeded onto 96-well half-area black microplates and incubated with H₂O₂ as described before. Cells were fixed with 8% formaline in PBS for 10 min at room temperature and simultaneously stained with Hoechst 33342. After staining, wells were rinsed twice with PBS to remove any remaining dye. Apoptotic cells were observed under a fluorescence microscope at 40× objective magnification (Olympus, Tokyo, Japan).

Author Contributions: S.R.—conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, validation, writing—original draft, visualization; P.M.I.—conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, validation, writing—original draft, visualization; C.K. (Christian Kubitz): investigation; M.A.S.: investigation, writing: review and editing; C.K. (Cathrin Klopp): investigation; A.J.S.: supervision, project administration; T.K.: supervision, project administration; B.C.: supervision, project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: MS acknowledges financial support from Studienstiftung des Deutschen Volkes and from the Joachim Herz Foundation. The APC was partially funded by the state of Schleswig-Holstein through the funding program “Open Access Publikationsfonds”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We acknowledge technical support by Brigitte Bittner and Thomas Behrendt. We thank Tracy Palmer and Grant Buchanan (University of Dundee) for sharing *E. coli* strain TP1000. We furthermore gratefully acknowledge access to the core facilities of the BiMo/LMB of Kiel University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not applicable.

References

- Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34796–34802. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Indorf, P.; Kubitz, C.; Scheidig, A.; Kunze, T.; Clement, B. Drug metabolism by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Rapid assay and identification of new substrates. *J. Med. Chem.* **2019**, *63*, 6538–6546. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rajapakshe, A.; Astashkin, A.V.; Klein, E.L.; Reichmann, D.; Mendel, R.R.; Bittner, F.; Enemark, J.H. Structural studies of the molybdenum center of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) by pulsed EPR spectroscopy and ¹⁷O-labeling. *Biochemistry* **2011**, *50*, 8813–8822. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ott, G.; Havemeyer, A.; Clement, B. The mammalian molybdenum enzymes of mARC. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 265–275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kubitz, C.; Bittner, F.; Ginsel, C.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Scheidig, A.J. Crystal structure of human mARC1 reveals its exceptional position among eukaryotic molybdenum enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 11958–11963. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gladyshev, V.N.; Zhang, Y. Abundance, Ubiquity and Evolution of Molybdoenzymes. In *Molybdenum and Tungsten Enzymes: Biochemistry*; Hille, R., Schulzke, C., Kirk, M.L., Eds.; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2016.
- Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613–619. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kelley, E.E.; Khoo, N.K.; Hundley, N.J.; Malik, U.Z.; Freeman, B.A.; Tarpey, M.M. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 493–498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Garrido, C.; Leimkühler, S. The Inactivation of Human Aldehyde Oxidase 1 by Hydrogen Peroxide and Superoxide. *Drug Metab. Dispos.* **2021**, *49*, 729–735. [\[CrossRef\]](#)
- Hänsch, R.; Lang, C.; Riebeseel, E.; Lindigkeit, R.; Gessler, A.; Rennenberg, H.; Mendel, R.R. Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂: Combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6884–6888. [\[CrossRef\]](#)
- But, P.G.; Fomina, V.A.; Murav'ev, R.A.; Rogovin, V.V. Myeloperoxidase from Neutrophil Peroxisomes. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* **2003**, *30*, 207–211. [\[CrossRef\]](#)
- Deisseroth, A.; Dounce, A.L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* **1970**, *50*, 319–375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cox, A.G.; Pearson, A.G.; Pullar, J.M.; Jönsson, T.J.; Lowther, W.T.; Winterbourn, C.C.; Hampton, M.B. Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 51–58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Brigelius-Flohé, R.; Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3289–3303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Klein, J.M.; Busch, J.D.; Potting, C.; Baker, M.J.; Langer, T.; Schwarz, G. The Mitochondrial Amidoxime-Reducing Component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 42795–42803. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Janik, M.K.; Smyk, W.; Kruk, B.; Szczepankiewicz, B.; Gornicka, B.; Lebidzinska-Arciszewska, M.; Potes, Y.; Simoes, I.C.M.; Weber, S.N.; Lammert, F.; et al. MARC1 p.A165T variant is associated with decreased markers of liver injury and enhanced antioxidant capacity in autoimmune hepatitis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 24407. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Klopp, C.; Struwe, M.A.; Plieth, C.; Clement, B.; Scheidig, A.J. New Design of an Activity Assay Suitable for High-Throughput Screening of Substrates and Inhibitors of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC). *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 12452–12458. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Clement, B.; Struwe, M.A. The History of mARC. *Molecules* **2023**, *28*, 4713. [\[CrossRef\]](#)

19. Chamizo-Ampudia, A.; Galvan, A.; Fernandez, E.; Llamas, A. The *Chlamydomonas reinhardtii* molybdenum cofactor enzyme crARC has a Zn-dependent activity and protein partners similar to those of its human homologue. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10*, 1270–1282. [\[CrossRef\]](#)
20. Cordeiro, J.V.; Jacinto, A. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 249–262. [\[CrossRef\]](#)
21. Burdon, R.H.; Rice-Evans, C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* **1989**, *6*, 345–358. [\[CrossRef\]](#)
22. Sies, H.; Jones, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 363–383. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Janssen-Heininger, Y.M.; Mossman, B.T.; Heintz, N.H.; Forman, H.J.; Kalyanaraman, B.; Finkel, T.; Stamler, J.S.; Rhee, S.G.; van der Vliet, A. Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 1–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Chiruchi, V.; Maccarrone, M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 2605–2641. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Huang, B.; Liang, J.J.; Zhuang, X.; Chen, S.W.; Ng, T.K.; Chen, H. Intravitreal Injection of Hydrogen Peroxide Induces Acute Retinal Degeneration, Apoptosis, and Oxidative Stress in Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 5489476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Rehner, J.P.; Robertson, J.D.; Smith, C.V. 1.14—Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In *Comprehensive Toxicology*, 2nd ed.; McQueen, C.A., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 2010; pp. 277–307.
27. Chandrashekar, R.; Tsuji, N.; Morales, T.H.; Carmody, A.B.; Ozols, V.O.; Welton, J.; Tang, L. Removal of hydrogen peroxide by a 1-cysteine peroxiredoxin enzyme of the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Parasitol. Res.* **2000**, *86*, 200–206. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Riemer, J.; Schwarzländer, M.; Conrad, M.; Herrmann, J.M. Thiol switches in mitochondria: Operation and physiological relevance. *Biol. Chem.* **2015**, *396*, 465–482. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Florian, S.; Wingler, K.; Schmehl, K.; Jacobasch, G.; Kreuzer, O.J.; Meyerhof, W.; Brigelius-Flohé, R. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic. Res.* **2001**, *35*, 655–663. [\[CrossRef\]](#)
30. Frederick, S.E.; Newcomb, E.H. Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). *J. Cell Biol.* **1969**, *43*, 343–353. [\[CrossRef\]](#)
31. Chatzi, A.; Manganas, P.; Tokatlidis, K. Oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space: A regulated process important for cell physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863* Pt A, 1298–1306. [\[CrossRef\]](#)
32. Kagan, V.E.; Tyurin, V.A.; Jiang, J.; Tyurina, Y.Y.; Ritov, V.B.; Amoscato, A.A.; Osipov, A.N.; Belikova, N.A.; Kapralov, A.A.; Kini, V.; et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 223–232. [\[CrossRef\]](#)
33. Tsukamoto, H.; Horne, W.; Kamimura, S.; Niemelä, O.; Parkkila, S.; Ylä-Herttuala, S.; Brittenham, G.M. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 620–630. [\[CrossRef\]](#)
34. Islinger, M.; Lüders, G.H.; Li, K.W.; Loos, M.; Voölkl, A. Rat Liver Peroxisomes after Fibrate Treatment: A Survey using quantitative mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23055–23069. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Wiese, S.; Gronemeyer, T.; Ofman, R.; Kunze, M.; Grou, C.P.; Almeida, J.A.; Eisenacher, M.; Stephan, C.; Hayen, H.; Schollenberger, L.; et al. Proteomics Characterization of Mouse Kidney Peroxisomes by Tandem Mass Spectrometry and Protein Correlation Profiling. *Mol. Cell. Proteom.* **2007**, *6*, 2045–2057. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Wahl, B.; Reichmann, D.; Niks, D.; Krompholz, N.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Messerschmidt, T.; Rothkegel, M.; Biester, H.; Hille, R.; et al. 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. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37847–37859. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Palmer, T.; Santini, C.-L.; Iobbi-Nivol, C.; Eave, D.J.; Boxer, D.H.; Giordano, G. Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Biol.* **1996**, *20*, 875–884. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Stewart, V.; MacGregor, C.H. Nitrate Reductase in *Escherichia coli* K-12: Involvement of chlC, chlE, and chlG Loci. *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 788–799. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Guilbault, G.G.; Brignac, P.J., Jr.; Juneau, M. New substrates for the fluorometric determination of oxidative enzymes. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 1256–1263. [\[CrossRef\]](#)
40. Ran, F.A.; Hsu, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D.A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2281–2308. [\[CrossRef\]](#)
41. Struhl, K. Subcloning of DNA Fragments. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **1991**, *13*, 3.16.1–3.16.2. [\[CrossRef\]](#)
42. Ladner, C.L.; Yang, J.; Turner, R.J.; Edwards, R.A. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 13–20. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4 Hydroxyurea

4.1 Einleitung

Das Manuskript wurde im Mai 2024 im *Journal of Medicinal Chemistry* eingereicht und befindet sich im Revisions-Prozess.

Hepatic mARC1 is the main contributor to metabolic reduction of N-hydroxyurea.

Cathrin Klopp, Xiaomei Zhang, Morgan K Campbell, David Kvaskoff, Michel A Struwe, Curtis R Warren, Besnik Bajrami, Axel J Scheidig, Amanda K Jones and
Bernd Clement

Hydroxyharnstoff (NHU – *N-hydroxyurea*) wird bereits seit den 1960er Jahren medizinisch angewendet. Ursprünglich wurde es als Mittel gegen Leukämie entdeckt (Stearns et al., 1963). Aufgrund der antiproliferativen Eigenschaften wird es seitdem für weitere Indikationen eingesetzt (Boyd and Neldner, 1991; Gibbs and Sorensen, 2000; Rankine-Mullings and Nevitt, 2022). Neben chronischer myeloischer Leukämie (CML) wird es vor allem bei Sichelzellanämie angewendet (Boyd and Neldner, 1991; Rankine-Mullings and Nevitt, 2022). Aber auch bei essentieller Thrombozythämie und Polycythämie vera ist es indiziert (Boyd and Neldner, 1991; Stegelmann et al., 2008). Bei allen Indikationen ist auffällig, dass mit 15-30 mg/kg Körpergewicht eine sehr hohe Dosis für eine therapeutische Wirksamkeit appliziert werden muss. Die Metabolisierung ist noch nicht vollständig verstanden. Bisher sind überwiegend die Metabolisierung von Hydroxyharnstoff zu Kohlenstoffdioxid, Stickstoffmonoxid und Ammonium sowie die Metabolisierung zu Harnstoff bekannt. Bei der Reduktion von NHU zu Harnstoff wurde bisher kein enzymatischer Mechanismus postuliert. Dass der im Urin zu findende Harnstoff ein Metabolit aus dem applizierten Hydroxyharnstoff ist, wurde anhand von mit ¹⁴C-Hydroxyharnstoff behandelten Nagetieren entdeckt, da ein Teil als ¹⁴C-markierter Harnstoff wieder ausgeschieden wurde (Adamson et al., 1965).

Dieses Paper zeigt erstmalig eine Übereinstimmung zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten bei der Metabolisierung von NHU zu Harnstoff durch das mARC-Enzymsystem. Diese Reduktion geht mit einer Inaktivierung von Hydroxyharnstoff einher und ist eine potentielle Ursache für die notwendige Applikation hoher Dosen.

4.2 Publikation

Journal of Medicinal Chemistry

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Hepatic mARC1 is the main contributor to metabolic reduction of N-hydroxyurea

Journal:	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Klopp, Cathrin; Kiel University, Zoologisches Institut, Strukturbioogie Zhang, Xiaomei; Boehringer Ingelheim Corp USA, Department of Cardiometabolic Disease Research Campbell, Morgan; Boehringer Ingelheim Corp USA, Department of Cardiometabolic Disease Research Kvaskoff, David; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH and Co KG Forschungs- und Entwicklungs-Standort Biberach, Department of Drug Discovery Sciences, Discovery Science Technologies Struwe, Michel; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Structural Biology Warren, Curtis; Boehringer Ingelheim Corp USA, ; Department of Cardiometabolic Disease Research Bajrami, Besnik; Boehringer Ingelheim Pharmaceutical Research and Development Centre Biberach, Department of Drug Discovery Sciences, Discovery Science Technologies Scheidig, Axel; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Sektion Biologie, Zoologisches Institut, Strukturbioogie Jones, Amanda; Boehringer Ingelheim Corp USA Clement, Bernd; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Pharmaceutical Institute

SCHOLARONE™
Manuscripts

Hepatic mARC1 is the main contributor to metabolic reduction of *N*-hydroxyurea.

Cathrin Klopp^{1,2†}, Xiaomei Zhang^{3†}, Morgan K Campbell³, David Kvaskoff⁴, Michel A Struwe^{1,2}, Curtis R Warren³, Besnik Bajrami⁴, Axel J Scheidig¹, Amanda K Jones³ and Bernd Clement^{2*}

¹ Zoological Institute – Structural Biology, Kiel University, 24118 Kiel, Germany

² Pharmaceutical Institute – Medicinal Chemistry, Kiel University, 24118 Kiel, Germany

³ Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc, Ridgefield, Connecticut; Department of Cardiometabolic Disease Research

⁴ Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Biberach an der Riss, Germany; Department of Drug Discovery Sciences, Discovery Science Technologies (DK, BB)

*Authors to whom correspondence should be addressed

Email: b.clement@pharmazie.uni-kiel.de

†These authors contribute equally

Abstract

N-Hydroxyurea has been known since the 1960s as an antiproliferative drug, and is used both in oncology and for treatment of hematological disorders such as sickle-cell anemia where very high daily doses are administered. It is assumed that the cellular effect of *N*-hydroxyurea is caused by inhibition of ribonucleotide reductase, while alternative mechanisms, e.g., generation of nitric oxide, have also been proposed. Despite the many therapeutic applications, the metabolism of hydroxyurea is largely unexplored. The major elimination pathway of *N*-hydroxyurea is the reduction to urea. Since the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is known for its *N*-reductive activity, we investigated the reduction of NHU by this enzyme system. This study presents *in-vitro* and *in-vivo* evidence that this reductive biotransformation is specifically mediated by the mARC1 in the liver. Inactivation by mARC1 is a possible explanation for the administration of high doses of NHU required for treatment.

Introduction

N-hydroxyurea (NHU), also known as hydroxycarbamide, is a well-known drug substance that is approved for use in different types of cancer since. The anti-tumor activities of NHU were first discovered in the 1960s, when Stearns *et al.* found the substance to be effective against leukemia.¹ The main mechanism of NHU antiproliferative activity is believed to be inhibition of ribonucleotide reductase (RNR) catalyzing the last step for synthesis of DNA building blocks, the removal of the 2'-hydroxy group at the ribose moiety. This is presumably achieved by scavenging a catalytically important tyrosyl radical at the enzyme's active site.^{2, 3} RNR is essential for synthesis of deoxyribonucleotides from ribonucleotides. Consequently, inhibition of RNR leads to decreased synthesis of DNA.⁴ Alternative mechanisms for the inhibition of cell replication by NHU have been subject of a recent review article.⁵

The first patients with CML (chronic myelogenous leukemia) were already treated with NHU in the 1960s, so the proliferation-

inhibiting effect has been used for a long time.⁶ Hydroxyurea is also approved for use in non-oncological diseases including sickle cell disease (SCD). A first clinical trial showing increased fetal hemoglobin and total hemoglobin in patients with SCA upon administration of NHU was reported in 1984,⁷ and a number of clinical trials have confirmed the beneficial effects of NHU treatment in SCA since.⁸ Administration of NHU is indicated for patients with multiple episodes of severe acute pain or acute chest syndrome,⁹ as these complications of SCA are reduced significantly by NHU administration.¹⁰ Long-term studies further showed that in addition to a decrease in painful episodes and acute chest syndrome, NHU treatment is able to reduce mortality in patients with SCA.^{11, 12} For treatment of SCA, orphan drug status has been granted to NHU in both the United States and the European Union, where it is sold under the commercial names Hydrea® and Xromi®, respectively.¹³

The exact mechanism by which NHU exerts its positive influence on fetal hemoglobin

production in patients with SCD is not completely understood. Possible mechanisms include non-specific interruption of the cell cycle by inhibition of RNR and nitric oxide (NO) signaling.⁹

Potential mutagenic effects of NHU treatment have long been a clinical concern. However, neither pre-clinical nor clinical trials show any mutagenic effect of NHU at pharmacologically relevant doses.¹⁴

NHU is also used in other therapeutic areas like the hematological disease β -thalassaemia.¹⁵ Studies on rodent models furthermore suggest a potentially beneficial effect of NHU in Alzheimer's disease (AD).¹⁶⁻¹⁸

Orally administered NHU is highly bioavailable with the distribution volume roughly equivalent to the total body water, suggesting that tissue and protein binding of NHU is negligible. However, the drug is eliminated quite rapidly with reported half-life times averaging at approx. 2 – 4 hours.¹⁹ NHU doses for SCA-treatment are often escalated to the highest tolerated dose, which was found to be superior to a fixed-dose scheme, with effective usually ranging from 15 – 30 mg \times kg⁻¹ \times day⁻¹.²⁰ Different elimination pathways have been studied in 1965 using ¹⁴C labelled NHU in rodent models. Less than 1 % radioactivity was observed in the feces, while approx. 7 % were expired as carbon dioxide (CO₂). While carbon CO₂ can be formed from NHU by the microbial enzyme urease, expiration of ¹⁴C-labelled carbon dioxide was found to be unchanged in germ-free mice, indicating that the microbiome is not involved in this conversion. However, the vast majority of ¹⁴C radioactivity is recovered in the animals' urine, with a small portion corresponding to carbonate, while the remaining ¹⁴C was identified as either non-metabolized NHU or urea in approximately equal quantities (each amounting to > 30 % of the administered dose).²¹ Colvin *et al.* then reported that NHU was reduced to urea directly in murine liver mitochondria through an unknown enzyme.²² The different elimination pathways of NHU *in-vivo* are depicted in Figure 1.

A likely candidate for reduction of NHU to urea is the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), of which all mammalian genomes encode two paralogues, mARC1 and mARC2 (HUGO gene identifiers *MTARC1*, *MTARC2*). mARC enzymes are part of a three-component enzyme system together with cytochrome b5B (Cyb5B) and NADH-cytochrome b5 reductase 3 (NB5R3) that catalyzes two-electron reduction of various *N*-hydroxylated compounds.²³

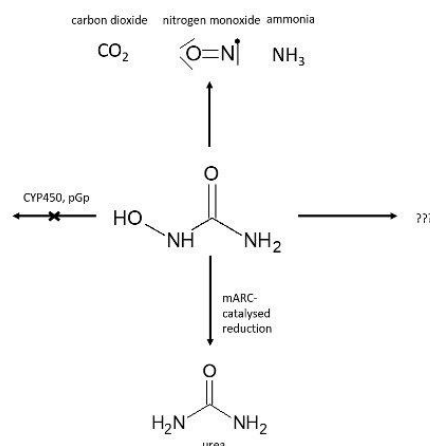


Figure 1: Elimination pathways of NHU

Human mARC enzymes were originally discovered in the early 2000s due to their central role in activation of *N*-hydroxylated prodrugs of amidine-containing drug substances, *i.e.*, inhibitors of serine proteases involved in the coagulation.^{24, 25} The first FDA-approved representative of novel oral anticoagulant (NOACs), ximelagatran, relies on mARC for release of the active form melagatran after intestinal absorption.²⁶

The human mARC enzymes have been investigated extensively over the past years and many *N*-oxygenated compounds have been found to be mARC substrates.^{23, 25} In general, the two mARC paralogues have largely overlapping substrate specificities with very few compounds displaying a strong specificity for either mARC1 or mARC2. An exception are *N*-oxides, which are reduced exclusively by mARC1.^{27, 28}

In recent years, mARC enzymes have again become of great interest due to potential involvement in lipid metabolism and pathogenesis of liver diseases associated with hepatic accumulation of triglycerides, *i.e.* metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH).²⁹⁻³¹ Although the depletion of mARC1 in the liver unambiguously alleviates lipid accumulation and MASLD-related symptoms,³² its exact role in lipid metabolism remains unclear, and multiple pharmaceutical companies have now registered patents for liver-specific siRNA-based knockdown of mARC1.²⁵ The first clinical trial investigating the safety, tolerability and pharmacokinetics of a siRNA-based drug

targeting mARC1 in hepatocytes has already been initiated (NCT05599945).³³

In this study, we show that NHU is specifically reduced to urea by hepatic mARC1, while the contribution of mARC2 towards NHU reduction is likely negligible. This is demonstrated by both *in-vitro* enzyme activity assays and by *in-vivo* studies using murine *Mtarc1* knockout and

hepatocyte-specific knockdown models. So far, no individual NHU-metabolizing enzyme has been described. This is the first study to identify mARC1 as an enzyme responsible for biotransformation of *N*-hydroxyurea based on *in-vitro* and *in-vivo* studies. The high specificity of this reaction for mARC1 rather than mARC2 suggests the possibility to use NHU reduction as an *in vivo* biomarker for mARC1 activity.

Results

mARC1 but not mARC2 reduces NHU. Using our previously described *in-vitro* activity assay with recombinant mARC1, mARC2, CYB5B and NB5R3 proteins,³⁴ we demonstrate that recombinant human mARC1 can, in concert with its electron transport partners CYB5B and NB5R3, reduce NHU with kinetics obeying the Michaelis-Menten equation. The K_M value of this reduction is approx. 7 mM, while the V_{max} was determined to be approx. $0.49 \mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. In contrast, recombinant mARC2 shows much lower activity. From fitting to the Michaelis-Menten equation, the K_M value is estimated to be approx. 300 mM and V_{max} approx. $0.25 \mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. However, the fitted values for NHU reduction by mARC2 have a high uncertainty, as the enzyme was not nearly saturated even at the highest NHU concentration tested in our assays. Regardless, at biologically relevant concentrations, mARC1 and not mARC2 would be the enzyme responsible for reduction of this substrate. Michaelis-Menten curves are plotted in Figure 2.

mARC1 *in-vivo* expression systems: To test the *in vivo* metabolism of NHU, we used both therapeutic and genetic approaches to modulate mARC1 in mice. Treatment of mice with an *N*-acetylgalactosamine (GalNAc)-conjugated short interfering RNA (siRNA) (GalNAc-siMtarc1) produced a dose-dependent reduction in hepatic *Mtarc1* mRNA and protein abundance (Figure 3). Similarly, a genotype-dependent reduction in hepatic mARC1 protein abundance was observed in *Mtarc1* wild-type, knockout, or heterozygote (*Mtarc1*^{+/+}, *Mtarc1*^{+/-}, and *Mtarc1*^{-/-}) mice (Figure 3). Hepatic expression of *Mtarc2* mRNA was not changed in either the GalNAc siRNA-treated or genetically modified *Mtarc1* systems (Supplementary Figure S1).

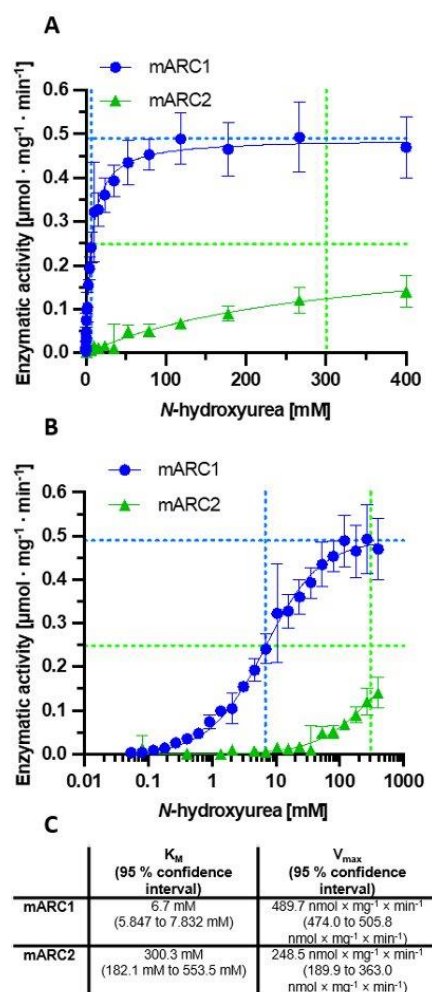


Figure 2: Michaelis-Menten kinetics for the reduction of *N*-hydroxyurea by human mARC1 and mARC2. Panel A: linear plot. Panel B: logarithmic (Boltzmann-like) plot. Dashed vertical lines represent K_M values, dashed horizontal lines represent V_{max} values. Panel C: K

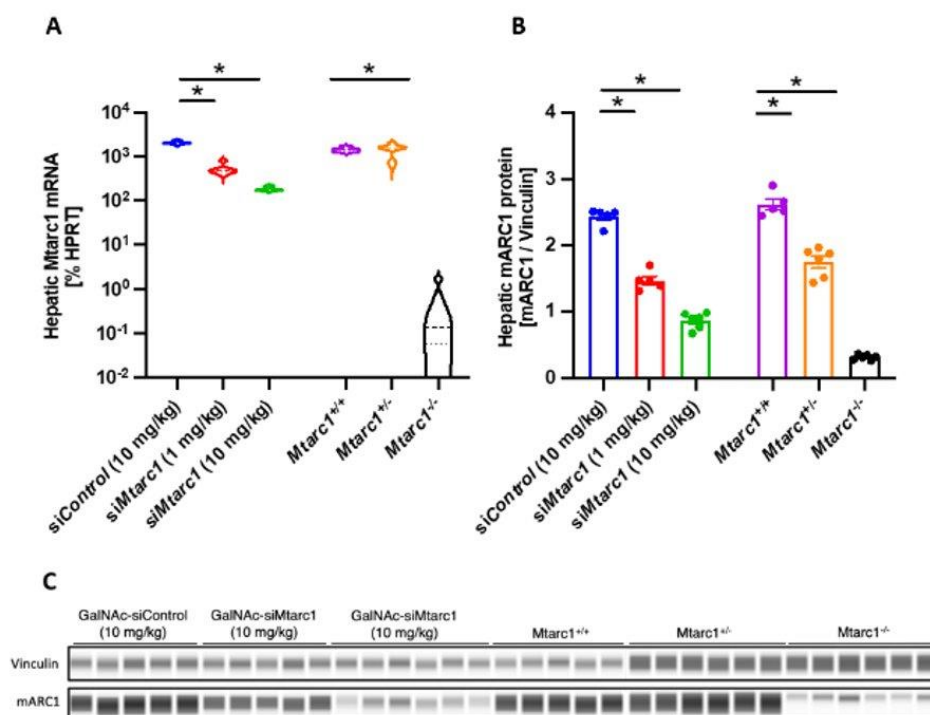


Figure 3: Quantification of *Mtarcl1* in GalNAc-siRNA treated or genetically modified mice. Panel A. Hepatic *Mtarcl1* mRNA quantified by qPCR. Panel B. Ratio of hepatic mARC1 protein to vinculin quantified by immunoblotting. Panel C. Western blot bands for vinculin and mARC1.

Hydroxyurea biotransformation: To demonstrate the role of mARC1 in hydroxyurea metabolism, plasma abundance of ¹³C,¹⁵N-NHU was measured across *in vivo* mice systems with hepatic *Mtarcl1* knock-down or knock-out. Plasma concentrations of ¹³C,¹⁵N-NHU were retained with *Mtarcl1* knock-down via GalNAc-targeting and the resulting product formation of ¹³C,¹⁵N-urea was reduced in these mice (Figure 4). In *Mtarcl1*^{-/-} mice, plasma abundance of ¹³C,¹⁵N-NHU was retained and formation of ¹³C,¹⁵N-urea was reduced compared with *Mtarcl1*^{+/+} mice (Figure 4). Mice with one *Mtarcl1* allele (*Mtarcl1*^{+/-}) maintained similar ¹³C,¹⁵N-NHU levels as *Mtarcl1*^{+/+} mice (Figure 4). An inverse relationship of *Mtarcl1* abundance and the plasma retention of ¹³C,¹⁵N-hydroxyurea was observed at both the mRNA ($R^2 = 0.89$) and protein ($R^2 = 0.79$) level (Figure 4).

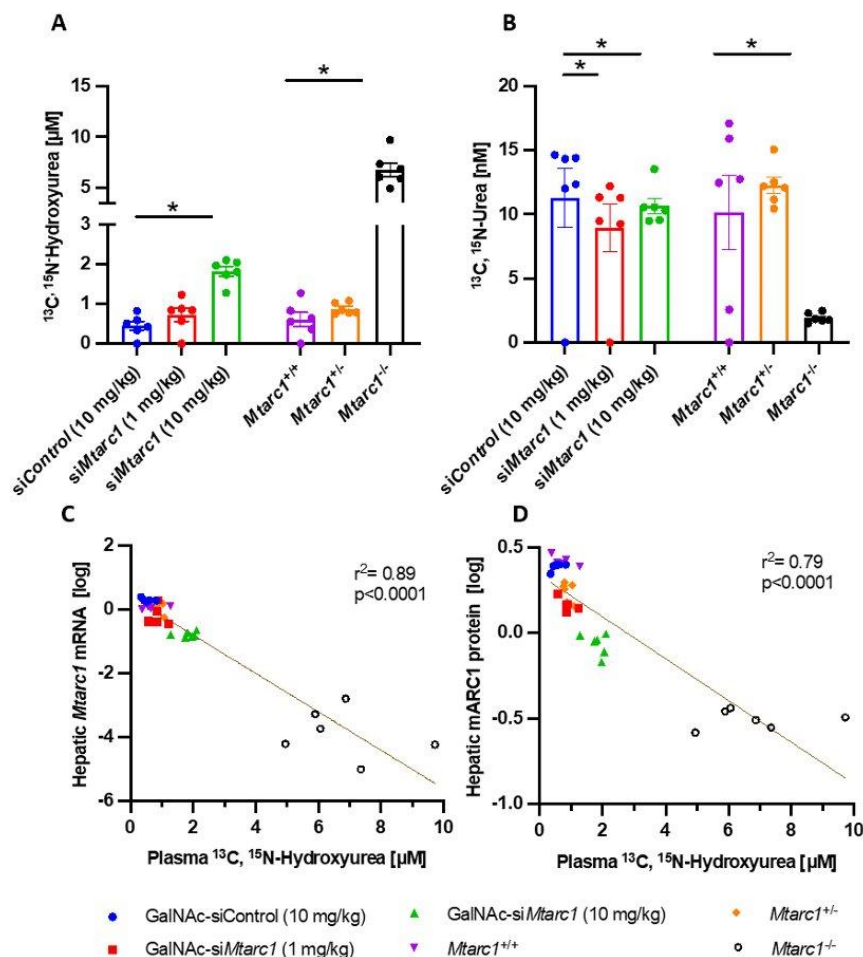


Figure 4: Quantification of ^{13}C - ^{15}N -labelled NHU and urea in murine plasma 15 minutes after bolus application. **Panel A:** ^{13}C - ^{15}N -NHU plasma concentration. **Panel B:** ^{13}C - ^{15}N -Urea plasma concentration. **Panel C:** Correlation between hepatic Mtarc1 mRNA abundance and plasma ^{13}C - ^{15}N -NHU concentrations. **Panel D:** Correlation between hepatic mARC1 protein abundance and ^{13}C - ^{15}N -NHU plasma concentrations.

Discussion

While the hepatic reduction of *N*-hydroxyurea to urea has been previously described as the main biotransformation pathway for this drug substance, it has so far never been shown which specific enzyme is responsible for this reaction. Endogenous synthesis of NHU occurs in various species through arginase converting *N*^ω-hydroxy-L-arginine to NHU and ornithine.³⁵ The data presented here demonstrate that hepatocyte mARC1 is the main catalyst for

metabolic NHU reduction to urea. NHU has not only been used successfully in the treatment of hematological diseases since the 1960s, but is also being considered for additional indications. The key role of hepatic mARC1 in elimination of NHU has important implications for its clinical use. For example, nonsense variants of mARC1 like Arg200Ter and Arg300Ter do occur in different populations,^{29, 36} and carriers of these variants can be expected to display

dramatically decreased rates of NHU elimination. Additionally, potential future therapeutic agents for prevention or treatment of liver diseases by targeting hepatic mARC1, either by siRNA approaches, Proteolysis targeting chimeras (PROTAC) or traditional small-molecule inhibitors can be expected to increase blood levels of NHU in patients who are treated with this drug. This potential for interaction must be considered early on in clinical development projects.

In this study, we found that NHU is reduced by mARC1 with a very low K_M value, while mARC2 has an approx. 40 times higher K_M value and also lower turnover rates. The bolus dose administered in our *in-vivo* experiments was $100 \mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1}$, which corresponds to $7.6 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, which is roughly equivalent to a single dose administered to a patient with sickle cell disease. In our present study, 15 minutes after injection, low micromolar NHU concentrations were found in the animal's blood plasma. Given that the K_M value of mARC2 for NHU reduction is in the high millimolar range, we assume that mARC2 would have no relevant role in NHU metabolism *in-vivo*.

The difference in NHU reduction catalyzed by mARC1 and mARC2 is somewhat unexpected, as most *N*-hydroxylated substances are reduced with similar kinetic parameters by both mARC1 and mARC2,²³ a notable exception being *N*-oxides.^{27, 28} In contrast to other molybdenum-containing enzymes, e.g. sulfite oxidase, the crystal structure of mARC1 shows the enzyme not having a well-defined substrate binding pocket.³⁷ Instead, the catalytic molybdenum ion is highly solvent-exposed.²³ This structural feature makes the highly different affinities of NHU to mARC1 and mARC2 even more surprising as it is hard to explain this difference in affinity by any specific interaction between the enzyme's active sites and the substrate. It appears that substrate recognition in mARC enzymes is driven solely by the chemical properties of the molybdenum active site, e.g. the redox potential, which was found to be different in mARC1 and mARC2.³⁸

Conclusion

The *in-vitro* and *in-vivo* studies presented here demonstrate that hepatic mARC1 is the main contributor to reductive NHU metabolism, while the contribution of mARC2 appears to be negligible. This finding is somewhat surprising as previous results indicated a large overlap

As shown by the correlation of hepatic *Mtarc1* mRNA and mARC1 protein with plasma levels of NHU in the murine models, (Figure 4), it is possible to indirectly detect and quantify hepatic mARC1 activity *in-vivo* by monitoring NHU levels in blood plasma after an NHU bolus application. As the physiological substrate of mARC enzymes remains unknown, the concept of using exogenous substrates like NHU as marker substances for *in-vivo* studies could provide a surrogate biomarker approach for target expression. For many other candidate biomarker molecules, the largely overlapping substrate profiles of mARC1 and mARC2 would complicate this approach, unless both paralogues were to be targeted. While it appears that both mARC1 and mARC2 are involved in lipid metabolism in some capacity,²³ the protein variants of mARC1 A165T, for example, have been identified as beneficial in liver disease by genome-wide association studies. Carrying this variant is associated with an improved lipid profile and a corresponding protective effect against MASLD and MASH.^{23, 32} Therefore, specific targeting of mARC1 appears to be a more desirable approach at this stage for treatment in liver diseases.

The high specificity of NHU for mARC1 makes it suitable for monitoring mARC1 activity. At the same time, we acknowledge that NHU is an active drug that has effects in patients, including many adverse effects, implying that this particular compound might not be suitable for studies with human subjects. Nonetheless, the example of NHU shows that highly specific mARC1 substrates readily reduced at detectable rates do exist. Other – yet to be discovered – specific mARC1 substrates with a high mARC1 specificity could prove very useful tool compounds in mARC research. The existence of highly specific mARC1 substrates further indicates that specific inhibitors of mARC1, which could serve as therapeutic drugs, are feasible in principle.

between the substrate spectra of both mARC paralogues.

The crucial role of mARC1 in elimination of NHU should be taken into account with respect to known mARC1 polymorphisms and potential future drug therapies targeting mARC1.

siRNA-mediated knockdown of *MTARC1* expression in hepatocytes has been proposed as a strategy for prevention or treatment of liver diseases like MASH. Our study demonstrates

that the concentration of highly selective mARC1 substrates in blood plasma can serve as a proxy for hepatic mARC1 activity, which correlates well with *MTARC1* mRNA and mARC1 protein levels in hepatocytes.

Materials and Methods

Purity statement. All chemical compounds are $\geq 98\%$ pure, in case of isotopic purity is $\geq 99\%$ by NMR and MS analysis.

Ethics Statement. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals (Ridgefield, CT, USA) which is accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). All animal procedures are reported according to the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines.³⁹ All animals were housed on a 12:12 hour light-dark cycle with all compound treatments and tissue collection occurring during the light cycle. Animals were socially housed with ad lib access to food and water with bedding, shelters, and nesting supplies or chewing sticks for enrichment.

Recombinant protein production. Recombinant human mARC1, mARC2, CYB5B and NB5R3 proteins were expressed in *Escherichia coli* TP1000⁴⁰ and *Escherichia coli* DL41⁴¹ and subsequently purified by affinity chromatography essentially as described previously.⁴²

In-vitro enzyme activity assays. Kinetic parameters of the mARC-catalyzed reduction of NHU to urea were determined using a fluorescence-based activity assay.⁴¹ Briefly, a serial dilution series with a dilution factor of 0.67 were incubated in a 75 μ L assay volume with 9.75 μ g of mARC1 or mARC2, 9.75 pmol Cyb5R3 (FAD) and 97.5 pmol Cyb5B (heme) and 1 mM NADH cosubstrate in 20 mM MES buffer pH 6.0 at 37 °C. Enzymatic activity was measured through the decay in NADH fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 465$ nm).

The product of the reaction was confirmed to be urea by a secondary chemical assay (Sigma Aldrich #MAK410) based on the reaction of urea with o-phthalaldehyde and *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine (*data not shown*).⁴³

Mtarc1 genetic mice. Mice with constitutive knock-out of the *Mtarc1* gene (NCBI Transcript NM_001290273.1) were generated via

CRISPR/Cas9 gene editing using C57BL/6NTac background at Taconic Biosciences, Inc. (Rensselaer, NY). Male *Mtarc1*^{+/+}, *Mtarc1*^{+/-}, and *Mtarc1*^{-/-} mice were generated as littermates (10-12 weeks old) for these study purposes.

GalNAc-siMtarc1. *N*-acetylgalactosamine conjugated short interfering RNA (*GalNAc-siRNA*) tools were designed and synthesized at Axolabs GmbH (Kulmbach, Germany) as previously described.³² Male C57BL/6NTac mice ($n=5-6$ /group, 10-12 weeks old) received a single injection of 1 or 10 mg·kg⁻¹ s.c. *GalNAc-siMtarc1* or *GalNAc-siControl* seven days prior to performing the biotransformation study to achieve hepatocyte-specific knock-down.

Hydroxyurea biotransformation. ¹³C,¹⁵N-Hydroxyurea (Toronto Research Chemicals, Toronto, ON; Catalog H991002, Lot 4-ESL-42-3) was prepared in saline and administered to mice as a bolus of 100 μ mol/kg at 10 ml/kg via *i.v.* tail injection. Fifteen minutes later, mice were euthanized by cardiac puncture and exsanguination under anesthesia. Whole blood was processed to plasma by centrifugation in EDTA tubes and liver was dissected and snap frozen into liquid nitrogen. Samples were stored at -80 °C for analyses.

Detection by mass-spectrometry. Plasma detection of the substrate ¹³C,¹⁵N-Hydroxyurea and product ¹³C,¹⁵N-Urea was performed by PharmaCadence Analytical Services, LLC (Hatfield, PA). Standards of ¹³C,¹⁵N-Hydroxyurea (*N*-hydroxyurea-¹³C,¹⁵N₂, CAS-Nr. 1246814-92-5) and ¹³C,¹⁵N-Urea (urea-¹³C,¹⁵N₂; CAS-Nr. 58069-83-3) were purchased from LGC Standards Ltd., USA. The internal standard urea-¹³C,¹⁵N₂,¹⁸O (Catalog CNOLM-8871-PK) was purchased from Cambridge Isotopes Laboratories, Tewksbury, MA. Plasma (5 μ L) mixed with internal standard (5 μ L), was precipitated with 6 volumes of methanol/acetonitrile at -70 °C, and the supernatant diluted 10-fold with acetonitrile containing 0.1% formic acid. An aliquot (10 μ L) was analyzed by HILIC chromatography, and analytes were measured in positive

electrospray on a triple quadrupole mass spectrometer (Agilent 6495 LC-MS) in MRM acquisition mode: $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Hydroxyurea (m/z 80.0 to 46.3), $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Urea (m/z 64.3 to 46.3) and internal standard (m/z 66.3 to 48.3). A calibration in plasma was linear up to 3125 nM, with a lower limit of quantification of 12.5 and 3.125 nM for $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Hydroxyurea and $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Urea, respectively.

Hepatic *Mtarc1* expression. Hepatic mRNA and protein were detection of *Mtarc1* was performed as previously described (Jones et al., 2023). Primers targeting *Mtarc1* (Mm01315446_m1) and *Hprt* (Mm03024075_m1) were obtained from Thermo Fisher Scientific (New York, NY). A poly-clonal antibody targeting mARC1 was developed with a novel rabbit immunization

campaign as previously published and validated.³² Antibodies targeting *Mtarc2* (Sigma HPA017572, Lot A106167) and Vinculin (ab129002, Lot GR32702836,) were obtained from Sigma (St. Louis, MO) and Abcam (Waltham, MA), respectively.

Data analysis. All data were analyzed using GraphPad Prism, Version 9 (La Jolla, CA) and Excel 2019 (Microsoft, Inc.). Group comparisons were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's comparison relative to either the GalNAc-siControl or *MTARC1*^{+/+} group. Simple linear regressions were performed using log-transformed expression data. Data are presented as mean \pm SE with individual data points represented. Significance is considered at $p < 0.05$.

Abbreviations. AD - Alzheimer disease, Cyb5B cytochrome b5B, FDA - Food and Drug Administration, mARC - mitochondrial amidoxime reducing component, NB5R3 - NADH cytochrome b5 reductase 3, NHU - *N*-hydroxyurea, NO - nitric oxide, NOAC - Non-Vitamin K oral vitamin K anticoagulant, MASLD = metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASH - metabolic-associated steatohepatitis, RNR - ribonucleotide reductase, SCD - sickle cell disease, PROTAC - Proteolysis targeting chimera

Author Contributions. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. C.K. and X.Z. contribute equally.

Funding. This work was supported by Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Ridgefield, CT, USA, and Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Biberach an der Riss, Germany. All authors are presently employed by or have received research funding from Boehringer Ingelheim. M.A.S. acknowledges financial support by the Add-On-Fellowship program of the Joachim Herz Foundation.

Acknowledgements. The authors thank Taconic Biosciences, Inc. (Rensselaer, NY) for the generation and maintenance of the *Mtarc1* genetic colony, and Guille Metzler for bioanalysis support PharmaCadence Analytical Services, LLC (Hatfield, PA). The authors furthermore gratefully acknowledge access to the BiMo/LMB core facilities at Kiel University as well as technical support from Brigitte Bittner.

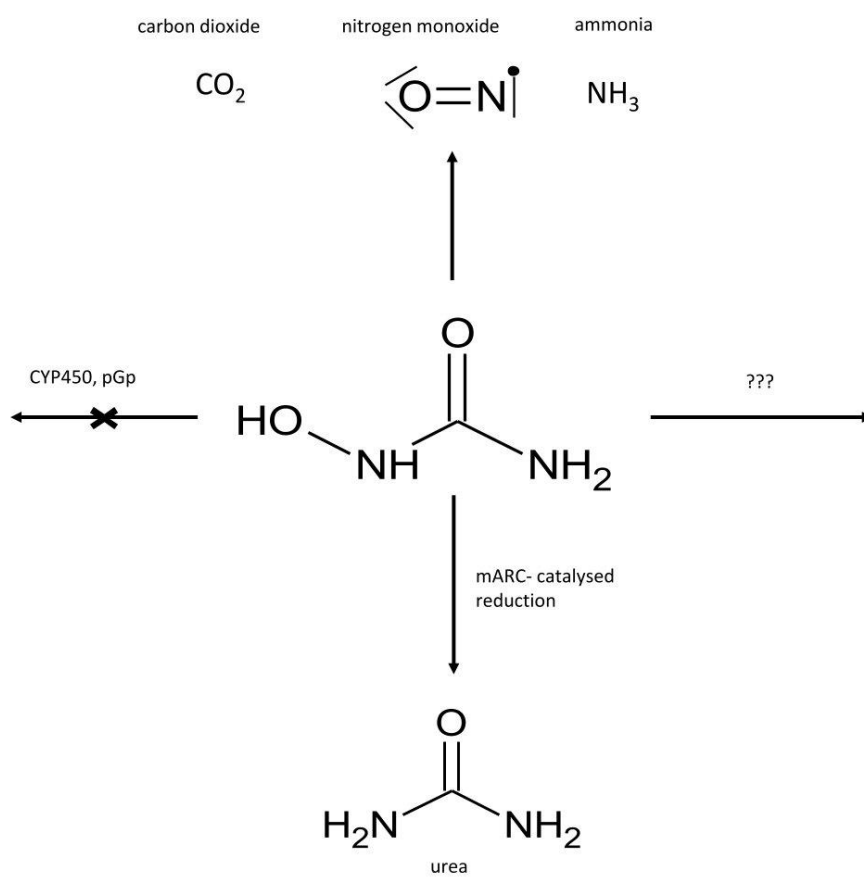
References

- (1) Stearns, B.; Losee, K. A.; Bernstein, J. Hydroxyurea. A New Type of Potential Antitumor Agent. *J. Med. Chem.* **1963**, 6 (2), 201-201. DOI: 10.1021/jm00338a026.
- (2) Ehrenberg, A.; Reichard, P. Electron Spin Resonance of the Iron-containing Protein B2 from Ribonucleotide Reductase. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247 (11), 3485-3488. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)45166-1.
- (3) Lassmann, G.; Thelander, L.; Gräslund, A. EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein r2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1992**, 188 (2), 879-887. DOI: 10.1016/0006-291X(92)91138-G.
- (4) Koç, A.; Wheeler, L. J.; Mathews, C. K.; Merrill, G. F. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (1), 223-230. DOI: 10.1074/jbc.M303952200.
- (5) Musialek, M. W.; Rybaczek, D. Hydroxyurea-The Good, the Bad and the Ugly.

- Genes (Basel)* **2021**, *12* (7). DOI: 10.3390/genes12071096.
- (6) Kennedy, B. J. Hydroxyurea in Chronic Myelogenous Leukemia. *Ann. Intern. Med.* **1969**, *70* (5), 1084-1085. DOI: 10.7326/0003-4819-70-5-1084_3 (accessed 2024/05/14).
- (7) Platt, O. S.; Orkin, S. H.; Dover, G.; Beardsley, G. P.; Miller, B.; Nathan, D. G. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J. Clin. Invest.* **1984**, *74* (2), 652-656. DOI: 10.1172/Jci111464.
- (8) Rankine-Mullings, A. E.; Nevitt, S. J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2022**, *9* (9), Cd002202. DOI: 10.1002/14651858.CD002202.pub3.
- (9) Rees, D. C. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease. *Haematologica* **2011**, *96* (4), 488-491. DOI: 10.3324/haematol.2011.041988.
- (10) Charache, S.; Terrin, M. L.; Moore, R. D.; Dover, G. J.; Barton, F. B.; Eckert, S. V.; McMahon, R. P.; Bonds, D. R. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332* (20), 1317-1322. DOI: 10.1056/nejm199505183322001.
- (11) Steinberg, M. H.; Barton, F.; Castro, O.; Pegelow, C. H.; Ballas, S. K.; Kutlar, A.; Orringer, E.; Bellevue, R.; Olivieri, N.; Eckman, J.; et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* **2003**, *289* (13), 1645-1651. DOI: 10.1001/jama.289.13.1645.
- (12) Voskaridou, E.; Christoulas, D.; Bilalis, A.; Plata, E.; Varvagiannis, K.; Stamatopoulos, G.; Sinopoulou, K.; Balassopoulou, A.; Loukopoulos, D.; Terpos, E. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood* **2010**, *115* (12), 2354-2363. DOI: 10.1182/blood-2009-05-221333.
- (13) Ataga, K. I.; Desai, P. C. Advances in new drug therapies for the management of sickle cell disease. *Expert Opin Orphan Drugs* **2018**, *6* (5), 329-343. DOI: 10.1080/21678707.2018.1471983.
- (14) Ware, R. E.; Dertinger, S. D. Absence of hydroxyurea-induced mutational effects supports higher utilisation for the treatment of sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **2021**, *194* (2), 252-266. DOI: 10.1111/bjh.17323.
- (15) Ansari, S. H.; Lassi, Z. S.; Khowaja, S. M.; Adil, S. O.; Shamsi, T. S. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for transfusion-dependent β -thalassaemia. *Cochrane Database Syst Rev* **2019**, *3* (3), Cd012064. DOI: 10.1002/14651858.CD012064.pub2.
- (16) Brose, R. D.; Lehrmann, E.; Zhang, Y.; Reeves, R. H.; Smith, K. D.; Mattson, M. P. Hydroxyurea attenuates oxidative, metabolic, and excitotoxic stress in rat hippocampal neurons and improves spatial memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2018**, *72*, 121-133. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.08.021.
- (17) Yu, Q.; Cheng, X. Hydroxyurea-induced membrane fluidity decreasing as a characterization of neuronal membrane aging in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* **2021**, *13* (9), 12817-12832. DOI: 10.18632/aging.202949.
- (18) Brose, R. D.; Savonenko, A.; Devenney, B.; Smith, K. D.; Reeves, R. H. Hydroxyurea Improves Spatial Memory and Cognitive Plasticity in Mice and Has a Mild Effect on These Parameters in a Down Syndrome Mouse Model. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 96. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00096.
- (19) Ware, R. E.; Despotovic, J. M.; Mortier, N. A.; Flanagan, J. M.; He, J.; Smeltzer, M. P.; Kimble, A. C.; Aygun, B.; Wu, S.; Howard, T.; et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood* **2011**, *118* (18), 4985-4991. DOI: 10.1182/blood-2011-07-364190.
- (20) John, C. C.; Opoka, R. O.; Latham, T. S.; Hume, H. A.; Nabaggala, C.; Kasiye, P.; Ndugwa, C. M.; Lane, A.; Ware, R. E. Hydroxyurea Dose Escalation for Sickle Cell Anemia in Sub-Saharan Africa. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (26), 2524-2533. DOI: 10.1056/NEJMoa2000146.
- (21) Richard, H. A.; Sara, L. A.; Sidney, M. H.; Jack, D. D. The distribution, excretion and metabolism of hydroxyurea-C¹⁴. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1965**, *150* (2), 322.

- (22) Colvin, M.; Bono, V. H., Jr. The enzymatic reduction of hydroxyurea to urea by mouse liver. *Cancer Res.* **1970**, *30* (5), 1516-1519.
- (23) Struwe, M. A.; Scheidig, A. J.; Clement, B. The mitochondrial amidoxime reducing component - from prodrug-activation mechanism to drug-metabolizing enzyme and onward to drug target. *J. Biol. Chem.* **2023**, *299* (11), 105306. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.105306.
- (24) Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (46), 34796-34802. DOI: 10.1074/jbc.M607697200.
- (25) Clement, B.; Struwe, M. A. The History of mARC. *Molecules* **2023**, *28* (12), 4713. DOI: 10.3390/molecules28124713.
- (26) Clement, B.; Lopian, K. Characterization of *in Vitro* Biotransformation of New, Orally Active, Direct Thrombin Inhibitor Ximelagatran, an Amidoxime and Ester Prodrug. *Drug Metab. Disposition* **2003**, *31* (5), 645. DOI: 10.1124/dmd.31.5.645.
- (27) Jakobs, H. H.; Froriep, D.; Havemeyer, A.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Clement, B. The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): involvement in metabolic reduction of *N*-oxides, oximes and *N*-hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem* **2014**, *9* (10), 2381-2387. DOI: 10.1002/cmdc.201402127.
- (28) Schneider, J.; Girreser, U.; Havemeyer, A.; Bittner, F.; Clement, B. Detoxification of trimethylamine *N*-oxide by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component mARC. *Chem. Res. Toxicol.* **2018**, *46* (10), 1396-1402. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00329.
- (29) 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. A missense variant in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 gene and protection against liver disease. *PLoS Genet.* **2020**, *16* (4), e1008629. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008629.
- (30) Schneider, C. V.; Schneider, K. M.; Conlon, D. M.; Park, J.; Vujkovic, M.; Zandvakili, I.; Ko, Y. A.; Trautwein, C.; Center, R.; Carr, R. M.; et al. A genome-first approach to mortality and metabolic phenotypes in *MTARC1* p.Ala165Thr (*rs2642438*) heterozygotes and homozygotes. *Med (N Y)* **2021**, *2* (7), 851-863.e853. DOI: 10.1016/j.medj.2021.04.011.
- (31) Lewis, L. C.; Chen, L.; Hameed, L. S.; Kitchen, R. R.; Maroteau, C.; Nagarajan, S. R.; Norlin, J.; Daly, C. E.; Szczerbinska, I.; Hjuler, S. T.; et al. Hepatocyte mARC1 promotes fatty liver disease. *JHEP Reports* **2023**, *5* (5), 100693. DOI: 10.1016/j.jhepr.2023.100693.
- (32) Jones, A. K.; Bajrami, B.; Campbell, M. K.; Erzurumluoglu, A. M.; Guo, Q.; Chen, H.; Zhang, X.; Zeveleva, S.; Kvaskoff, D.; Brunner, A.-D.; et al. mARC1 in MASLD: Modulation of lipid accumulation in human hepatocytes and adipocytes. *Hepatology Communications* **2024**, *8* (5). DOI: 10.1097/HCG.0000000000000365.
- (33) Lindén, D.; Romeo, S. Therapeutic opportunities for the treatment of NASH with genetically validated targets. *J. Hepatol.* **2023**. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.05.007.
- (34) Klopp, C.; Struwe, M. A.; Plieth, C.; Clement, B.; Scheidig, A. J. New Design of an Activity Assay Suitable for High-Throughput Screening of Substrates and Inhibitors of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC). *Anal. Chem.* **2023**, *95* (33), 12452-12458. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c02109.
- (35) Fraser, D. I.; Liu, K. T.; Reid, B. J.; Hawkins, E.; Sevier, A.; Pyle, M.; Robinson, J. W.; Ouellette, P. H.; Ballantyne, J. S. Widespread Natural Occurrence of Hydroxyurea in Animals. *PLoS One* **2015**, *10* (11), e0142890. DOI: 10.1371/journal.pone.0142890 From NLM Medline.
- (36) Sveinbjornsson, G.; Ulfarsson, M. O.; Thorolfsson, R. B.; Jonsson, B. A.; Einarsson, E.; Gunnlaugsson, G.; Rognvaldsson, S.; Arnar, D. O.; Baldvinsson, M.; Bjarnason, R. G.; et al. Multiomics study of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **2022**, *54* (11), 1652-1663. DOI: 10.1038/s41588-022-01199-5.
- (37) Kubitz, C.; Bittner, F.; Ginsel, C.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Scheidig, A. J. Crystal structure of human mARC1 reveals its exceptional position among eukaryotic molybdenum enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (47), 11958-11963. DOI: 10.1073/pnas.1808576115.

- (38) Zapiter, J.; Harmer, J. R.; Struwe, M.; Scheidig, A.; Clement, B.; Bernhardt, P. V. Enzyme electrode biosensors for *N*-hydroxylated prodrugs incorporating the mitochondrial Amidoxime Reducing Component. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (25), 9208-9215. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c02232.
- (39) Percie du Sert, N.; Hurst, V.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M. T.; Baker, M.; Browne, W. J.; Clark, A.; Cuthill, I. C.; Dirnagl, U.; et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Exp. Physiol.* **2020**, *105* (9), 1459-1466. DOI: 10.1113/EP088870 (accessed 2023/12/13).
- (40) Palmer, T.; Santini, C.-L.; Iobbi-Nivol, C.; Eave, D. J.; Boxer, D. H.; Giordano, G. Involvement of the narJ and mob gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Biol.* **1996**, *20* (4), 875-884. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02525.x.
- (41) Hendrickson, W. A.; Horton, J. R.; LeMaster, D. M. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.* **1990**, *9* (5), 1665-1672. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08287.x.
- (42) Wahl, B.; Reichmann, D.; Nicks, D.; Krompholz, N.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Messerschmidt, T.; Rothkegel, M.; Biester, H.; Hille, R.; et al. 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. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (44), 37847-37859. DOI: 10.1074/jbc.M110.169532.
- (43) Jung, D.; Biggs, H.; Erikson, J.; Ledyard, P. U. New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin. Chem.* **1975**, *21* (8), 1136-1140. DOI: 10.1093/clinchem/21.8.1136.



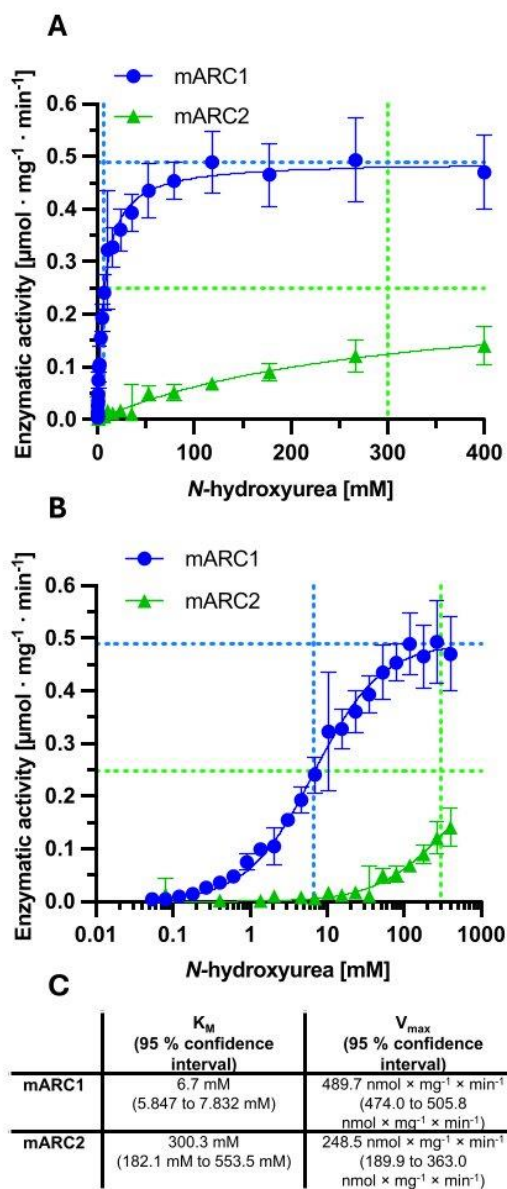


Figure 2. Michaelis-Menten kinetics for the reduction of *N*-hydroxyurea by human mARC1 and mARC2. **Panel A:** linear plot. **Panel B:** logarithmic (Boltzmann-like) plot. Dashed vertical lines represent K_M values, dashed horizontal lines represent V_{max} values. **Panel C:** Kinetic parameters from fitting to the Michaelis-Menten equation.

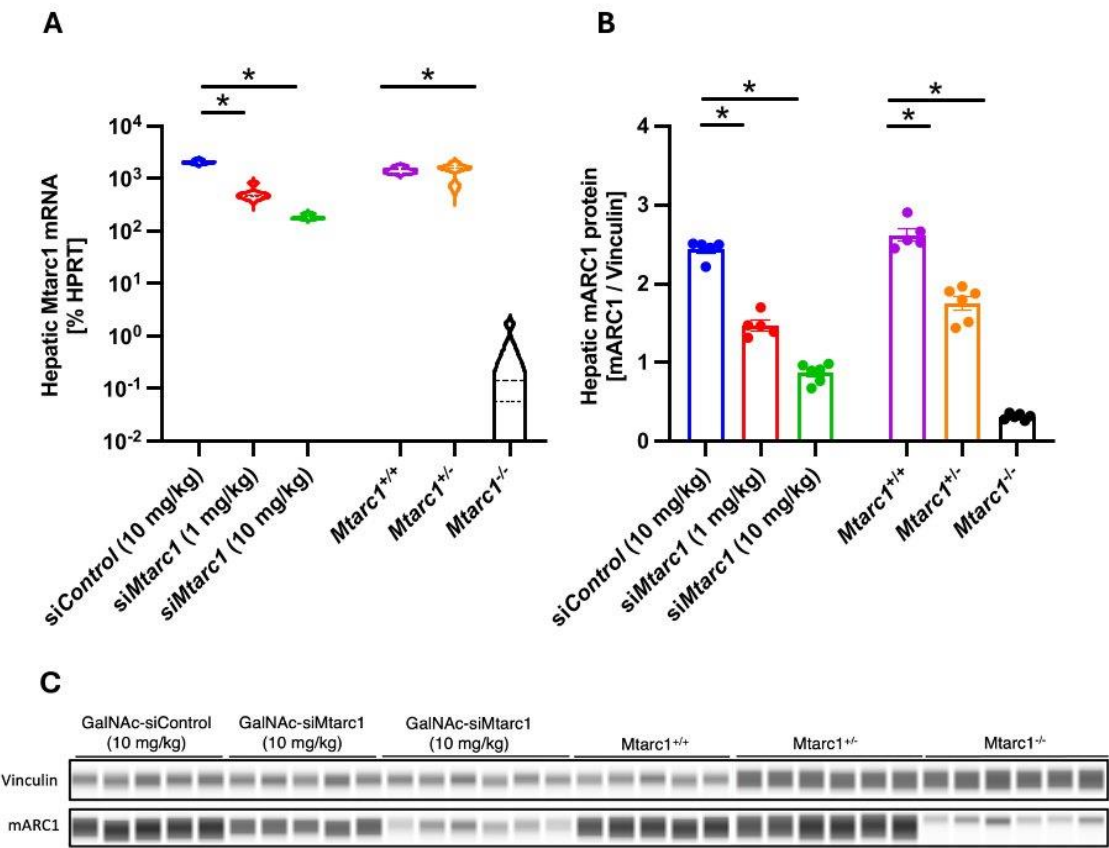


Figure 3. Quantification of *Mtarc1* in GalNAc-siRNA treated or genetically modified mice **Panel A.** Hepatic *Mtarc1* mRNA quantified by qPCR. **Panel B.** Ratio of hepatic mARC1 protein to vinculin quantified by immunoblotting. **Panel C.** Western blot bands for vinculin and mARC1.

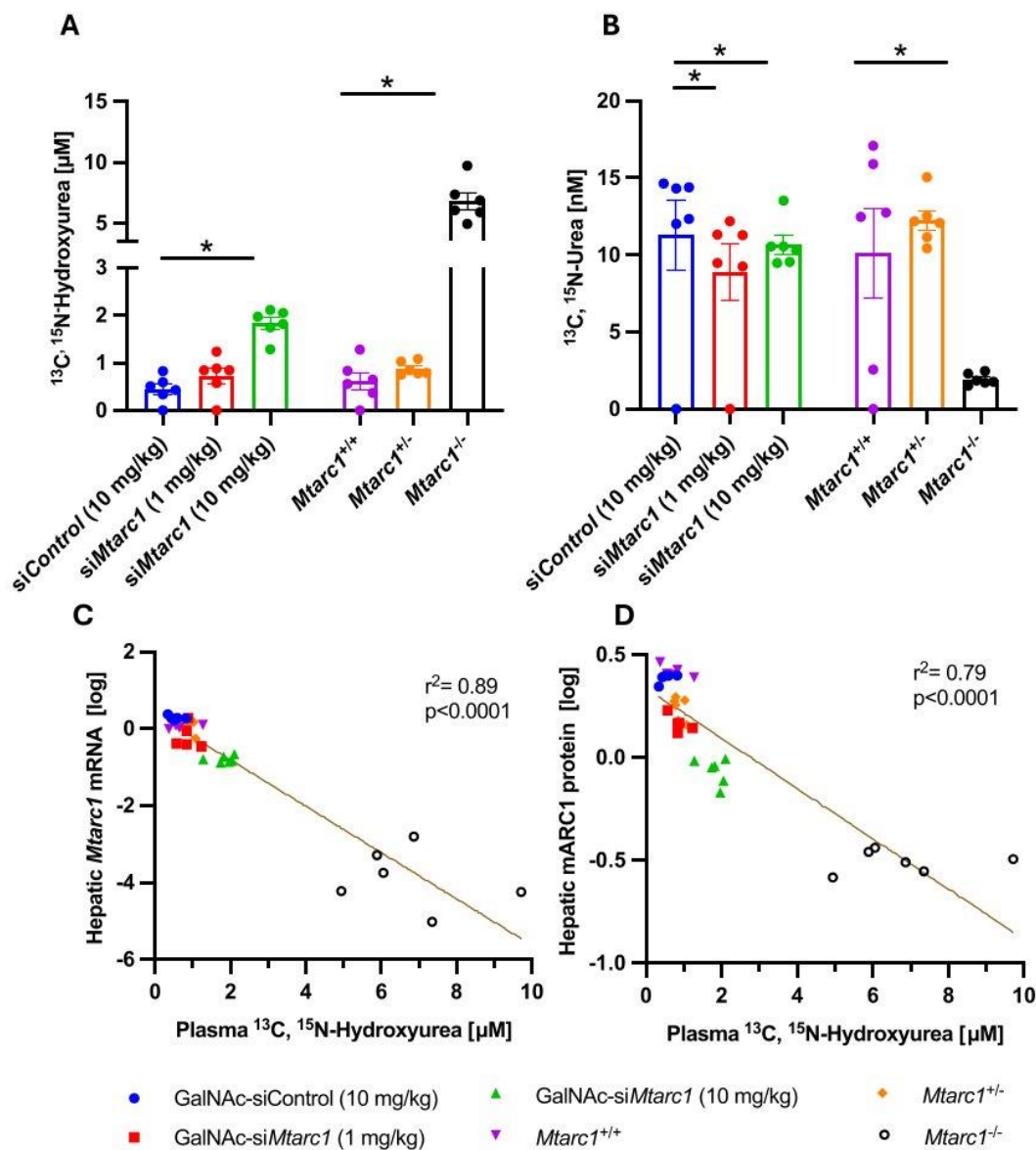
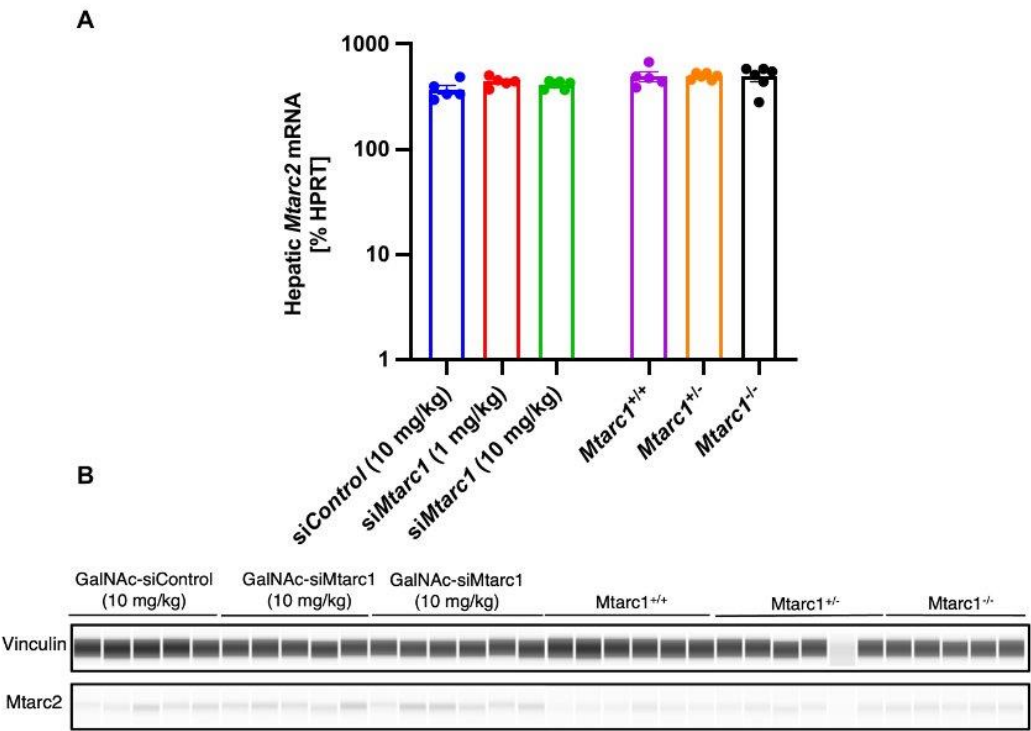


Figure 4. Quantification of ^{13}C - ^{15}N -labelled NHU and urea in murine plasma 15 minutes after bolus application. **Panel A:** ^{13}C - ^{15}N -NHU plasma concentration. **Panel B:** ^{13}C - ^{15}N -Urea plasma concentration. **Panel C:** Correlation between hepatic *Mtarc1* mRNA abundance and plasma ^{13}C - ^{15}N -NHU concentrations. **Panel D:** Correlation between hepatic mARC1 protein abundance and ^{13}C - ^{15}N -NHU plasma concentrations.



Supplementary Figure S1. Hepatic mRNA abundance of *Mtar2* in mice treated with either GalNAc-si*Mtar2* or genetically modified to remove *Mtar2*. **Panel A:** Quantification of mARC2 protein in mouse liver. **Panel B:** Representative immunoblot bands.

5 TMAO Isotopeneffekte

5.1 Einleitung

Isotopeneffekte sind grundsätzlich auf die Eigenschaften der Atomkerne, wie der Masse, dem Spin mit dazugehörigem magnetischen Moment und dem Volumen, zurückzuführen (Buchachenko, 2013). Überwiegend basieren diese auf Masseunterschieden. In geringem Ausmaß sind diese aber auch masseunabhängig und beruhen dann auf den anderen Kerneigenschaften (Simon and Palm, 1966).

Masseabhängige Isotopeneffekte sind, wie der Name bereits suggeriert, Effekte, die durch unterschiedliche Isotopenmasse zustande kommen. In Molekülen, die unterschiedliche Isotope tragen, ergeben sich aufgrund des Masseunterschiedes auch unterschiedliche Schwingungsenergien. Folglich reagieren schwere Kerne träger (Buchachenko, 2013). Der massespezifische Isotopeneffekt ist bei Wasserstoff ($^1H/^2D$) groß und wird umso kleiner, je geringer der prozentuale Masseunterschied ist. Für Kohlenstoff ($^{12}C/^13C$) fallen diese in der Regel sehr klein aus (Simon and Palm, 1966; Buchachenko, 2013).

Messungen von Schwefelisotopen durch Hulston und Thode legten den Grundstein für die Erforschung masseunabhängiger Isotopeneffekte (Hulston and Thode, 1965). Bei diesen sind die prominentesten Phänomene jene, die von ihrem Kernspin, also ihrem magnetischen Moment, abhängig sind. Sie werden als magnetische Isotopeneffekte bezeichnet, da sie durch magnetische Interaktionen in Erscheinung treten (Buchachenko, 2013). Insgesamt sind diese Effekte meistens sehr klein, sodass ihre Quantifizierung einer empfindlichen Analytik bedarf (Simon and Palm, 1966).

Fisher *et al.* stellten eine Theorie zur quantendynamischen Selektion (QDS – *quantum dynamical selection*) auf. Demnach sollen symmetrische Moleküle in Abhängigkeit von ihrem Isotopenmuster mit unterschiedlichen kinetischen Parametern (enzymatisch) umgesetzt werden (Fisher and Radzihovsky, 2018). Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO) stellt mit seiner trigonal pyramidalen Molekülstruktur ein symmetrisches Molekül dar (Greenberg et al., 2020). Es kann enzymatisch zu Trimethylamin (TMA) reduziert werden (Abbildung 8). Eine enzymatische Reduktion von TMAO bietet die Möglichkeit, die Reaktion unterschiedlich isotopenmarkierter Moleküle zu verfolgen und entsprechend zu charakterisieren.

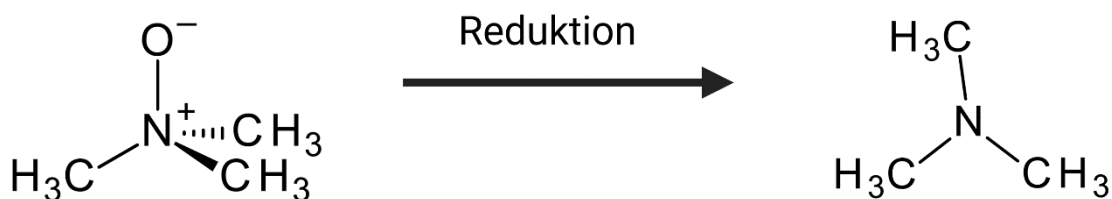


Abbildung 8: Reduktion von TMAO zu TMA.

(Abbildung erzeugt mit BioRender)

TMAO ist sowohl ein Substrat für das mARC-Enzymsystem als auch für bakterielle Molybdoenzyme aus der DMSO-Reduktase-Familie (McCrindle et al., 1979; Schneider et al., 2018).

Die TMAO-Reduktasen zählen genauso wie mARC, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, zu den molybdänhaltigen Enzymen. Das Gen *torZ* kodiert für das Protein TorZ. Analog zu mARC ist in dem aktiven Zentrum von TorZ auch Molybdän in Form von Mo^{VI} vorhanden. Die *torZ*-kodierenden Enzyme zählen zu der DMSO-Reduktase-Familie der mononukleären Molybdän-Enzyme. Es ist nicht im Cytoplasma, sondern im Periplasma lokalisiert und kann nicht nur S-Oxide, sondern auch N-Oxide reduzieren (McCrindle et al., 1979). Entsprechend katalysiert TorZ auch die Reduktion von TMAO zu TMA. Wie bereits aus Kapitel 2.2 SI Fig. 10 + 11 hervor geht, werden für die Reduktion durch das mARC-Enzymsystem hohe TMAO-Konzentrationen benötigt. Daher soll die Analytik zunächst mit dem mARC- Enzymsystem erfolgen, aber bei der Notwendigkeit höherer Umsetzungsraten sollte das Enzymsystem gewechselt und die Analytik mit TorZ weiterverfolgt werden.

Für die enzymatische Reduktion ist auch bei diesem Enzymsystem ein Elektronendonator notwendig, welcher das Mo^{VI} zu Mo^{IV} reduziert. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, werden im mARC-Enzymsystem die Elektronen ausgehend von NADH auf Cyb5R, weiter auf Cyb5B und anschließend auf mARC übertragen, welches dann die Substrate reduziert. Bei molybdänhaltigen Enzymen wird die Aktivität üblicherweise mithilfe eines Methylviologen (oder Benzylviologen)-Assays detektiert (Nieter Burgmayer et al., 2004). Bei diesem Assay wird zunächst Methylviologen mit Natriumdithionit zu dem blau gefärbten Methylviologenradikal reduziert. Dieses dient als Elektronendonator und überträgt anschließend seine Elektronen weiter auf das molybdänhaltige Protein, welches wiederum seine Substrate reduziert und selber

wieder farblos wird (Abbildung 9) Durch die Blaufärbung des Methylviologen-Radikals lässt sich die Reaktion photometrisch bei 600 nm verfolgen.

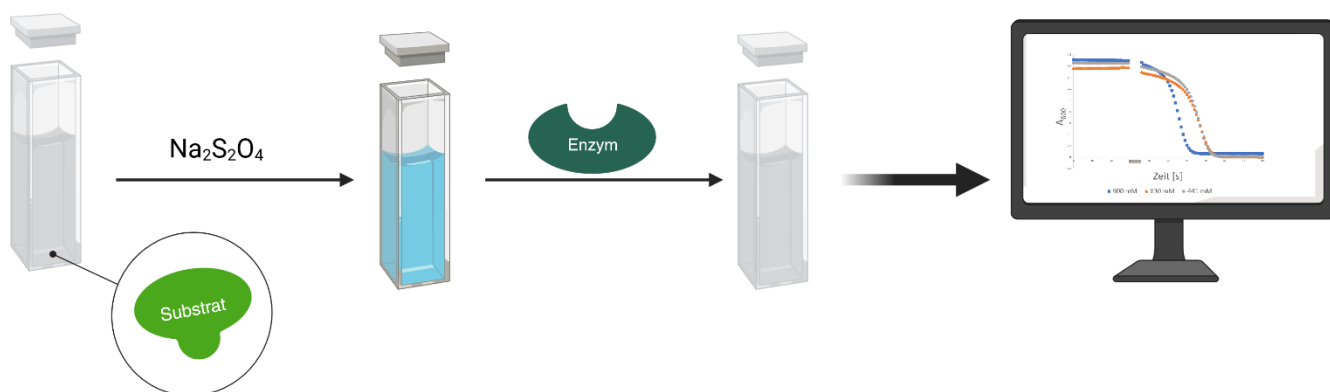
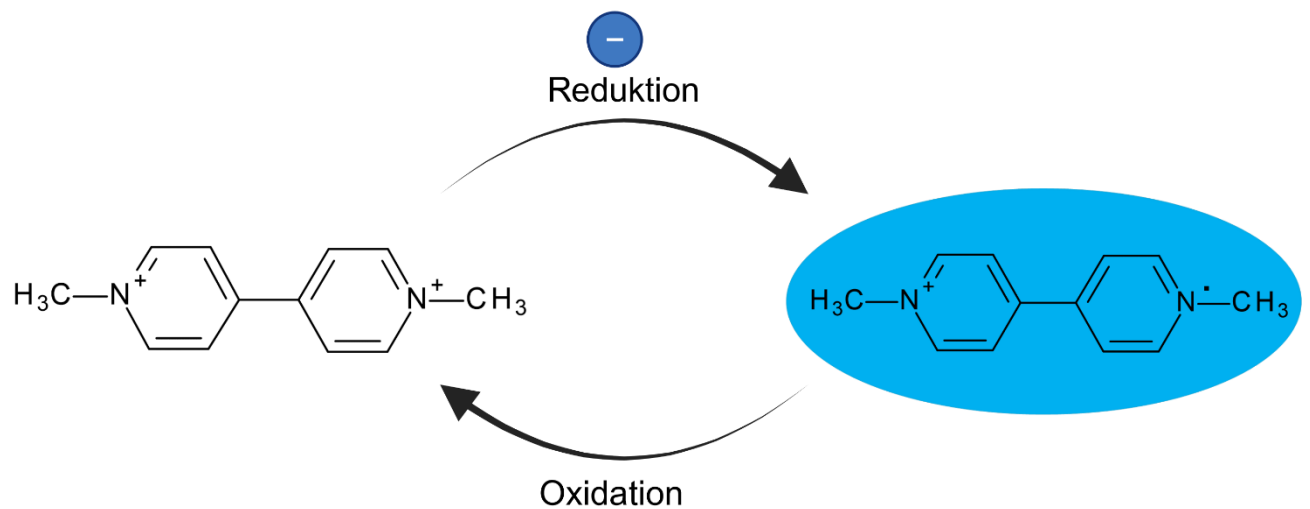


Abbildung 9: Funktionweise und Ablauf des Methylviologen-Assays.

In sauerstofffreier Umgebung wird Methylviologen durch Zugabe von Natriumdithionit zum blau gefärbten Methylviologen-Radikal reduziert. Dieses überträgt seine Elektronen auf das Molybdän im aktiven Zentrum des Enzyms, welches diese zur Reduktion seiner Substrate verwendet (Watanabe and Honda, 1982). (Abbildung erzeugt mit BioRender)

Für die Beantwortung der Fragestellung dient TMAO als Substrat. Dieses erfüllt nicht nur die Anforderungen an eine symmetrische Molekülstruktur, sondern ist auch Gegenstand der Forschung. Ursprünglich bekannt ist TMAO als Osmolyt, welches unter anderem Tiefseefischen hilft, durch seine proteinstabilisierende Wirkung, osmotischen Stress und hydrostatischen Druck auszuhalten (Ufnal et al., 2015). Im menschlichen Körper hingegen wird es in Verbindung mit kardiovaskulären

Erkrankungen (CVD – *cardiovascular disease*) gebracht. Dort entsteht es initial aus Cholin und L-Carnitin, welche durch Bakterien des humanen Mikrobioms (*Firmicutes*, *Proteobakterien*) in Trimethylamin (TMA) umgewandelt werden. In der Leber wird es dann durch die humane FMO3 zu Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO) oxygeniert. Als Quelle für Cholin dient Phosphatidylcholin, welches in der Nahrung insbesondere in Milch und rotem Fleisch vorkommt. L-Carnitin wird endogen aus Methionin und Lysin synthetisiert (Thomas and Fernandez, 2021). In Lebensmitteln ist auch dieses vor allem in rotem Fleisch und Milchprodukten zu finden. Eine Ernährung, bei der keine Lebensmittel ausgeschlossen werden, bezeichnet man als eine omnivore Ernährung (Robert F. Denno, William F. Fagan, 2003). Durch die geringere Aufnahme an L-Carnitin weisen Vegetarier im Vergleich zu Omnivoren niedrigere TMAO-Spiegel auf (Koeth et al., 2019).

Hohe TMAO-Spiegel korrelieren mit einem erhöhten Risiko für eine endotheliale Dysfunktion, akutem Herzversagen, Schaumzellenbildung, Infarkt der Herzkranzgefäße, vermindertem reversen Cholesterin-Transport, Aktivierung von Entzündungen und Gefäßalterung (Abbildung 10). Zudem zeigen weitere Studien Hinweise auf einen Zusammenhang mit viszeraler Adipositas und Fettlebererkrankung. Entsprechende zugrundeliegende Wirkmechanismen sind weiterhin unverstanden (Thomas and Fernandez, 2021). Daher war die Nutzung von TMAO als Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen in der Diskussion. Allerdings ist unklar, ob hohe TMAO-Plasmaspiegel ein Marker oder Mediator für kardiovaskuläre Risiken darstellen, sodass die Verwendung als Biomarker kritisch zu betrachten ist (Guasti et al., 2021).

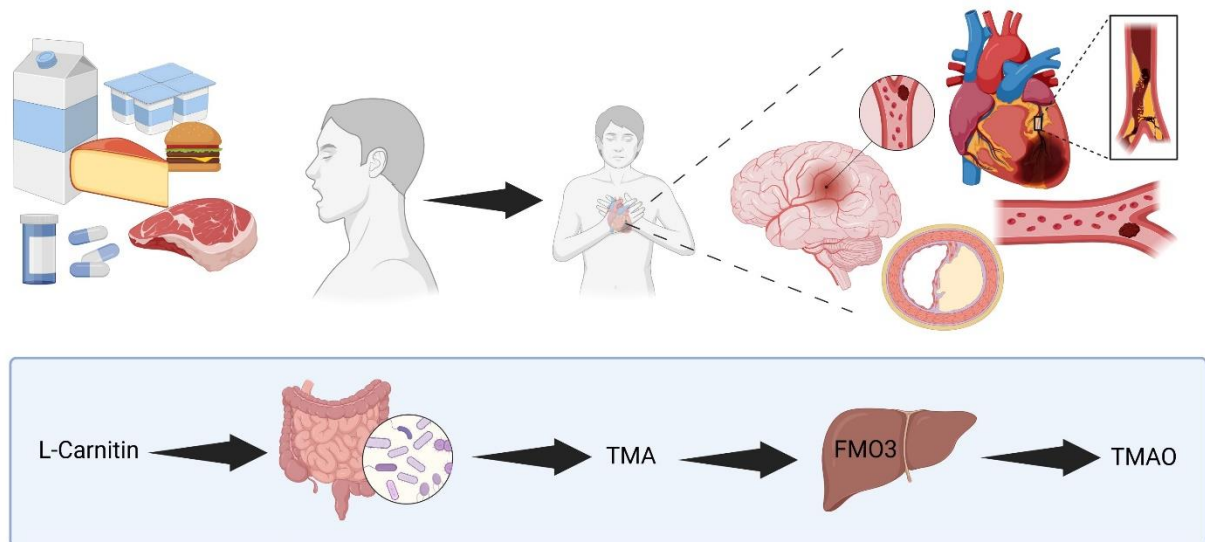


Abbildung 10: Entstehung von TMAO im menschlichen Körper

In Lebensmitteln enthaltenes L-Carnitin wird durch Darmbakterien zu TMAO umgewandelt und schließlich durch die FMO3 in der Leber zu TMAO oxygeniert, welches zu einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko führt (Thomas and Fernandez, 2021). (Abbildung erzeugt mit BioRender)

Auf zellulärer Ebene transportiert L-Carnitin die Fettsäuren von dem Zytosol in das Mitochondrium, in dem diese zur Energiegewinnung genutzt werden (Longo et al., 2016). Daher ist diese Substanz als Supplement besonders im Fokus hinsichtlich metabolischer Effekte insbesondere im sportphysiologischen und im diätetischen Kontext. Supplementationen von L-Carnitin in Kombination mit Kohlenhydraten über einen Zeitraum von bis zu 3 Monaten in Höhe von 1- 4 g täglich führen zu erhöhten TMAO-Plasmaspiegeln. Hierbei ist das Ausmaß abhängig vom Geschlecht, Alter und der Ernährungsform (Omnivore/Vegetarier). Gleichzeitig wurden in diesen Studien keine erhöhten Marker für Inflammationen oder oxidativen Stress detektiert (Sawicka et al., 2020).

In dieser Arbeit sollte es allerdings nur um die Isotopenunterschiede gehen. Je nachdem, ob eine, zwei oder alle drei Methylgruppen des TMAOs ^{13}C -markiert vorliegen, können potentielle kinetische Unterschiede detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der postulierte masseunabhängige Isotopeneffekt näher untersucht werden. Da die masseabhängigen Isotopeneffekte in der Regel sehr klein sind, bedarf es einer guten und sensitiven Analytik (Simon and Palm, 1966).

5.1.1 mARC-katalysierte Umsetzung

5.1.1.1 Material

Tabelle 2: Materialien

Material	Hersteller
96-deep well strip tubes	Corning 4408
Eppendorf Reference®	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Feinwaage Explorer	OHAUS Europe GmbH
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Metallblock	Werkstatt
Multipette® E3/Multipette® E3x - Elektronische Mehrfachdispenser- Pipette	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
pH-Meter WTW Multical	Altmann Analytik GmbH & Co. KG
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG
PURELABflex 1	Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Berlin
Racks	Sarstedt AG & Co. KG
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One GmbH
Schraubröhre, Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG
Vortexer Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ameisensäure	Fisher Scientific GmbH
Ammonium-Hydroxid-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylbromacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
NADH	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trimethylamin- $^{13}\text{C}_3$ <i>N</i> -Oxid	Isosciences Cat-Nr. 15206
Trimethylamin- $^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$ -Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trimethylamin- d_9 <i>N</i> -Oxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trimethylamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wasser (HPLC-grade)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Für den fluoreszenzbasierten Assay wurden die Materialien wie in 2.2 genannt verwendet. Die rekombinanten Proteine wurden für alle Methoden durch Michel A. Struwe und Brigitte Bittner wie in (Wahl et al., 2010) beschrieben hergestellt.

Tabelle 4: Software

Software	Hersteller
Excel 2019	Microsoft, Inc
Word 2019	Microsoft, Inc
Origin	OriginLab Corporation Northampton, MA, USA
i-control™	Tecan Trading AG, Switzerland
BioRender	BioRender, Toronto, Ontario, Canada,
BioviaDraw2024	Dassault Systemes

5.1.1.2 Methoden

5.1.1.2.1 Derivatisierung mit Ethylbromacetat

Die benutzte Methode mit LC-MS-Detektion wurde von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Biberach an der Riss, Germany, Department of Drug Discovery Sciences, Discovery Science Technologies, zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Proteinmengen wurden in Anlehnung an die Methode von Schneider et al., 2018 eingesetzt. Für die enzymatische Inkubation wurden 111 pmol (3,75 µg) *hmARC1*, 37,5 pmol Cyb5B (Häm) und 3,75 pmol Cyb5R (FAD) und Substrat in 20 mM MES pH 6 für 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet (Gesamtvolumen 75 µl) und nach 15 min durch Zugabe von 50 µl eisgekühltem Acetonitril abgestoppt. Als interner Standard diente eine 2 mM Stammlösung von jeweils TMA-¹³C₃,¹⁵N und TMAO-d₉.

Auf der Eis-gekühlten 96-*well*-Mikrotiterplatte wurden zunächst serielle Verdünnungsreihen sowohl von TMA als auch von TMAO in einem Gesamtvolumen von 200 µl mit einem Verdünnungsfaktor von 0,5 hergestellt. Für TMA wurden die Verdünnungsreihen ausgehend von 100 µM erstellt. Als *Quality control* wurden weitere Reaktionskammern mit einer 20 µM, 0,2 µM und einer 0,02 µM Lösung vermessen.

Die TMAO-Verdünnungsreihe wurde analog mit einer Startkonzentration von 100 mM erstellt. Für die Quality controls wurden 1 mM, 100 µM, 10 µM und 1 µM Proben erstellt. Als weitere Kontrollen dienten gespikete Proben zu denen jeweils 10 pmol TMAO/TMA hinzugefügt wurden.

In einer weiteren 1 ml 96-*deep-well*-Mikrotiterplatte wurden zunächst in jede Reaktionskammer 30 µl 0,5 M Ammoniumchlorid-Lösung, 50 µl 0,2 M Ethylbromacetat-Lösung und jeweils 20 pmol Interner-Standard vorgelegt. Anschließend wurden zügig jeweils 10 µl Probe bzw. Standards in die einzelnen Reaktionskammern hinzugefügt und die Platte mit einer Folie versiegelt. Nach Vortexen und kurzer Zentrifugation für 30 s bei 50 rpm wurde die Platte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte erneut für 30 s bei 50 rpm zentrifugiert und die Reaktion nach Entfernen der Abdeckfolie mit 500 µl 25 mM Ameisensäure in Acetonitril abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation bei 3200 rpm für 5 min bei 4 °C wurden 400 µl in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert bis diese per LC/MS/MS analysiert wurden.

Die LC-MS-Analytik wurde von Dr. David Kvaskoff in Kooperation mit Boehringer Ingelheim durchgeführt.

Zunächst wurden die Proben in der 96-*well*-Mikrotiterplatte für 5 min bei 3200 rpm bei 4 °C zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden abgenommen und mit 150 µl ACN verdünnt. Diese wurden anschließend in die HPLC eingespritzt:

Injektionsvolumen: 5 µL

Instrumente: Agilent Infinity II 1290 UPLC and SCIEX 6500+ QTRAP/SelexION+

MS-Parameter: ESI+, CUR 35, CAD Medium(8), ISV 4500, TEM 450, GS1/GS2 50, Q1/Q3 Unit

Parameter der differentiellen Ionenmobilität (falls vorhanden): SV 4000, DT 150, DR 10 psi, Modifier (none)

Säule: ACQUITY UPLC BEH HILIC 130Å, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm P/N 186003460

Säulenofen: Temp. 60°C

Mobile Phase: (A) 30 mM Ammoniumformiat/0,1% Ameisensäure pH 3.8, (B) 100% ACN

Flussrate: 1 mL/min

Gradient: 97 %B (0,0 min), 97 %B (0,2 min), 80 %B (1,2 min), 65 %B (1,3 min), 65 % B (1,8 min), 97 %B (2,0 min), 97 %B (3,0 min)

5.1.1.2.2 Fluoreszenzbasierter Assay

Die ersten Messungen wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben durchgeführt. Final erfolgte die Analytik folgendermaßen: Die Änderung der NADH-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$) wurde mit einem TECAN Infinite 200 M Pro Plattenlesegerät detektiert. Das Reaktionsvolumen betrug 75 µl. In jedes *well* wurde zunächst ein Mastermix vorgelegt, welcher aus 144,75 pmol (4,88 µg) *hmARC1*, 48,75 pmol *hCyb5B* (Häm) und 75 nmol NADH in 100 mM MES-Puffer pH 6 bestand. Mit einer seriellen Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 0,75 wurde eine Konzentrationsreihe ausgehend von einer Startkonzentration von 6,75 M für eine Kinetik erstellt. Nach kurzem Schütteln zum Homogenisieren im Plattenlesegerät wurde die Platte für 3 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit einer Stepperpipette mit 4,88 pmol *hCyb5R3* (FAD) gestartet. Nach erneutem, kurzem Schütteln für 2 s wurde die Fluoreszenz 20 min überwacht. Die Umsetzungsraten wurden aus der Steigung der Fluoreszenzintensität mithilfe einer NADH-Kalibrierreihe

berechnet und mit der Menge des eingesetzten Proteins in Beziehung gesetzt. Die Kurvenanpassung wurde mit den Standardfunktionen von Origin (OriginLab Corporation Northampton, MA, USA) und Excel 2019 (Microsoft, Inc.) durchgeführt.

5.2 torZ

5.2.1 Material

Zusätzlich zu den in Kapitel 5.1.1.1 aufgeführten Materialien wurden folgende Materialien verwendet:

Tabelle 5: Materialien für die torZ-Analytik

Material	Hersteller
pBAD/Myc-His-Plasmid	Invitrogen
NEB5-alpha-Zellen	New England Biolabs
Emulsiflex C3 Hochdruckhomogenisator	Avestin Europe GmbH
HisTrap HP 5-mL-Säule	Cytiva
ÄKTA-Pure-Chromatographie-System	Cytiva
10 kDa Amicon-Zentrifugalfilter	Merck KGaA
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
UV-2600i Spektrophotometer	adzu Deutschland GmbH
OD 600 Spektrophotometer	BioRad SmartSpec™ Plus Spectrophotometer
Umdreh-Septum-Stopfen	Fisher Scientific GmbH
Halbmikroküvette PS, 1,5ml	Nerbe plus GmbH Co. KG
25 µl Hamilton Spritze	Hamilton

Tabelle 6: Reagenzien für die torZ Analytik

Reagenzien	Hersteller
Tricin	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>Terrific-Broth</i> -Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG
Carbenicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eisencitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methylviologen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Arabinose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
ROTI®Blue quick	Carl Roth GmbH & Co. KG

5.2.2 Methoden

5.2.2.1 Proteinreinigung

Zur Herstellung von rekombinantem TorZ wurde das *torZ*-Gen einschließlich des N-terminalen Signalpeptids für die periplasmatische Lokalisierung durch Polymerase-Kettenreaktion aus genomischer DNA von *E. coli* UT189 amplifiziert und in ein pBAD/Myc-His-Plasmid kloniert. Der korrekte Aufbau des Plasmids wurde durch Sanger-Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid wurde in chemisch kompetente NEB5-*alpha*-Zellen transformiert, die auch als Expressionsstamm dienen.

Die Zellen wurden in *Terrific-Broth*-Medium mit 100 µg·ml⁻¹ Carbenicillin, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 1 mM Na₂MoO₄ und 100 µM Eisencitrat bei 37 °C unter kräftigem Schütteln kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1 erreicht war. Anschließend

wurde die Temperatur auf 30 °C gesenkt, 0,01 % L-Arabinose zugegeben und die Inkubation über Nacht fortgesetzt.

Die Zellpaste wurde durch Zentrifugation geerntet, in NiNTA-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH 7,5) resuspendiert und durch zweimaliges Durchlaufen durch einen Emulsiflex C3 Hochdruckhomogenisators (Avestin) bei ca. 1.200 bar lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation bei 50.000 g für 30 min bei 4 °C entfernt, und das gereinigte Lysat wurde auf eine HisTrap HP 5-mL-Säule geladen, die an ein ÄKTA-Pure-Chromatographie-System angeschlossen war. Die Säule wurde mit NiNTA-Puffer gewaschen, der 25 mM Imidazol enthielt und das Zielprotein wurde mit einem linearen Imidazolgradienten von 25 mM bis 150 mM eluiert. Die Fraktionen wurden durch Coomassie-gefärbte SDS-PAGE analysiert, gepoolt und mit Hilfe von Zentrifugalfiltern mit einem MW-Cutoff von 10 kDa konzentriert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt.

5.2.2.2 Methylviologen-Assay

Die Aktivitätsassays wurden anhand der Oxidation von reduziertem Methylviologen durch Messung der Absorption bei 600 nm ($\epsilon = 13,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) über die Zeit mit einem Spektrophotometer aufgenommen (Watanabe and Honda, 1982).

Die Enzymtests erfolgten anaerob bei 37 °C in 20 mM Tricinpuffer pH 8,25 mit Zusatz von 190 mM Natriumsulfit in einem Gesamtvolumen von 1 ml.

Zur Erfassung einer Kinetik wurden 24 Konzentrationen gemessen. Ausgehend von einer Konzentration von 900 mM wurde eine serielle Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 0,7 erstellt. Aufgrund der Hygroskopizität des TMAO wurden die Gewichtskorrekturfaktoren direkt nach der ersten Messung neu bestimmt und bei der Auswertung mathematisch berücksichtigt. Dies führt zu leichten Abweichungen in der Ausgangskonzentration.

Nachdem 200 µM Methylviologen, Substrat und Puffer vorgelegt wurden, wurde die Küvette mit einem Stopfen verschlossen. Mittels Begasung der Küvette mit Argon unter Druckausgleich mit einer Kanüle wurden anaerobe Bedingungen geschaffen. Das Methylviologen wurde durch Injektion von 300 µM Natriumdithionit mit einer 25-µl-Hamilton-Spritze reduziert, und die Absorption des entstehenden blauen Methylviologen-Radikals wurde gemessen. Bei Vorliegen einer stabilen Absorption

über einen Zeitraum von ca. 25 s wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 µg TorZ gestartet.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Natürlich vorkommender Kohlenstoff (C) ist ^{12}C . Zu 1,1 % liegt dieser als ^{13}C vor. Zur Vereinfachung wird im Folgenden ^{12}C -TMAO als natürlich vorkommendes, nicht isotopenmarkiertes TMAO angegeben und in Abhängigkeit, ob eine, zwei oder alle Methylgruppen des TMAO ^{13}C -markiert vorliegen als 1x ^{13}C , 2x ^{13}C , 3x ^{13}C -TMAO betitelt.

Für die Beantwortung der Fragestellung wurde zunächst die in 5.1.1.2.1 beschriebene Methode angewendet. Diese führte zu einigen Problemen. Vorrangig war unter den vorhandenen Bedingungen ein hohes Grundrauschen zu beobachten. Gleichzeitig waren die detektierten TMA-Mengen sehr gering. Eine Erhöhung der TMAO-Konzentration ging mit einer erhöhten TMA-Menge sowohl in der mARC-katalysierten Umsetzung als auch in der Kontrolle ohne mARC einher (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen ist nicht unterscheidbar, ob die TMA-Mengen auf die enzymatische Umsetzung oder durch die chemische Umsetzung der Substanz zurückzuführen sind. Auch der Einsatz von TMAO- d_9 wäre denkbar. Aus Kostengründen wurde an dieser Methode nicht weitergearbeitet.

Im Anschluss wurde eine weitere bestehende Methode genutzt, um die Analytik zu benutzen. Dazu wurde die in Kapitel 2.2 beschriebene fluoreszenzbasierte Methode angewendet.

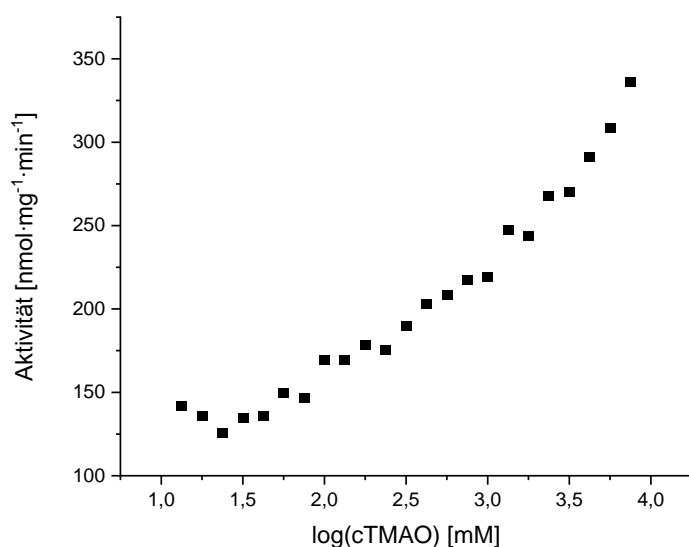


Abbildung 11: Enzymatische Umsetzung von ^{12}C -TMAO durch *hmARC1*.

Ausgehend von einer Konzentration von 6,75 M TMAO konnten keine Sättigungen in den enzymatischen Aktivitäten erreicht werden (Abbildung 11). Da die Konzentration von TMAO aufgrund der Überschreitung der Sättigungslöslichkeit limitiert ist und nicht weiter erhöht werden konnte, wurde der Versuch mit halbierten Proteinmenge und unter Verlängerung der Messzeit auf 20 min wiederholt (Abbildung 12).

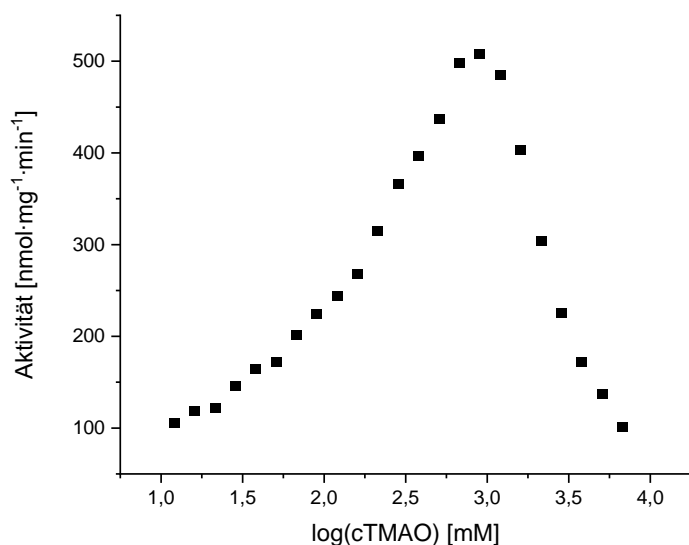


Abbildung 12: Enzymatische Umsetzung von ^{12}C -TMAO durch *hmARC1* mit reduzierter eingesetzter Proteinmenge wie in 5.1.1.2.2 beschrieben.

Der Versuch zeigt, dass bei hohen Konzentrationen die Aktivität wiederum absinkt. Dieses wurde auf basisch reagierendes TMA zurückgeführt, da der gemessene pH-Wert bei den höchsten Konzentrationen bei pH 8 lag. Bei diesem pH-Wert ist mARC inaktiv (Bauch, 2015). Folglich wurde der Versuch in einem stärker gepufferten System wiederholt und überprüft, ob der pH-Wert auch bei hohen Konzentrationen konstant bei pH 6 blieb.

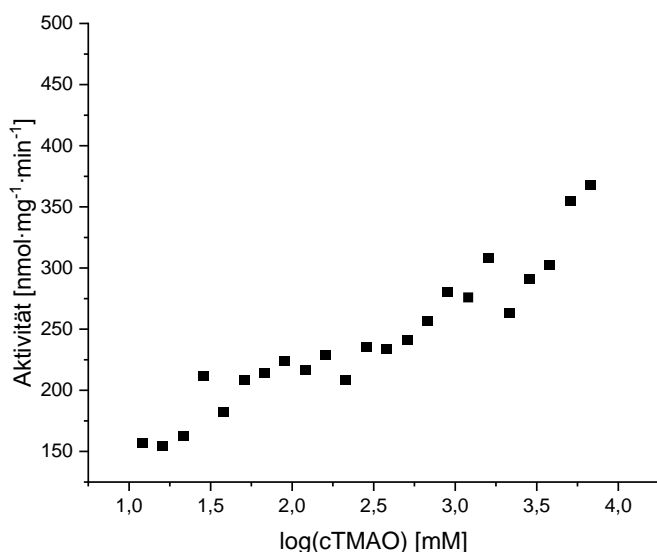


Abbildung 13: Enzymatische Umsetzung von ^{12}C -TMAO durch *hmARC1* mit reduzierter eingesetzter Proteinmenge wie in 5.1.1.2.2 beschrieben in 100 mM MES pH 6.

Abbildung 13 zeigt, dass auch unter den in Kapitel 5.1.1.2.2 beschriebenen Bedingungen keine Sättigung in den enzymatischen Aktivitäten erreicht wird und eine Berechnung enzymkinetischer Parameter nicht möglich ist. An dieser Stelle muss zudem berücksichtigt werden, dass durch die hohen Substratkonzentrationen unterschiedliche Viskositäten vorliegen können, die zusätzlich Einfluss auf die enzymatischen Umsetzungen haben, da die Diffusion die Anzahl der möglichen Zusammenstöße zwischen Enzym und Substrat limitiert.

Für die Beantwortung der Fragestellung ist es essentiell, dass die enzymatischen Umsetzungen mit deutlich höheren Umsetzungsraten erfolgen, um insbesondere kleinere Unterschiede detektieren zu können. Aufgrund der sehr geringen Umsetzungsraten von mARC, musste das Enzymsystem gewechselt werden und ein Assay mit der bakteriellen TMAO Reduktase TorZ wurde etabliert.

Um den Assay erfolgreich anwenden zu können, mussten zunächst einige Optimierungen vorgenommen werden. Diese beinhalteten die Auswahl des besten Puffersystems, des optimalen Injektionsvolumens, der korrekten Kanülenauswahl, Temperatur-Kontrolle, der Zugabe von Sulfit als Sauerstofffänger, der Bestimmung der geeigneten Proteinmenge und benutzen Substratkonzentrationen und der dazugehörigen geeigneten Verdünnungsfaktoren, um gute Kinetiken zu erhalten. Nach der Optimierung zahlreicher Parameter wurden zunächst 3 Kinetiken mit kommerziell erhältlichem ^{12}C -TMAO wie in Kapitel 5.2.2.2 durchgeführt, um zu prüfen, ob die Methode unter den definierten Parametern geeignet ist und reproduzierbar abläuft (siehe Abbildung 14). Da die ^{13}C -TMAO-Derivate kommerziell nicht erhältlich waren, wurden diese von Jonas Hildebrandt (AG Clement) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Damit alle Derivate unter den gleichen Bedingungen synthetisiert wurden, wurde auch das unmarkierte TMAO unter diesen Bedingungen selber hergestellt (siehe Abbildung 14).

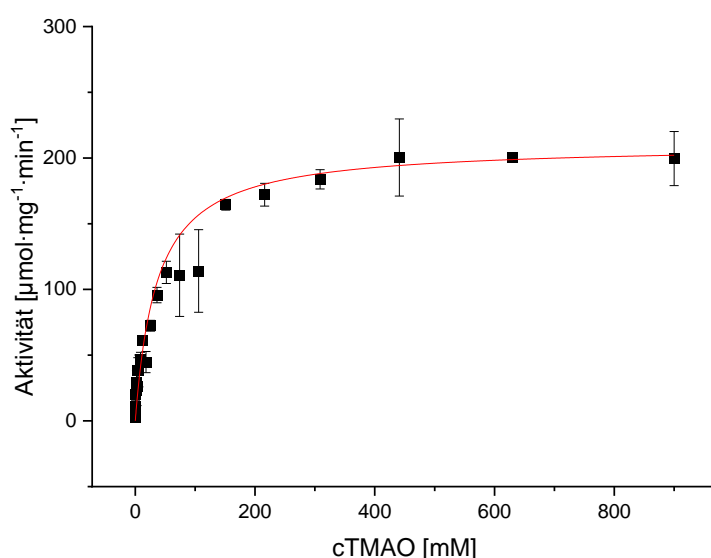


Abbildung 14: Michaelis-Menten-Kinetik von kommerziellem ^{12}C -TMAO durch die enzymatische Umsetzung von TorZ.

Bestimmte Parameter sind $K_M = 36,13 \pm 4,54 \text{ mM}$, $V_{\max} = 210,2 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 4,51$, $R^2 = 0,989$. Assay Bedingungen erfolgten wie in 5.2.2.2 beschrieben. Um eine Kinetik aufzunehmen, wurden, 24 Konzentrationen ausgehend von 900 mM bis 0 mM mit einem Verdünnungsfaktor von 0,7 vermessen.

Abbildung 14 bestätigt, dass die Methode geeignet ist und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Dennoch ist der bestimmte K_M -Wert des kommerziell erhältlichen ^{12}C -TMAOs für TorZ mit 36 mM verhältnismäßig hoch, sodass von jedem TMAO-Derivat nur eine Kinetik aufgenommen werden konnte (siehe Abbildungen 15-18).

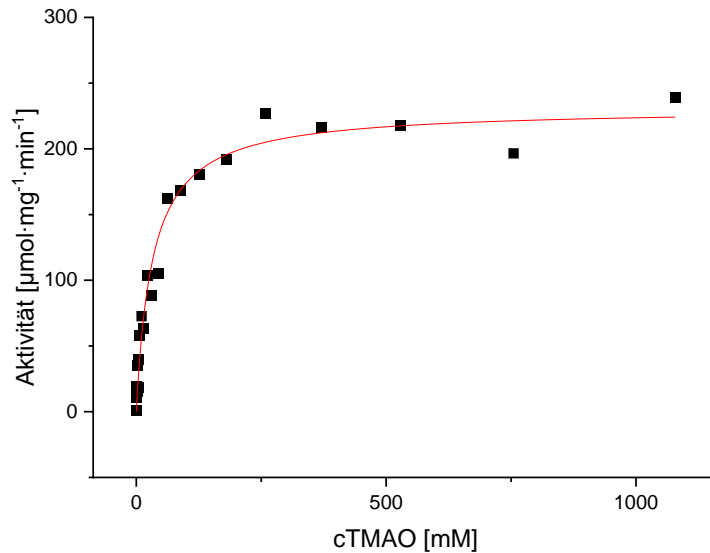


Abbildung 15: Michaelis–Menten Sättigungskurven von der Reduktion von ^{12}C -TMAO durch TorZ.

Bestimmte Werte sind $K_M = 32,65 \pm 4,25 \text{ mM}$, $V_{\max} = 230,9 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 7,43$, $R^2 = 0,971$. Assay Bedingungen erfolgten wie in 5.2.2.2 beschrieben. Um eine Kinetik aufzunehmen, wurden, 24 Konzentrationen ausgehend von 1078 mM bis 0 mM mit einem Verdünnungsfaktor von 0,7 vermessen.

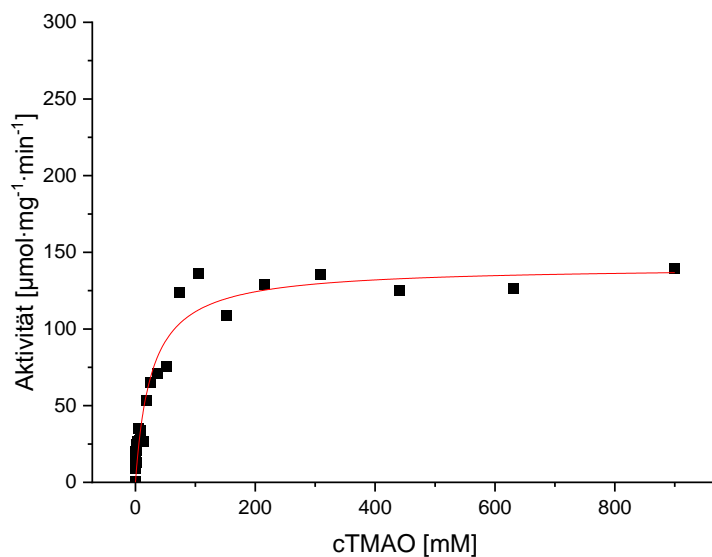


Abbildung 16: Michaelis-Menten Sättigungskurve für die Reduktion von $1 \times {}^{13}\text{C}$ -TMAO durch TorZ.

Bestimmte Werte sind $K_M = 26,53 \pm 4,78 \text{ mM}$, $V_{\max} = 140,76 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 6,23$, $R^2 = 0,942$. Assay Bedingungen erfolgten wie in 5.2.2.2 beschrieben. Um eine Kinetik aufzunehmen, wurden, 24 Konzentrationen ausgehend von 900 mM bis 0 mM mit einem Verdünnungsfaktor von 0,7 vermessen.

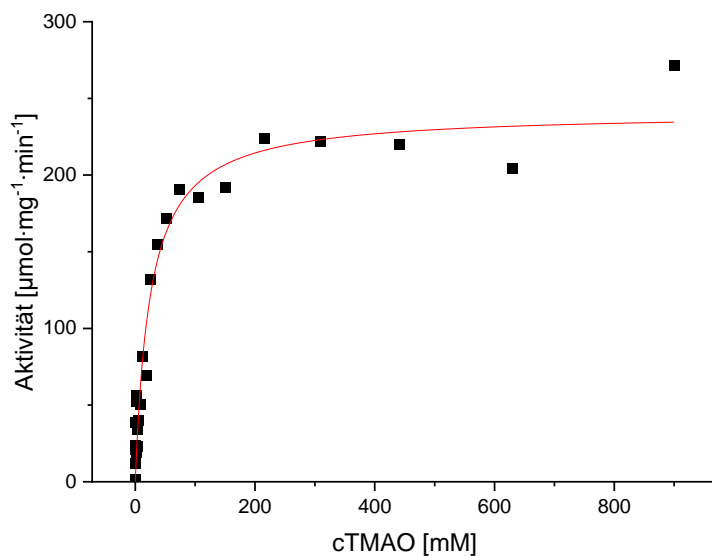


Abbildung 17: Michaelis-Menten Sättigungskurve von $2 \times {}^{13}\text{C}$ -TMAO durch TorZ.

Bestimmte Parameter sind $K_M = 24,78 \pm 4,34 \text{ mM}$, $V_{\max} = 240,96 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 10,26$, $R^2 = 0,945$. Assay Bedingungen erfolgten wie in 5.2.2.2 beschrieben. Um eine Kinetik aufzunehmen, wurden, 24 Konzentrationen ausgehend von 900 mM bis 0 mM mit einem Verdünnungsfaktor von 0,7 vermessen.

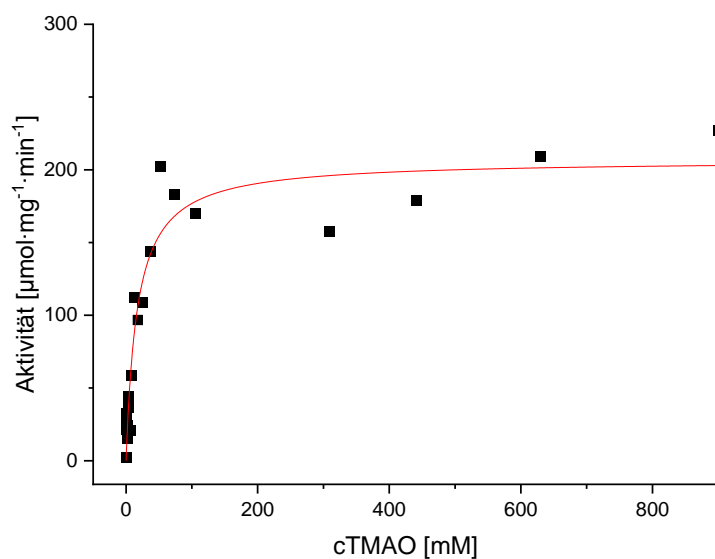


Abbildung 18: Michaelis-Menten Sättigungskurve von $3x^{13}C$ -TMAO durch TorZ.

Bestimmte Parameter sind $K_M = 16,91 \pm 3,25$ mM, $V_{max} = 206,73 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 10,40$, $R^2 = 0,924$. Assay Bedingungen erfolgten wie in 5.2.2.2 beschrieben. Um eine Kinetik aufzunehmen, wurden, 24 Konzentrationen ausgehend von 900 mM bis 0 mM mit einem Verdünnungsfaktor von 0,7 vermessen.

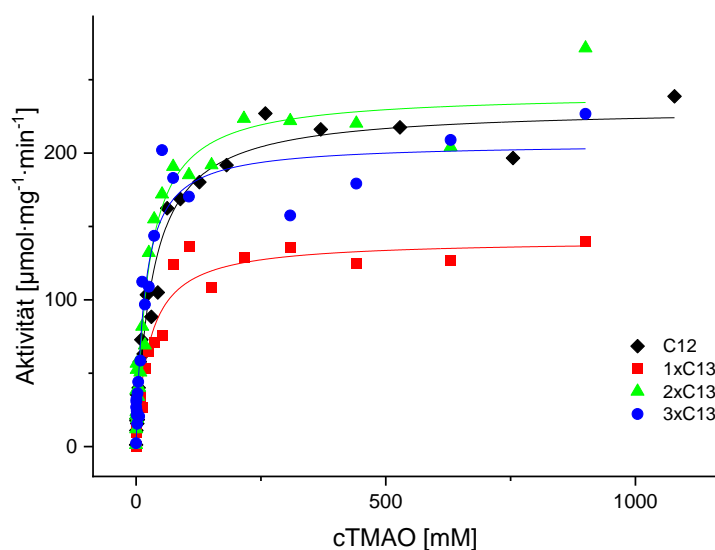


Abbildung 19: Zusammenfassung der Abbildungen 15-18 in einem Graphen.

Abbildungen 15 bis 18 zeigen die individuellen Michaelis-Menten-Kinetiken der einzelnen TMAO-Isotope und Abbildung 19 zeigt alle Kinetiken in einem Graphen. Die

ermittelten enzymkinetischen Parameter sind in Tabelle 7 zusammengefasst sowie die ermittelten K_M -Werte in Abbildung 20 und die V_{\max} -Werte in Abbildung 21 aufgetragen.

Abbildung 20 lässt zunächst vermuten, dass die K_M -Werte mit zunehmender Anzahl an ^{13}C -Methylgruppen im TMAO sinken. Da sich die Standardabweichungen der ermittelten K_M -Werte allerdings überschneiden, können keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der K_M -Werte ermittelt werden. Lediglich der K_M -Wert des 3x ^{13}C -TMAOs ist im Vergleich zu den anderen Derivaten geringer. Bei den V_{\max} -Werten hingegen weicht nur 1x ^{13}C -TMAO von den anderen Derivaten ab und ist mit $140\ \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ deutlich geringer im Vergleich zu den anderen Isotopen, die bei über $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ liegen (Abbildung 21).

Tabelle 7: Michaelis-Menten-Parameter aus den Abbildungen 15-18.

	k_M [mM]	V_{\max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/k_M [$\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$]
^{12}C -TMAO	$32,65 \pm 4,25$	$230,9 \pm 7,43$	340575,2	$1,0\cdot 10^7$
1x ^{13}C -TMAO	$26,53 \pm 4,78$	$140,8 \pm 6,23$	207669,6	$7,8\cdot 10^6$
2x ^{13}C -TMAO	$24,78 \pm 4,34$	$241,0 \pm 10,26$	355457,2	$1,4\cdot 10^7$
3x ^{13}C -TMAO	$16,9 \pm 3,25$	$206,7 \pm 10,4$	304906,1	$1,8\cdot 10^7$

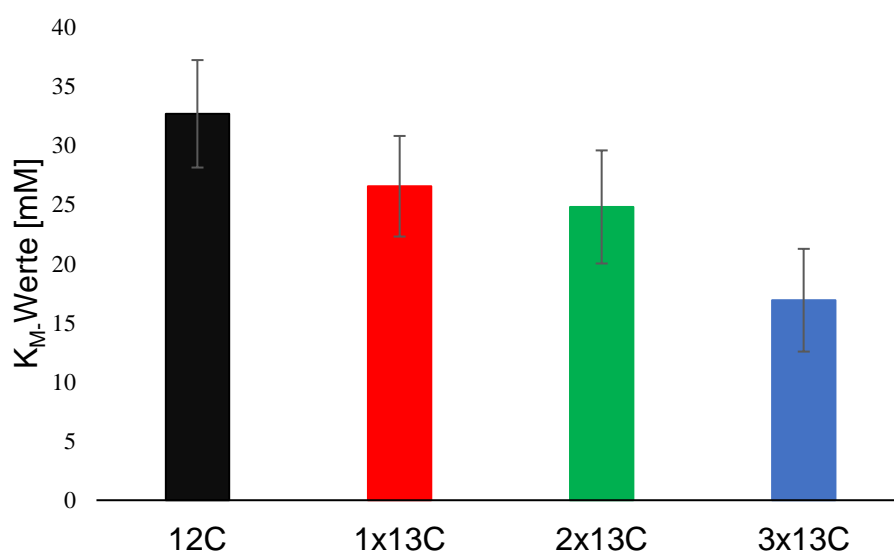


Abbildung 20: K_M -Werte im Überblick

Die angegebenen Standardabweichungen entsprechen den Abweichungen des Fits ($n=1$).

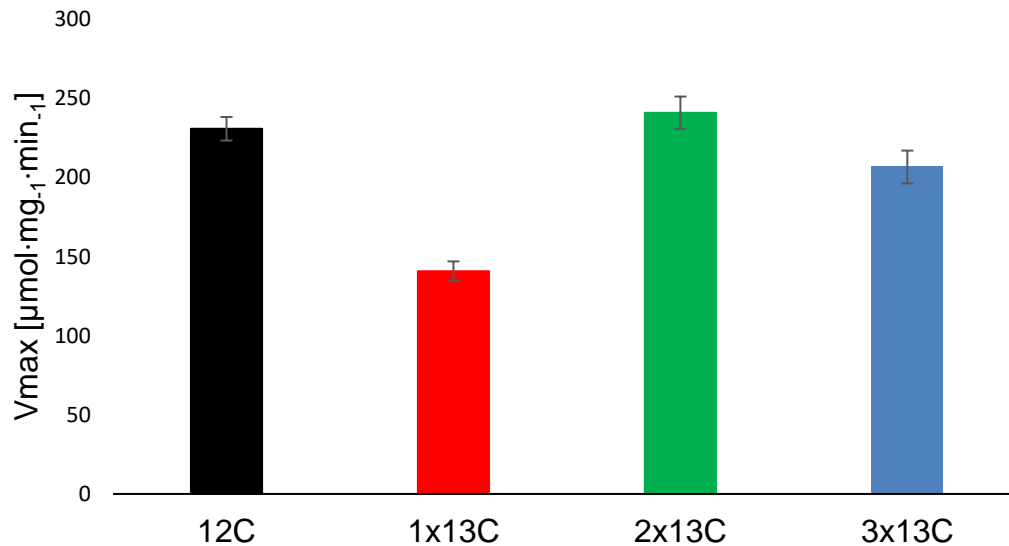


Abbildung 21: V_{max}-Werte im Überblick

Die angegebenen Standardabweichungen entsprechen den Abweichungen des Fits (n=1).

Wie in Abschnitt 1.1 erwähnt, kann man die enzymkinetischen Parameter auch mit einer 4-parametrischen logistischen Funktion, dem Boltzmann-Fit, bestimmen. In Abbildung 22 sind die Daten des kommerziell erhältlichen TMAOs aus Abbildung 14 mit dem Boltzmann-Fit dargestellt. Wendet man diesen Fit auf alle anderen Isotopenmarkierten TMAO-Derivate an, resultieren die in Tabelle 8 aufgelisteten Parameter. Zusätzlich sind zum Vergleich die Daten aus Tabelle 7 mit aufgelistet.

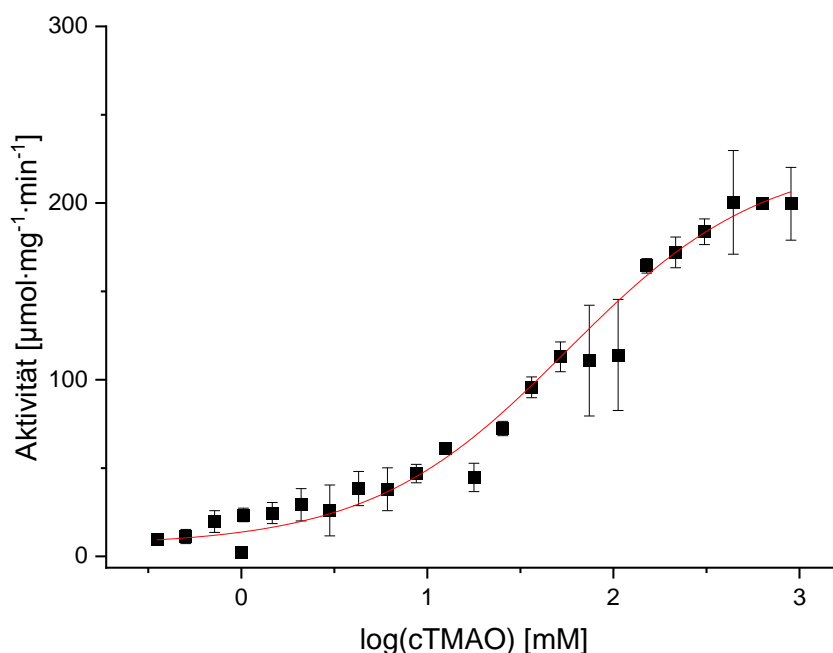


Abbildung 22: Boltzmann-Fit des kommerziellen ^{12}C -TMAOs

Bestimmte Parameter sind $K_M = 56,21 \pm 1,2 \text{ mM}$, $V_{\max} = 220,79 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \pm 9,34$, $R^2 = 0,9967$. Assay Bedingungen erfolgten wie in 5.2.2.2 beschrieben. Um eine Kinetik aufzunehmen, wurden, 24 Konzentrationen ausgehend von 900 mM bis 0 mM mit einem Verdünnungsfaktor von 0,7 vermessen. Die Durchführung erfolgte als Triplikat.

Tabelle 8: Enzymkinetische Parameter aller TMAO-Derivate aus Michaelis-Menten-Fit und Boltzmann-Fit im Überblick.

TMAO-Derivat	Michaelis-Menten-Fit		Boltzmann-Fit	
	K_M [mM]	V_{\max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	K_M [mM]	V_{\max} [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]
^{12}C	$32,65 \pm 4,25$	$230,9 \pm 7,43$	$40,1 \pm 1,19$	$224,61 \pm 5,19$
1x ^{13}C	$26,53 \pm 4,78$	$140,8 \pm 6,23$	$34,14 \pm 1,16$	$119,24 \pm 2,34$
2x ^{13}C	$24,78 \pm 4,34$	$241,0 \pm 10,26$	$29,16 \pm 1,17$	$206,40 \pm 3,59$
3x ^{13}C	$16,9 \pm 3,25$	$206,7 \pm 10,4$	$18,57 \pm 1,20$	$173,54 \pm 1,75$

Die unterschiedlichen K_M -Werte sind in Abbildung 23 grafisch dargestellt. Da es sich bei den Messungen jeweils um Einzelpunktbestimmungen handelt, geben die

Standardabweichungen in Tabelle 8 und Abbildung 23 die Abweichungen von dem Fit an und entsprechen nicht der Standardabweichung einer Triplikatbestimmung.

Trotz der Abweichungen ist bei beiden Fits der Trend erkennbar, dass mit zunehmender ^{13}C -Markierung die K_M -Werte sinken. Die zugehörigen Standardabweichungen sind bei dem Boltzmann-Fit deutlich kleiner, sodass der Trend des sinkenden K_M -Wertes mit zunehmender ^{13}C -Markierung deutlich signifikanter zu erkennen ist (siehe Abbildung 23).

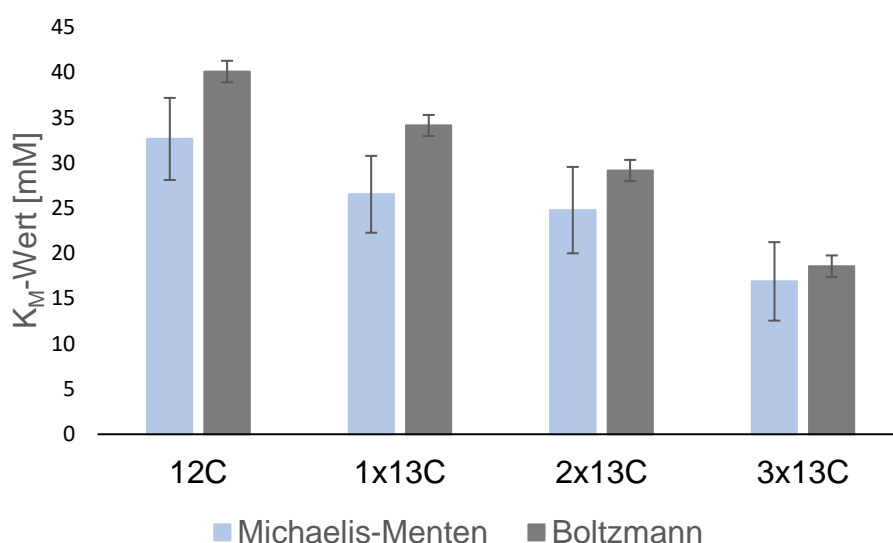


Abbildung 23: Ermittelte K_M -Werte aus Michaelis-Menten Fit und Boltzmann Fit in der Übersicht.

Die angegebenen Standardabweichungen entsprechen den Abweichungen des Fits ($n=1$).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass der Assay für die TorZ-katalysierte Umsetzung von TMAO so optimiert wurde, dass die Analytik gute und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit einem weltweiten Konsortium durchgeführt. Dabei ging es darum, wie in der Einleitung beschrieben, eine enzymatische Umsetzung zu finden, die die *Quantum dynamical selection theory* bestätigt (Fisher and Radzihovsky, 2018). Unsere Ergebnisse stimmen mit dieser Theorie nur teilweise überein. Zurzeit werden meine Ergebnisse mit den anderen Teilnehmern des Projektes ausführlich diskutiert und es wird überlegt, welche weiteren

Untersuchungen erforderlich sind. Dieses ist aber nicht mehr Gegenstand meiner Arbeit.

5.4 Ausblick

Problematisch für die Bestimmungen waren insbesondere die hohen bzw teilweise viel zu hohen K_M -Werte sowohl für mARC als auch für TorZ, da dieses mit einem sehr hohen Verbrauch an isotoopenmarkierten TMAO einhergeht, welches mit einem enormen Zeit- und Kostenaufwand für die Synthese verbunden ist. Um die Fragestellung genau beantworten zu können, ist es entweder notwendig, mehr von dem isotoopenmarkierten TMAO herzustellen oder mit einem Enzymsystem zu arbeiten, welches TMAO spezifischer (mit einem niedrigeren K_M -Wert) umsetzt.

TMAO wird in Abwesenheit von Sauerstoff von *E.coli* auch als alternativer exogener Elektronenakzeptor genutzt (Ansaldi et al., 2007). Unter anaeroben Bedingungen wird für die Energiegewinnung folglich auch mehr TMAO umgesetzt als unter aeroben Bedingungen (Méjean et al., 1994).

TorA weist im Gegensatz zu TorZ höhere Umsetzungsraten auf und wird mit zu den induzierbaren TMAO-Reduktasen gezählt (Barrett, 1985). Für dieses Enzym wurde bei der Umsetzung von TMAO ein K_M -Wert von 70 μ M bestimmt (Iobbi-Nivol et al., 1996).

Unter anaeroben Bedingungen weist TorA einen terminalen Schwefel-Liganden auf. An dieser Stelle findet sich unter aeroben Bedingungen ein Sauerstoff-Ligand. Zwar wird unter aeroben und anaeroben in etwa gleich viel TorA exprimiert, allerdings sinkt die Aktivität unter aeroben Bedingungen auf 5 % der Aktivität im Vergleich zu aeroben Bedingungen (Kaufmann et al., 2018).

Die Verwendung von rekombinantem TorA würde zwar dazu führen, dass deutlich weniger von dem teuren Substrat notwendig wäre und von einer Charge eine weitreichende Analytik mit mehreren Messwiederholungen erfolgen könnte. Allerdings wäre die Voraussetzung, dass TorA anaerob exprimiert wird (Kaufmann et al., 2018). Die Durchführung unter Ausschluss von Sauerstoff würde zu einem sehr hohen apparativen Aufwand führen – sowohl bei der Expression als bei der anschließenden Analytik. Insgesamt würden damit zwar deutlich geringere Proteinmengen für die Analytik notwendig sein, allerdings ist die TorA-Expression und Analytik deutlich zeit- und kostenintensiver.

Eine weitere Optimierung wäre das Arbeiten im Mikrotiterplattenformat. Dadurch würden auch sehr viel Material und Zeit eingespart werden, sodass schneller (technische) Replikate produziert werden können, die genauere Quantifizierungen ermöglichen. Dieses würde auch ein anaerobes Arbeiten erfordern. Realisierbar wäre dieses in einer *Glove-Box*, mit dem wiederum ein hoher instrumenteller Aufwand verbunden wäre.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson, R.H., Ague, S.L., Hess, S.M., and Davidson, J.D. (1965). The distribution, excretion and metabolism of hydroxyurea-C14. *J Pharmacol Exp Ther* 150, 322-327.
- Altuve, A., Silchenko, S., Lee, K.H., Kuczera, K., Terzyan, S., Zhang, X., Benson, D.R., and Rivera, M. (2001). Probing the differences between rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome b5 and microsomal cytochromes b5. *Biochemistry* 40, 9469-9483.
<https://doi.org/10.1021/bi010636i>.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2002). MOSC domains: ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS Microbiology Letters* 207, 55-61. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11028.x>.
- Andersson, S., Hofmann, Y., Nordling, A., Li, X., Nivelius, S., Andersson, T.B., Ingelman-Sundberg, M., and Johansson, I. (2005). Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of N-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 570-578. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002972>.
- Ansaldi, M., Théraulaz, L., Baraquet, C., Panis, G., and Méjean, V. (2007). Aerobic TMAO respiration in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 66, 484-494.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05936.x>.
- Atwal, P.S., and Scaglia, F. (2016). Molybdenum cofactor deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 117, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.11.010>.
- Barrett, E. (1985). Bacterial Reduction of Trimethylamine Oxide. *Annual Review of Microbiology* 39, 131-149. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.39.1.131>.
- Bauch, E. (2015). Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen am mARC-Enzymsystem. Dissertation (Kiel).
- Benet, L.Z., Bowman, C.M., Koleske, M.L., Rinaldi, C.L., and Sodhi, J.K. (2019). Understanding drug-drug interaction and pharmacogenomic changes in pharmacokinetics for metabolized drugs. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 46, 155-163.
<https://doi.org/10.1007/s10928-019-09626-7>.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science* 1, 41-55.
<https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>.

- Boyd, A.S., and Neldner, K.H. (1991). Hydroxyurea therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 25, 518-524. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70233-R](https://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70233-R).
- Buchachenko, A.L. (2013). Mass-independent isotope effects. *The journal of physical chemistry. B* 117, 2231-2238. <https://doi.org/10.1021/jp308727w>.
- Carnero, A. (2006). High throughput screening in drug discovery. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 8, 482-490. <https://doi.org/10.1007/s12094-006-0048-2>.
- Carrillo, N., Ceccarelli, E., and Roveri, O. (2010). Usefulness of kinetic enzyme parameters in biotechnological practice. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 27, 367-382. <https://doi.org/10.1080/02648725.2010.10648157>.
- Chance, B. (1991). Optical method. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 1-28. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.20.060191.000245>.
- Clement, B. (2002). Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug metabolism reviews* 34, 565-579. <https://doi.org/10.1081/DMR-120005643>.
- Clement, B., Mau, S., Deters, S., and Havemeyer, A. (2005). Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the N-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 (1-(2s)-2-4-(hydroxyamino)iminomethylbenzoylamino-1-oxopropyl-4-piperidinyloxy-acetic acid). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 1740-1747. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005249>.
- Daff, S. (2010). NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 23, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.03.001>.
- Dalvie, D., and Di, L. (2019). Aldehyde oxidase and its role as a drug metabolizing enzyme. *Pharmacology & therapeutics* 201, 137-180. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.011>.
- D'Arrigo, A., Manera, E., Longhi, R., and Borgese, N. (1993). The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *Journal of Biological Chemistry* 268, 2802-2808. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53844-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53844-8).
- Day, R.O., Kamel, B., Kannangara, D.R.W., Williams, K.M., and Graham, G.G. (2016). Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Clinical science (London, England : 1979)* 130, 2167-2180. <https://doi.org/10.1042/CS20160010>.
- Döring, B., and Petzinger, E. (2014). Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug metabolism reviews* 46, 261-282. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.882353>.

- Durner, J., and Klessig, D.F. (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Current opinion in plant biology* 2, 369-374. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(99\)00007-2](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(99)00007-2).
- Dutta, T., Sasidharan, K., Ciociola, E., Pennisi, G., Noto, F.R., Kovooru, L., Kroon, T., Lindblom, A., Du, Y., and Pirmoradian, M., et al. (2024). Mitochondrial amidoxime-reducing component 1 p.Ala165Thr increases protein degradation mediated by the proteasome. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 44, 1219-1232. <https://doi.org/10.1111/liv.15857>.
- Eisenthal, R., Danson, M.J., and Hough, D.W. (2007). Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends in biotechnology* 25, 247-249. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.010>.
- Elstner, E.F. (1991). *Der Sauerstoff* (Mannheim/Wien/Zürich: B.I. Wiss. Verl.).
- Emdin, C.A., Haas, M.E., Khera, A.V., Aragam, K., Chaffin, M., Klarin, D., Hindy, G., Jiang, L., Wei, W.-Q., and Feng, Q., et al. (2020). A missense variant in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 gene and protection against liver disease. *PLoS genetics* 16, e1008629. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008629>.
- Fisher, M.P.A., and Radzihovsky, L. (2018). Quantum indistinguishability in chemical reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, E4551-E4558. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718402115>.
- Garattini, E., Fratelli, M., and Terao, M. (2008). Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 1019-1048. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7398-y>.
- Gibbs, M.A., and Sorensen, S.J. (2000). Hydroxyurea in the treatment of HIV-1. *The Annals of pharmacotherapy* 34, 89-93. <https://doi.org/10.1345/aph.19004>.
- Ginsel, C., Plitzko, B., Froriep, D., Stolfa, D.A., Jung, M., Kubitz, C., Scheidig, A.J., Havemeyer, A., and Clement, B. (2018). The Involvement of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) in the Reductive Metabolism of Hydroxamic Acids. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 46, 1396-1402. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.082453>.
- González, P.J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C.D., and Moura, J.J.G. (2006). Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100, 1015-1023. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.11.024>.
- Greenberg, A., Green, A.R., and Liebman, J.F. (2020). Computational Study of Selected Amine and Lactam N-Oxides Including Comparisons of N-O Bond Dissociation Enthalpies

with Those of Pyridine N-Oxides. *Molecules* 25, 3703.

<https://doi.org/10.3390/molecules25163703>.

Gruenewald, S., Wahl, B., Bittner, F., Hungeling, H., Kanzow, S., Kotthaus, J., Schwering, U., Mendel, R.R., and 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. <https://doi.org/10.1021/jm8010417>.

Guasti, L., Galliazzo, S., Molaro, M., Visconti, E., Pennella, B., Gaudio, G.V., Lupi, A., Grandi, A.M., and Squizzato, A. (2021). TMAO as a biomarker of cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Internal and emergency medicine* 16, 201-207. <https://doi.org/10.1007/s11739-020-02470-5>.

Hajnal, K., Gabriel, H., Aura, R., Erzsébet, V., and Blanka, S.S. (2016). Prodrug Strategy in Drug Development. *Acta Medica Marisiensis* 62, 356-362. <https://doi.org/10.1515/amma-2016-0032>.

Hänsch, R., Lang, C., Riebeseel, E., Lindigkeit, R., Gessler, A., Rennenberg, H., and Mendel, R.R. (2006). Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂: combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *Journal of Biological Chemistry* 281, 6884-6888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513054200>.

Havemeyer, A., Bittner, F., Wollers, S., Mendel, R., Kunze, T., and Clement, B. (2006). Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *The Journal of biological chemistry* 281, 34796-34802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607697200>.

Havemeyer, A., Grünewald, S., Wahl, B., Bittner, F., Mendel, R., Erdélyi, P., Fischer, J., and Clement, B. (2010). Reduction of N-hydroxy-sulfonamides, including N-hydroxy-valdecocib, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metab Dispos* 38, 1917-1921. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.032813>.

Havemeyer, A., Lang, J., and Clement, B. (2011). The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug metabolism reviews* 43, 524-539. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.608682>.

Hille, R. (1996). The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical reviews* 96, 2757-2816. <https://doi.org/10.1021/cr950061t>.

Hille, R., Hall, J., and Basu, P. (2014). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chemical reviews* 114, 3963-4038. <https://doi.org/10.1021/cr400443z>.

- Hulston, J.R., and Thode, H.G. (1965). Variations in the S 33 , S 34 , and S 36 contents of meteorites and their relation to chemical and nuclear effects. *J. Geophys. Res.* 70, 3475-3484. <https://doi.org/10.1029/JZ070i014p03475>.
- Indorf, P., Kubitz, C., Scheidig, A.J., Kunze, T., and Clement, B. (2020). Drug Metabolism by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Rapid Assay and Identification of New Substrates. *Journal of medicinal chemistry* 63, 6538-6546. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01483>.
- Innes, H., Nischalke, H.D., Guha, I.N., Weiss, K.H., Irving, W., Gotthardt, D., Barnes, E., Fischer, J., Ansari, M.A., and Rosendahl, J., et al. (2022). The rs429358 Locus in Apolipoprotein E Is Associated With Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis. *Hepatology communications* 6, 1213-1226. <https://doi.org/10.1002/hep4.1886>.
- lobbi-Nivol, C., Pommier, J., Simala-Grant, J., Méjean, V., and Giordano, G. (1996). High substrate specificity and induction characteristics of trimethylamine-N-oxide reductase of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* 1294, 77-82. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00271-5](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00271-5).
- Islinger, M., Lüers, G.H., Li, K.W., Loos, M., and Völkl, A. (2007). Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 282, 23055-23069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610910200>.
- Jakobs, H.H., Froriep, D., Havemeyer, A., Mendel, R.R., Bittner, F., and Clement, B. (2014a). The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): involvement in metabolic reduction of N-oxides, oximes and N-hydroxyamidinohydrazones. *ChemMedChem* 9, 2381-2387. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402127>.
- Jakobs, H.H., Mikula, M., Havemeyer, A., Strzalkowska, A., Borowa-Chmielak, M., Dzwonek, A., Gajewska, M., Hennig, E.E., Ostrowski, J., and Clement, B. (2014b). The N-reductive system composed of mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), cytochrome b5 (CYB5B) and cytochrome b5 reductase (CYB5R) is regulated by fasting and high fat diet in mice. *PloS one* 9, e105371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105371>.
- Johannes, L., Fu, C.-Y., and Schwarz, G. (2022). Molybdenum Cofactor Deficiency in Humans. *Molecules (Basel, Switzerland)* 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27206896>.
- Katzung, B. (2010). *Basic & Clinical Pharmacology*, 15e (The McGraw-Hill Companies, Inc).
- Kaufmann, P., Duffus, B.R., Mitrova, B., lobbi-Nivol, C., Teutloff, C., Nimtz, M., Jänsch, L., Wollenberger, U., and Leimkühler, S. (2018). Modulating the Molybdenum Coordination Sphere of *Escherichia coli* Trimethylamine N-Oxide Reductase. *Biochemistry* 57, 1130-1143. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01108>.

- Kebamo, S., and Tesema, S. (2015). The Role of Biotransformation in Drug Discovery and Development. *J Drug Metab Toxicol* 06. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000196>.
- Klein, J.M., Busch, J.D., Potting, C., Baker, M.J., Langer, T., and Schwarz, G. (2012). The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* 287, 42795-42803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.419424>.
- Koeth, R.A., Lam-Galvez, B.R., Kirsop, J., Wang, Z., Levison, B.S., Gu, X., Copeland, M.F., Bartlett, D., Cody, D.B., and Dai, H.J., et al. (2019). L-Carnitine in omnivorous diets induces an atherogenic gut microbial pathway in humans. *The Journal of clinical investigation* 129, 373-387. <https://doi.org/10.1172/JCI94601>.
- Kotthaus, J., Wahl, B., Havemeyer, A., Kotthaus, J., Schade, D., Garbe-Schönberg, D., Mendel, R., Bittner, F., and Clement, B. (2011). Reduction of N(ω)-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *The Biochemical journal* 433, 383-391. <https://doi.org/10.1042/BJ20100960>.
- Krompholz, N., Krischkowski, C., Reichmann, D., Garbe-Schönberg, D., Mendel, R.-R., Bittner, F., Clement, B., and Havemeyer, A. (2012). The mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. *Chemical research in toxicology* 25, 2443-2450. <https://doi.org/10.1021/tx300298m>.
- Kubitza, C., Bittner, F., Ginsel, C., Havemeyer, A., Clement, B., and Scheidig, A.J. (2018). Crystal structure of human mARC1 reveals its exceptional position among eukaryotic molybdenum enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 11958-11963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808576115>.
- Lipinski, C.A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug discovery today. Technologies* 1, 337-341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- Liu, X., Hu, B., and Chu, C. (2022). Nitrogen assimilation in plants: current status and future prospects. *Journal of Genetics and Genomics* 49, 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.12.006>.
- Longo, N., Frigeni, M., and Pasquali, M. (2016). Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et biophysica acta* 1863, 2422-2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023>.
- Luukkonen, P.K., Juuti, A., Sammalkorpi, H., Penttilä, A.K., Orešič, M., Hyötyläinen, T., Arola, J., Orho-Melander, M., and Yki-Järvinen, H. (2020). MARC1 variant rs2642438 increases hepatic phosphatidylcholines and decreases severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans. *Journal of Hepatology* 73, 725-726. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.021>.

- Malik, A.N., Rossios, C., Al-Kafaji, G., Shah, A., and Page, R.A. (2007). Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochemical and biophysical research communications* 357, 237-244.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.132>.
- Manikandan, P., and Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current drug targets* 19, 38-54.
<https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>.
- McCrindle, S.L., Kappler, U., and McEwan, A.G. (1979). Microbial Dimethylsulfoxide and Trimethylamine-N-Oxide Respiration. In *Advances in microbial physiology*. vol. 20, A.H. Rose and J.G. Morris, eds. (London: Academic Press), 147-201e.
- Méjean, V., Iobbi-Nivol, C., Lepelletier, M., Giordano, G., Chippaux, M., and Pascal, M.C. (1994). TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Molecular Microbiology* 11, 1169-1179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00393.x>.
- Mendel, R.R., and Kruse, T. (2012). Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 1568-1579.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.007>.
- Michaelis, L., Menten, M.L., Johnson, K.A., and Goody, R.S. (1913). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper (published: 2011). *Biochemistry* 50, 8264-8269. <https://doi.org/10.1021/bi201284u>.
- Misko, A., Mahtani, K., Abbott, J., Schwarz, G., and Atwal, P. (1993, updated 2023). Molybdenum Cofactor Deficiency. *GeneReviews®* 2023.
- Moura, J.J.G., Brondino, C.D., Trinco, J., and Romo, M.J. (2004). Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases. *J Biol Inorg Chem* 9, 791-799.
<https://doi.org/10.1007/s00775-004-0573-9>.
- Neve, E.P.A., Köfeler, H., Hendriks, D.F.G., Nordling, Å., Gogvadze, V., Mkrtchian, S., Näslund, E., and Ingelman-Sundberg, M. (2015). Expression and Function of mARC: Roles in Lipogenesis and Metabolic Activation of Ximelagatran. *PloS one* 10, e0138487.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138487>.
- Neve, E.P.A., Nordling, A., Andersson, T.B., Hellman, U., Diczfalussy, U., Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. (2012). Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 287, 6307-6317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328237>.
- Nieter Burgmayer, S.J., Pearsall, D.L., Blaney, S.M., Moore, E.M., and Sauk-Schubert, C. (2004). Redox reactions of the pyranopterin system of the molybdenum cofactor. *Journal of*

- biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry 9, 59-66. <https://doi.org/10.1007/s00775-003-0496-x>.
- Nowak, K., Luniak, N., Witt, C., Wüstefeld, Y., Wachter, A., Mendel, R.R., and Hänsch, R. (2004). Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant & cell physiology* 45, 1889-1894. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch212>.
- Ott, G., Havemeyer, A., and Clement, B. (2015). The mammalian molybdenum enzymes of mARC. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 20, 265-275. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1216-4>.
- Ott, G., Plitzko, B., Krischkowski, C., Reichmann, D., Bittner, F., Mendel, R.R., Kunze, T., Clement, B., and Havemeyer, A. (2014). Reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine (SMX-HA) by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Chemical research in toxicology* 27, 1687-1695. <https://doi.org/10.1021/tx500174u>.
- Pettersson, G. (1989). Effect of evolution on the kinetic properties of enzymes. *European journal of biochemistry* 184, 561-566. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15050.x>.
- Phillips, I.R., and Shephard, E.A. (2017). Drug metabolism by flavin-containing monooxygenases of human and mouse. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 13, 167-181. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1239718>.
- Plitzko, B., Ott, G., Reichmann, D., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Mendel, R., Bittner, F., Clement, B., and Havemeyer, A. (2013). The involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2 and mitochondrial cytochrome b5 in N-reductive metabolism in human cells. *The Journal of biological chemistry* 288, 20228-20237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474916>.
- Rankine-Mullings, A.E., and Nevitt, S.J. (2022). Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. *The Cochrane database of systematic reviews* 9, CD002202. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002202.pub3>.
- Rixen, S., Havemeyer, A., Tyl-Bielicka, A., Pysniak, K., Gajewska, M., Kulecka, M., Ostrowski, J., Mikula, M., and Clement, B. (2019). Mitochondrial amidoxime-reducing component 2 (MARC2) has a significant role in N-reductive activity and energy metabolism. *The Journal of biological chemistry* 294, 17593-17602. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007606>.
- Rixen, S., Indorf, P.M., Kubitz, C., Struwe, M.A., Klopp, C., Scheidig, A.J., Kunze, T., and Clement, B. (2023). Reduction of Hydrogen Peroxide by Human Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzymes. *Molecules (Basel, Switzerland)* 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28176384>.

Robert F. Denno, William F. Fagan (2003). MIGHT NITROGEN LIMITATION PROMOTE Omnivory among carnivorous arthropods?

Rodríguez-Trelles, F., Tarrío, R., and Ayala, F.J. (2003). Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13413-13417. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835646100>.

Rowan, C., Brinker, A.D., Nourjah, P., Chang, J., Mosholder, A., Barrett, J.S., and Avigan, M. (2009). Rhabdomyolysis reports show interaction between simvastatin and CYP3A4 inhibitors. *Pharmacoepidemiology and drug safety* 18, 301-309. <https://doi.org/10.1002/pds.1711>.

Sawicka, A.K., Renzi, G., and Olek, R.A. (2020). The bright and the dark sides of L-carnitine supplementation: a systematic review. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 17, 49. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00377-2>.

Schneider, J., Girreser, U., Havemeyer, A., Bittner, F., and Clement, B. (2018). Detoxification of Trimethylamine N-Oxide by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component mARC. *Chemical research in toxicology* 31, 447-453. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00329>.

Simon, H., and Palm, D. (1966). Isotopeneffekte in der organischen Chemie und Biochemie. *Angewandte Chemie* 78, 993-1007. <https://doi.org/10.1002/ange.19660782202>.

Smedley, P.L., and Kinniburgh, D.G. (2017). Molybdenum in natural waters: A review of occurrence, distributions and controls. *Applied Geochemistry* 84, 387-432. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2017.05.008>.

Sparacino-Watkins, C., Stolz, J.F., and Basu, P. (2014a). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chemical Society reviews* 43, 676-706. <https://doi.org/10.1039/c3cs60249d>.

Sparacino-Watkins, C.E., Tejero, J., Sun, B., Gauthier, M.C., Thomas, J., Ragireddy, V., Merchant, B.A., Wang, J., Azarov, I., and Basu, P., et al. (2014b). Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *The Journal of biological chemistry* 289, 10345-10358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.555177>.

Stearns, B., Losse E, K.A., and Bernstein, J. (1963). Hydroxyurea. A new type of potential antitumor agent. *Journal of medicinal chemistry* 6, 201. <https://doi.org/10.1021/jm00338a026>.

Stegelmann, F., Kvasnicka, H.M., and Griesshammer, M. (2008). Chronische myeloproliferative Erkrankungen. *best practice onkologie* 3, 24-32. <https://doi.org/10.1007/s11654-008-0050-y>.

- Stolz, J.F., and Basu, P. (2002). Evolution of Nitrate Reductase: Molecular and Structural Variations on a Common Function. *ChemBioChem* 3, 198-206. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020301\)3:2/3<198::AID-CBIC198>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020301)3:2/3<198::AID-CBIC198>3.0.CO;2-C).
- Struwe, M.A., Scheidig, A.J., and Clement, B. (2023). The mitochondrial amidoxime reducing component-from prodrug-activation mechanism to drug-metabolizing enzyme and onward to drug target. *The Journal of biological chemistry* 299, 105306. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105306>.
- Sveinbjornsson, G., Ulfarsson, M.O., Thorolfssdottir, R.B., Jonsson, B.A., Einarsson, E., Gunnlaugsson, G., Rognvaldsson, S., Arnar, D.O., Baldvinsson, M., and Bjarnason, R.G., et al. (2022). Multiomics study of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics* 54, 1652-1663. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01199-5>.
- Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., and Willer, C.J., et al. (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466, 707-713. <https://doi.org/10.1038/nature09270>.
- Thomas, M.S., and Fernandez, M.L. (2021). Trimethylamine N-Oxide (TMAO), Diet and Cardiovascular Disease. *Current atherosclerosis reports* 23, 12. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00910-x>.
- Ufnal, M., Zadlo, A., and Ostaszewski, R. (2015). TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 31, 1317-1323. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.05.006>.
- Vergères, G., Ramsden, J., and Waskell, L. (1995). The carboxyl terminus of the membrane-binding domain of cytochrome b5 spans the bilayer of the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 270, 3414-3422. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3414>.
- Vraka, C., Nics, L., Wagner, K.-H., Hacker, M., Wadsak, W., and Mitterhauser, M. (2017). LogP, a yesterday's value? *Nuclear Medicine and Biology* 50, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.03.003>.
- Wahl, B., Reichmann, D., Nicks, D., Krompholz, N., Havemeyer, A., Clement, B., Messerschmidt, T., Rothkegel, M., Biester, H., and 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 Journal of biological chemistry* 285, 37847-37859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.169532>.

Waring, R.H. (2020). Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 50, 9-18.

<https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1648911>.

Watanabe, T., and Honda, K. (1982). Measurement of the extinction coefficient of the methyl viologen cation radical and the efficiency of its formation by semiconductor photocatalysis. *J. Phys. Chem.* 86, 2617-2619. <https://doi.org/10.1021/j100211a014>.

Weigert, J., Neumeier, M., Bauer, S., Mages, W., Schnitzbauer, A.A., Obed, A., Gröschl, B., Hartmann, A., Schäffler, A., and Aslanidis, C., et al. (2008). Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS letters* 582, 2965-2972.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.07.034>.

Wells, M., Kim, M., Akob, D.M., Basu, P., and Stolz, J.F. (2023). Impact of the Dimethyl Sulfoxide Reductase Superfamily on the Evolution of Biogeochemical Cycles. *Microbiology spectrum* 11, e0414522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04145-22>.

Wermuth, C.G., Ganellin, C.R., Lindberg, P., and Mitscher, L.A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry* 70, 1129-1143. <https://doi.org/10.1351/pac199870051129>.

Whitty, A. (2008). Cooperativity and biological complexity. *Nat Chem Biol* 4, 435-439.

<https://doi.org/10.1038/nchembio0808-435>.

Wiese, S., Gronemeyer, T., Ofman, R., Kunze, M., Grou, C.P., Almeida, J.A., Eisenacher, M., Stephan, C., Hayen, H., and Schollenberger, L., et al. (2007). Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6, 2045-2057.

<https://doi.org/10.1074/mcp.M700169-MCP200>.

7 Anhang

7.1 Liste getesteter Substrate

Mit dem in Kapitel 2 genanntem Assay wurden weitere zahlreiche Substanzen auf eine enzymatische Umsetzung durch das mARC-Enzymsystem getestet.

Tabelle 9: Substanzen, die durch *hmARC-1* reduziert werden

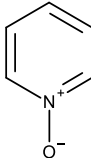
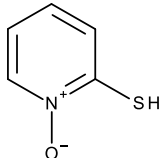
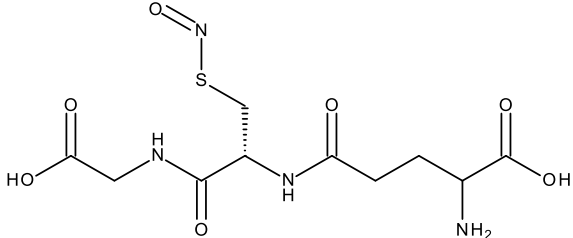
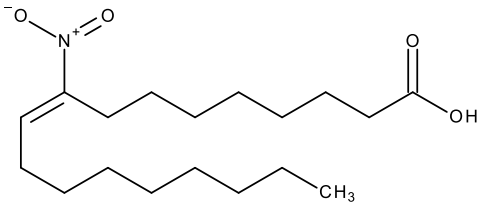
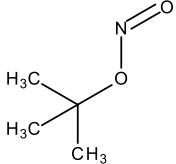
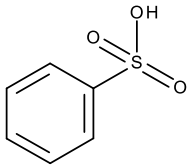
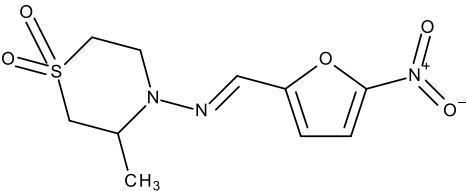
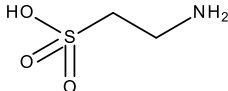
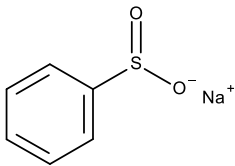
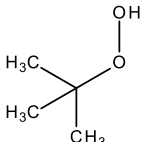
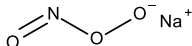
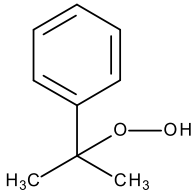
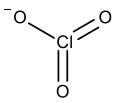

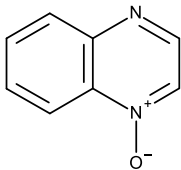
Stoffklasse	Substanz	Strukturformel
N-Oxid	Pyridin- <i>N</i> -Oxid	
N-Oxid	2- <i>SH</i> -Pyridin- <i>N</i> -Oxid	

Tabelle 10: Substanzen, die nicht durch *hmARC-1* reduziert werden

Stoffklasse	Substanz	Strukturformel
Nitroso	S-Nitroso-Glutathion	
Nitro	9-Nitrooleat	
Nitrit	Tertiär-Butyl-Nitrit	

Stoffklasse	Substanz	Strukturformel
Sulfonsäure	Benzolsulfonsäure	
Sulfonsäure	Nifurtimox	
Sulfonsäure	Taurin	
Sulfinsäure	Na-Benzolsulfinat	
Peroxid	Tertiär-Butylhydroperoxid	
Peroxid	Natriumperoxinitrit	
Peroxid	Cumolhydroperoxid	
	Chlorat	
	Iodat	

Stoffklasse	Substanz	Strukturformel
N-Oxid	Quinoxalin-N-Oxid	

7.2 Plasmidkarte für die Expression von *torZ*

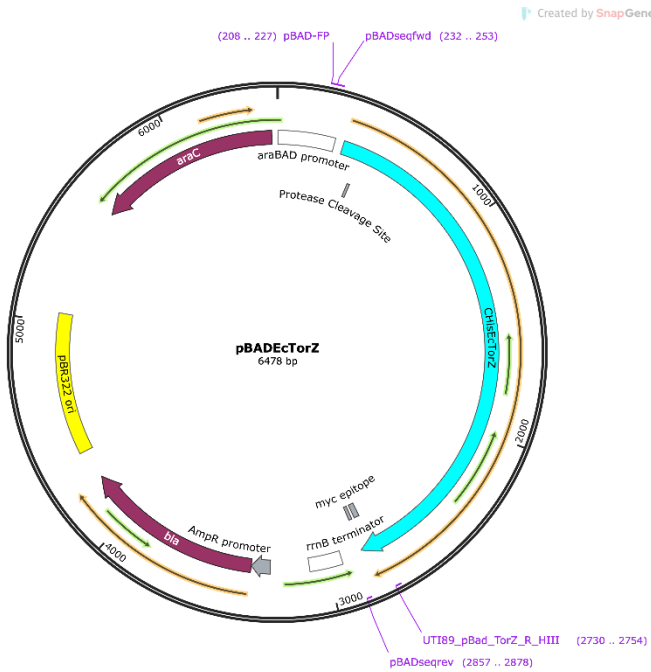


Abbildung 24: Plasmidkarte *torZ*

7.3 Plasmidsequenz *torZ*

>pBAD_EcTorZ

AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCACCTGCGTCTTTTACTGGCTCTTC
TCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATTAAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGC
CATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATT
TGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACC
TGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTGGGCTAACAGGAGG
AATTAACCATGGGAACATTAACAAGACGTGAATTTATTAAACATAGCGGTATTGCGGCAGGG
ACGCTGGTGGTGACATCGGCTGCACCGCTACCCGCATGGGCAGAAGAGAAGGGCGGCAAAAT
TCTCACTGCGGGCCGTTGGGGAGCGATGAACGTAGAAGTGAAGGACGGCAAGATTGTTTCTT

CGACAGGCGCGCTGGCGAAAACCATACCGAACTCCTTACAGTCTACGGCGGCGGATCAGGTA
CACACCACGGCGCGTATTCAGCATCCGATGGTGAGAAAAAGCTATCTCGATAATCCACTGCA
ACCGGCGAAAGGTCTGTGGCGAAGATACCTATGTACAGGTGAGCTGGGAACAAGCATTAAAAC
TGATTCATGAACAACACGATCGTATTCGTAAAGCTAACGGACCATCGGCCATTTTTGCGGGA
TCTTACGGCTGGCGTTCTTCTGGCGTGTGCATAAAGCGCAAACCTTACTGCAACGTTATAT
GAACCTGGCGGGCGGTTATTCCGGGCATAGCGGCGATTATTCAACCGGAGCGGCACAGGTGA
TCATGCCGCATGTGGTCGGTTCTGTAGAGGTGTATGAACAGCAGACCTCCTGGCCGCTTATT
CTGGAAAACAGCCAGGTGGTGGTGTGTGGGGGATGAACCCGCTGAACACGCTCAAAATTGC
CTGGAGCAGTACCGATGAGCAAGGGCTGGAATACTTCCATCAGCTGAAAAAATCTGGCAAAC
CAGTGATTGCCATTGATCCTATCTGCTCCGAAACCATCGAATTCTTTGGCGATAATGCCACC
TGGATCGCACCGAATATGGGCACCGATGTGGCACTGATGTTAGGGATTGCGCATACCCTGAT
GACACAAGGCAAACACGATAAAGTGTTCTTGAAAAATACACTACCGGGTATCCGCAGTTTG
AAGAGTATCTGACAGGTAAGAGCGATAATACGCCGAAGAGCGCGGCCTGGGCGGCGGAAATT
ACTGGCGTACCGGAAGCGCAGATAGTCAAACCTCGCTGAACTGATGGCGGCAAATCGCACAAAT
GCTGATGGCAGGCTGGGGAATTCAGCGCCAGCAATATGGTGAACAGAAACACTGGATGCTGG
TGACGCTGGCGGCGATGTTAGGGCAGATTGGTACACCGGGCGGCGGGTTTGGTTTCTCTTAT
CATTACTCCAACGGTGGCAACCCGACGCGTGTGGCGGAGTGCTACCAGAAATGTCTGCGGC
GATTGCCGGACAGGCCAGCGAGGCCGCTGATGATGGCGGAATTACGGCGATTCTGTGTTGCCC
GTATCGTCGATGCGCTGGAAAATCCTGGCGGCAAATATCAGCATAACGGTAAAGAACAAACG
TATCCGAATATCAAAATGATCTGGTGGGCGGGTGGCGGTAACTTTACCCATCACCAGGATAC
TAATCGTCTGATTAAAGCATGGCAGAAACCGGAGATGATCGTCGTTTCTGAATGCTACTGGA
CCGCAGCTGCTAAACATGCAGATATCGTATTACCGATCACCACATCGTTTGAGCGCAATGAC
CTGACGATGACCGGTGATTACAGCAACCAGCATATTGTGCCGATGAAGCAGGCTGTGCTCC
GCAATTTGAAGCGCGCAACGATTTTGACGTGTTTGCCGATCTTGCTGAATTACTCAAACCTG
GCGGAAAAGAGATCTATACCGAAGGTAAAGATGAAATGGCGTGGCTGAAATTTTTCTATGAT
GCCGCTCAGAAAGGTGCGCGTGCGCAACGCGTGACGATGCCAATGTTTAATGCCTTCTGGCA
GCAAAATAAACTGATCGAAATGCGCCGACGAGAGAAGAACGAACAGTACATTCTGTTATGGTG
ATTTCCGCGCCGATCCGGTGAAAAATGCGCTGGGTACACCAAGCGGCAAAATTGAGATTTAC
TCCAGAACGCTGGAAAAATTTGGCTATAAGGATTGCCCGGCACACCCAACCTGGCTTGCGCC
TGATGAGTGGAAGGGTACCGCCGACGAGAAGCAGTTGCAGCTTCTGACCGCACATCCGGCAC
ACCGTTTACACAGTCAGCTTAACTATGCGGAACTGCGTAAAAAATATGCGGTTGCCGATCGT
GAACCAATCACTATTACACCGAAGATGCTGCTCGCTTTGGTATTGCGAATGGCGATCTGGT
GCGTGTCTGGAACAAGCGCGGTGAGATTCTGACAGGCGCGGTGGTGAAGTACGGGATCAAAA
AAGGCGTGGTATGCGTGCATGAAGGTGCATGGCTAGATCTGGAAAATGGCTTGTGTAAAAAC
GGTAGTGCGAACGTGTTAACGGCGGATATCCCCAGCTCGCAGCTGGCGAATGCCTGTGCCGG

TAACACTGCGCTGGTGTATATCGAAAAATATACGGGCAATGCGCCGAAGTTAACGGCGTTTG
ATCAGCCAGCTGTTTCAGGCAAAGCTTGGGCCCCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
AATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGT
TTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCT
GATAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAC
CAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAC
TGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTT
GTTTGTCTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCG
AAGCAACGGCCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAA
GCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAACTCTTTTGTTTTATTTTTC
TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA
TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGG
CATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGAT
CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAG
TTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGG
TATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAAT
GACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGA
ATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA
TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC
TGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC
GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
CTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT
CATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA
GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAG
CATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTT
TTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAC
GTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGAT
CCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGC
AGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
GCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCT
GAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC

GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGT
ATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG
TCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT
TTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTAT
TTCACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGT
ATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTC
TCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTCCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCAGAT
CAATTGCGCGCGAAGGCGAAGCGGCATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGA
TTCTGCAAACCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAATTGTCTGATTTCGTTACCAATTATGAC
AACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTCAACAACCGGCACGGAACTCGCTCGGGCTGGC
CCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAACCAACATTGCGAC
CGACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGG
TCCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGA
CGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAATTTGCTGTCTGCCAGGTGAT
CGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTA
ATCGCTTCCATGCGCCGCAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATA
GCGCCCTTCCCCTTGCCCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGT
GCGCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCA
TGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTGCGGAGCCTCCGGATG
ACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAAACAA
ATTCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCT
TTCATTCCCAGCGGTCGGTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAA
ACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTTCGCTTCAG
CCATACTTTTCATACTCCCGCCATTCAGAG

8 Darstellung des Eigenanteils gemäß § 8 der Promotionsordnung

Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht. Im Folgenden wird für die jeweiligen Veröffentlichungen der Eigenanteil gemäß § 8 Abs. 2 der Promotionsordnung dargestellt.

New Design of an Activity Assay Suitable for High-Throughput Screening of Substrates and Inhibitors of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC)

- *Cathrin Klopp, Michel A. Struwe, Christoph Plieth, Bernd Clement, Axel J. Scheidig*
- *Analytical Chemistry*, **2023** Aug 22;95(33):12452-12458
- <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02109>

Axel J. Scheidig und Bernd Clement haben das Projekt entwickelt und betreut. Michel A. Struwe hat die rekombinanten Proteine produziert. Christoph Plieth half bei enzymkinetischen Fragestellungen. Cathrin Klopp hat den Assay entwickelt und durchgeführt, ausgewertet und analysiert. Alle Autoren waren am Schreibprozess beteiligt.

Dieses Manuskript wurde als Projektarbeit für die Weiterbildungsprüfung zur Fachapothekerin in dem Gebiet „Pharmazeutische Analytik und Technologie“ eingereicht.

Reduction of Hydrogen Peroxide by Human Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzymes

- *Sophia Rixen, Patrick M Indorf, Christian Kubitza, Michel A Struwe , Cathrin Klopp, Axel J Scheidig , Thomas Kunze, Bernd Clement*
- *Molecules*, **2023** Aug 31;28(17):6384
- <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02109>

Axel J. Scheidig, Thomas Kunze und Bernd Clement haben das Projekt entwickelt und betreut. Christian Kubitza hat die rekombinanten Proteine produziert. Sophia Rixen und Michel A. Struwe haben das Manuskript geschrieben. Sophia Rixen hat die Zellkulturversuche durchgeführt und ausgewertet. Patrick Indorf und Cathrin Klopp haben enzymkinetische Untersuchungen mit rekombinantem Protein durchgeführt.

Hepatic mARC1 is the main contributor to metabolic reduction of *N*-hydroxyurea

- Cathrin Klopp, Xiaomei Zhang, Morgan K Campbell, David Kvaskoff, Michel A Struwe, Curtis R Warren, Besnik Bajrami, Axel J Scheidig, Amanda K Jones, Bernd Clement
- Eingereicht im *Journal of Medicinal Chemistry* am 15.05.2024, Revision-Prozess
- Bernd Clement, Amanda K. Jones, Axel J. Scheidig und Curtis R. Warren haben das Projekt entwickelt und betreut. Michel A. Struwe hat die rekombinanten Proteine produziert. Xiaomei Zhang, Morgan K Campbell, David Kvaskoff und Besnik Bajrami haben die *in-vivo* Versuche durchgeführt. Cathrin Klopp hat die enzymkinetischen Bestimmungen mit rekombinantem Protein durchgeführt. Michel A Struwe, Cathrin Klopp, Axel Scheidig und Bernd Clement waren am Schreibprozess beteiligt.

Erklärung gemäß §8 und §9 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß §9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass es sich bei der vorliegende Dissertation - abgesehen von der Beratung durch den Betreuer - nach Inhalt und Form um eine eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasste Arbeit auf Grundlage eigenständiger, wissenschaftlicher Leistungen handelt. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt.

Weiterhin versichere ich, dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde, sowie, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.

Cathrin Klopp

Ort/Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Strukturbioogie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von

Prof. Dr. Axel J. Scheidig

Ich danke Axel für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und vor allem seine stets konstruktive Unterstützung während meiner gesamten Promotion. Besonders dankbar bin ich für das große Vertrauen und entgegengebrachte Verständnis, sodass ich Berufliches und Privates immer miteinander vereinen und mich stetig weiterentwickeln konnte.

An zweiter Stelle danke ich **Prof. Dr. Bernd Clement** für die fortdauernde Unterstützung und Ideenfindung sowie die regen und zielführenden Diskussionen während meiner gesamten Promotion.

Ein großer Dank gilt auch PD Dr. Christoph Plieth für die unermüdliche Unterstützung zu enzymkinetischen und weiteren wissenschaftlichen Fragestellungen, der stetigen Unterstützung und der einen oder anderen aufmunternden und beruhigenden Worten. Danke, dass deine Tür immer für mich offenstand!

In der Pharmazie haben mir Gudrun, Antje und Petra einen angenehmen Einstieg ermöglicht. Auch Sophia, Jonas und Inken F. haben durch den privaten und beruflichen Austausch zu einer besonderen Atmosphäre beigetragen. Wenn sie auch sehr kurz war, bleibt für mich die gemeinsame Bürozeit mit Pia in Erinnerung, die in eine wunderbare Freundschaft mündete. Prof. Dr. Dennis Schade danke ich für die gute Zusammenarbeit in der Lehre des 8. Semesters.

Aus der Arbeitsgruppe möchte ich Inken L., Livia, Sonja, Susi, Brigitte und vor allem Michel für die stetige Unterstützung meiner Arbeit danken. Besonders hervorheben möchte ich Alex und Yasemin, die für eine wunderbare Bürozeit, gemeinsame Mittagspausen und die einen oder anderen (längeren) Abende gesorgt haben. Ich werde euch vermissen. Danke für eure tatkräftige Unterstützung – insbesondere für die moralische Unterstützung in den schwierigen Zeiten. Auch bei Isabel möchte ich mich besonders für die Unterstützung im Labor und dein offenes Ohr danken. Aber auch den Studis gebührt mein Dank – vor allem Charlotte und Anna. Die stets mit frischem Kaffee gefüllte Kaffeekanne war wirklich ein schöner Luxus!

Cathrin Burs danke ich für die harmonische und unkomplizierte Zusammenarbeit, wodurch ich meine Promotion und meinen Minijob in der Apotheke vereinen konnte.

Für das Korrekturlesen geht ganz besonderer Dank an Christoph, Michel, Axel, Bernd und Anne. Danke für euer Durchhalten!

Abseits der Uni habe ich viele wunderbare Menschen an meiner Seite, bei all denen ich mich herzlich bedanken möchte, aber leider nicht alle aufzählen kann. Ich bin vor allem meinen Fußball-Freundinnen und den lieb gewonnen Menschen aus dem Ruderclub dankbar. Für gute Trainings (und Muskelkater) waren vor allem David und Ronya verantwortlich.

Aber auch meinen Schulfreund:innen Alicia und Henning sowie meinen Unifreundinnen Alessa und Franzi danke ich dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mich stets unterstützt habt. An dieser Stelle möchte ich besonders Anna-Katharina und Kimi hervorheben. Ohne euch wäre Kiel nicht das für mich, was es nun für mich ist und ich werde die Zeit mit euch immer in meinem Herzen tragen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meiner besten Freundin Miriam. Danke, dass du immer für mich da bist, mich unterstützt und mir Mut zuredest. Zudem gilt Miriams Eltern, meiner Ferienfamilie, ein großer Dank.

Der letzte und größte Dank gilt meinen Eltern Anette und Jörn und meinen Geschwistern Anne und Ehlar: Ihr unterstützt mich bedingungslos in privater, beruflicher und sportlicher Hinsicht. Ihr hebt mich wieder auf, wenn ich mal hinfalle und gebt mir die Sicherheit, jede Lebenssituation zu meistern. Danke für alles!

10 Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der mitochondrialen Amidoxim reduzierenden Komponente im Jahr 2006 durch Havemeyer *et al.* wurde die Analytik der Enzymaktivitäten mittels HPLC durchgeführt (Havemeyer *et al.*, 2006; Kotthaus *et al.*, 2011). Erst mit der Entwicklung des absorptionsbasierten Assays von Indorf *et al.*, bei dem der Verbrauch an NADH gemessen wird, wurde das zeitliche Verfolgen der Reaktion ermöglicht (Indorf *et al.*, 2020). Sowohl bei dem HPLC-basierten Assay als auch bei dem absorptionsbasierten Assay verbleibt ein hoher Zeit- und Materialaufwand, welches durch die Entwicklung des neuen Assays im 96-*well*-Mikrotiterplattenformat stark reduziert wurde. Zudem ist durch das Messen der Fluoreszenz auch die Vermessung farbiger Substanzen möglich, sofern diese nicht bei 465 nm fluoreszieren. Darüber hinaus ist die Anwendung im Hochdurchsatz-Screen denkbar, indem eine Übertragung auf größere Mikrotiterplattenformate (beispielsweise 384-*well*-Format) und die Zuhilfenahme eines Pipettierroboters durchgeführt wird.

Mit diesem Assay konnten neben der Vermessung zahlreicher Substanzen weitere Substrate identifiziert und bekannte Substrate enzymkinetisch charakterisiert werden. Zudem konnte mit diesem Assay eine neue funktionelle Gruppe für das mARC-Enzymsystem, die nicht auf eine *N*-O-Bindung zurückzuführen ist, vermessen werden. Wasserstoffperoxid ist die erste Verbindung, anhand derer eine Reduktion einer O-O-Bindung durch das mARC-Enzymsystem nachgewiesen werden konnte. Dies belegt, dass das Substratspektrum deutlich breiter sein könnte als nur eine *N*-O-Reduktion (Rixen *et al.*, 2023). Im Hinblick auf die bisher unbekannte physiologische Funktion von mARC liefert dieses erste Hinweise für eine mögliche Rolle im Metabolismus. Denn eine Reduktion von Peroxiden als reaktive Sauerstoffspezies führt zu einer Detoxifizierung und kann damit eine potentielle schützende Funktion innehaben.

Weiterhin wurde die Reduktion von Hydroxyharnstoff zu Harnstoff genauer untersucht. Bisher wurde nur Harnstoff im Urin nachgewiesen. Mit übereinstimmenden *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten wurde mit der Reduktion durch das mARC-Enzymsystem erstmals ein Metabolisierungsweg für diesen Arzneistoff aufgezeigt.

Einige Substrate, wie Trimethylamin-*N*-Oxid werden mit nur sehr geringen Umsetzungsraten reduziert. Für die Beantwortung quantenmechanischer Fragestellungen wurde das Enzymsystem gewechselt und die Reduktion von

Trimethylamin-*N*-Oxid durch die bakterielle TMAO-Reduktase TorZ mit Hilfe des Methylviologen-Assays untersucht. In Abhängigkeit, ob eine, zwei oder alle drei Methylgruppen ^{13}C -markiert vorliegen, konnten keine signifikanten enzymkinetischen Unterschiede detektiert werden, im Gegensatz zur theoretischen Vorhersage.

11 Abstract

Since the discovery of the mitochondrial amidoxime-reducing component in 2006 by Havemeyer *et al.*, the enzyme activities have been analyzed using HPLC (Havemeyer *et al.*, 2006; Kotthaus *et al.*, 2011). It was only with the development of the absorption-based assay by Indorf *et al.*, in which the consumption of NADH is measured, that it became possible to follow the reaction in time (Indorf *et al.*, 2020). Both the HPLC-based assay and the absorption-based assay require a lot of time and material, which has been greatly reduced by the development of the new assay in 96-*well*-microtiter plate format. In addition, measuring fluorescence also makes it possible to measure colored substances, provided they do not fluoresce at 465 nm. Furthermore, the application in a high-throughput screen is conceivable by transferring to larger microtiter plate formats (e.g. 384-*well*-format) and with the aid of a pipetting robot.

With this assay, in addition to measuring numerous substances, further substrates could be identified and known substrates could be characterized using enzyme kinetics. In addition, a new functional group for the mARC enzyme system, which is not attributable to an *N*-O-bond, could be measured with this assay. Hydrogen peroxide is the first compound to demonstrate a reduction of an O-O-bond by the mARC enzyme system. This proves that the substrate spectrum could be much more broader than just *N*-O reduction (Rixen *et al.*, 2023). With regard to the so far still unknown physiological function of mARC, this provides new interesting indications of a possible role in metabolism. A reduction of peroxides as a reactive oxygen species leads to detoxification and may therefore have a potential protective function.

Furthermore, the reduction of hydroxyurea to urea was investigated in more detail. Previously, only urea was detected in urine. With consistent *in-vitro* and *in-vivo* data, the reduction by the mARC enzyme system has revealed a metabolization pathway for this drug for the first time.

Some substrates, such as trimethylamine *N*-oxide, are reduced with only very low conversion rates. To answer quantum mechanical hypothesis, the enzyme system was changed and the reduction of trimethylamine *N*-oxide by the bacterial TMAO reductase TorZ was investigated using the methyl viologen assay. Depending on whether one, two or all three methyl groups are ¹³C-labeled, no significant enzyme kinetic differences could be detected, in opposite to the quantum mechanical hypothesis.