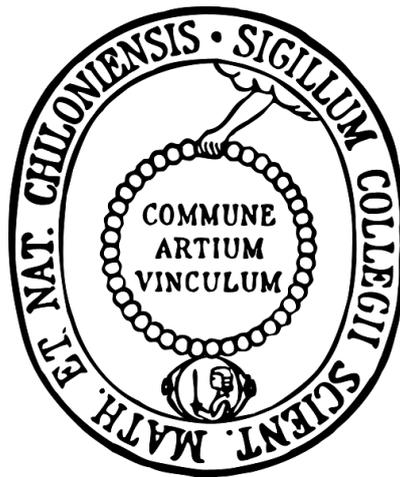


Die Komponenten des mARC-Enzymsystems im N-reduktiven Metabolismus humaner Zellen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Birte Plitzko

Kiel 2014

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

07. Oktober 2014

Zum Druck genehmigt:

07. Oktober 2014

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl
(Dekan)

*It's not what you look at that matters, it's what you see.
– Henry David Thoreau*

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Biotransformation	1
1.1.1 Definition und Bedeutung.....	1
1.1.2 Biotransformationsstudien.....	2
1.2 Reduktion <i>N</i>-hydroxylierter Verbindungen	3
1.2.1 <i>N</i> -hydroxylierte Verbindungen als Prodrugs stark basischer Amidin- und Guanidinfunktionen.....	4
1.2.2 Entgiftung toxischer <i>N</i> -hydroxylierter Verbindungen	5
1.2.3 <i>N</i> -hydroxylierte Basenanaloga.....	5
1.3 Molybdoenzyme	10
1.3.1 Vorkommen und Funktion.....	10
1.3.2 Molybdäncofaktor	12
1.3.2.1 Biosynthese	12
1.3.2.2 Einteilung der Molybdoenzyme nach der Struktur des MocoS	15
1.4 Das mARC-haltige mitochondriale <i>N</i>-reduktive Enzymssystem	16
1.4.1 Das Molybdoenzym mARC.....	18
1.4.2 Cytochrom b ₅	20
1.4.3 NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase.....	21
1.5 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Materialien und Geräte	25
2.1 Zelllinien	25
2.2 Medien und Mediensupplemente	25
2.3 siRNA-Oligonukleotide	26
2.4 Proteine	26
2.5 Antikörper	27
2.6 Materialien und Reagenzien	27
2.7 Geräte	28

3	Experimentelle Methoden	30
3.1	Zellkulturmethoden	30
3.1.1	Kultivierung humaner Zelllinien	30
3.1.2	Design der Knockdown Experimente	32
3.1.3	Bestimmung der <i>N</i> -reduktiven Aktivität in humanen Zelllinien	32
3.1.3.1	Biotransformationsansatz in humanen Zellen	32
3.1.3.2	HPLC-Analytik	33
3.1.4	Gewinnung der zellulären Proteine	34
3.1.5	Zellviabilitätsmessung mittels Resazurin-Assay	35
3.1.6	Bestimmung der reduktiven Biotransformation von Sulfamethoxazol-Hydroxylamin durch HEK-293	36
3.1.7	Bestimmung der reduktiven Biotransformation des <i>N</i> -hydroxylierten Basenanalogs 6- <i>N</i> -Hydroxylaminopurin durch HEK-293	36
3.1.7.1	Biotransformationsansatz	36
3.1.7.2	HPLC-Analytik	37
3.1.8	Untersuchung der Biotransformation des <i>N</i> -hydroxylierten Basenanalogs 6- <i>N</i> -Hydroxyadenosin durch HEK-293	38
3.1.8.1	Biotransformationsansatz	38
3.1.8.2	Metabolisierung nach Hemmung der Adenosindesaminase in HEK-293	38
3.1.8.3	HPLC-Analytik	39
3.1.9	HAP-Sensibilisierungs-Assay durch mARC-Knockdown in HeLa	40
3.1.10	Apoptosedetektion	41
3.1.10.1	Annexin V-PE/7-AAD-Färbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie	41
3.1.10.2	Detektion von Poly(ADP-ribose)-Polymerase-Spaltprodukten	42
3.1.10.3	Hoechst-Färbung	42
3.2	Proteinbiochemische Methoden	43
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.2.2	Western Blot Analyse	43
3.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.2.2.2	Western Blot	44

3.2.3	Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus CYB5A-Knockout- und Wildtyp-Mauslebern.....	45
3.2.4	Expression und Reinigung der rekombinanten humanen Proteine.....	45
3.2.5	Bestimmung der Cofaktor-Konzentrationen der rekombinanten humanen Proteine	46
3.2.5.1	Bestimmung des FAD-Gehalts der NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase	46
3.2.5.2	Bestimmung des Cytochrom b ₅ -Häm-Gehalts	46
3.2.5.3	Bestimmung des Moco-Gehalts von mARC.....	46
3.2.6	Herstellung von Apo-Cytochrom b ₅	48
3.2.7	Häm-Inkorporation in Apo-Cytochrom b ₅	48
3.3	Enzymassays.....	49
3.3.1	<i>In vitro</i> N-Reduktions-Assay im rekombinanten System.....	49
3.3.2	<i>In vitro</i> N-Reduktions-Assay mit subzellulären Fraktionen.....	49
3.3.3	Untersuchung der Biotransformation des Basenanalogs 6- <i>N</i> -Hydroxyadenosin durch rekombinante humane Adenosindesaminase.....	50
3.4	Datenanalyse.....	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Charakterisierung des N-reduktiven Metabolismus verschiedener humaner Zelllinien	51
4.2	siRNA-vermittelter Knockdown.....	53
4.3	mARC1 und mARC2 im N-reduktiven Metabolismus humaner Zellen	55
4.4	Cytochrom b₅ im N-reduktiven System.....	60
4.4.1	Mitochondriales und mikrosomales Cytochrom b ₅ im rekombinanten N-reduktiven System.....	60
4.4.2	Mitochondrialer und mikrosomaler Cytochrom b ₅ -Knockdown in HEK-293.....	61
4.4.3	Mikrosomales Cytochrom b ₅ -Knockout Maus.....	64
4.4.4	Beteiligung des Cytochrom b ₅ -Häms im N-reduktiven System.....	65
4.5	NADH-Cytochrom b₅ Reduktase im N-reduktiven Metabolismus humaner Zellen.....	69
4.6	Reduktive Detoxifizierung mutagener N-hydroxylierter Basen in humanen Zellen durch das mARC-Enzymsystem.....	72
4.6.1	Reduktive Detoxifizierung von 6- <i>N</i> -Hydroxylaminopurin	72

4.6.1.1	mARC-vermittelte <i>N</i> -reduktive Umsetzung durch HEK-293	72
4.6.1.2	HAP-induzierte Apoptose nach mARC-Knockdown in HeLa.....	75
4.6.1.2.1	Hoechst-Färbung.....	77
4.6.1.2.2	Durchflusszytometrische Analyse der Annexin V-PE/7-AAD-Färbung.	79
4.6.1.2.3	Detektion von PARP-Spaltprodukten	84
4.6.2	Detoxifizierung von 6- <i>N</i> -Hydroxyadenosin	87

5 Diskussion **92**

5.1	Beteiligung von mARC1/mARC2, mitochondrialem Cytochrom b₅, sowie der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase 3 am <i>N</i>-reduktiven Metabolismus humaner Zellen	92
5.1.1	Beteiligung von mARC1 und mARC2	92
5.1.2	Beteiligung von mitochondrialem Cytochrom b ₅	95
5.1.3	Beteiligung der NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase 3	97
5.2	mARC-Enzysystem als Detoxifizierungssystem mutagener <i>N</i>-hydroxylierter Basenanaloga in humanen Zellen.....	98

6 Zusammenfassung **106**

7 Literaturverzeichnis **110**

Anhang	125
Erklärung zu §7 der Promotionsordnung	144
Danksagung	146
Lebenslauf.....	148
Kurzfassung.....	149
Abstract	150

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosindesaminase
APRT	Adeninphosphoribosyltransferase
Aqua bidest	Aqua bidestillata
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
BN-PAGE	Blue native PAGE
cDNA	komplementäre DNA
cPMP	cyclisches Pyranopterin-Monophosphat
CYB5	Cytochrom b ₅
CYB5R	NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase
CYP450	Cytochrom P450
d	Tage (<i>days</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBS	fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FMO	Flavin-Monooxygenase
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>Forward Scatter</i>)
g	Gramm (m = milli, μ = mikro, n = nano)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunden (<i>hours</i>)
HAP	6- <i>N</i> -Hydroxyadenin (6- <i>N</i> -Hydroxylaminopurin)
HAPMP	HAP-Monophosphat

HAPDP	HAP-Diphosphat
HATP	HAP-Triphosphat
HAPR	6- <i>N</i> -Hydroxyadenosin (6- <i>N</i> -Hydroxylaminopurinribosid)
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i>)
IgG	Immunglobulin G
IMP	Inosinmonophosphat
ITPase	Inosintri-phosphatpyrophosphatase
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LLD	Detektionsgrenze (<i>lower limit of detection</i>)
mARC	<i>mitochondrial Amidoxime Reducing Component</i>
M	molar (mol/l; m = milli, μ = mikro, n = nano)
MeCN	Acetonitril
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
miRNA	<i>micro</i> RNA
l	Liter (m = milli, μ = mikro)
mol	Mol (m = milli, μ = mikro, n = nano, p = piko)
Mo	Molybdän
Moco	Molybdäncofaktor
MOCS	<i>molybdenum cofactor synthesis</i>
MOSC	Moco Sulfurase C-terminale Domäne
MPT	Molybdopterin
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse / Ladungsverhältnis
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid

n	Stichprobengröße
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NO	Stickstoffmonoxid
NOHA	<i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-Arginin
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonidet® P-40)
OMM	äußere mitochondriale Membran (<i>outer mitochondrial membrane</i>)
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMX-HA	Sulfamethoxazol-Hydroxylamin
SO	Sulfitoxidase
SS	Seitwärtsstreulicht (<i>Side Scatter</i>)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TBST	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween®-20
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreduktase

1 Einleitung

1.1 Biotransformation

1.1.1 Definition und Bedeutung

Xenobiotika und Endobiotika unterliegen im Organismus enzymatischen strukturellen Umwandlungsprozessen, welche die Elimination der Stoffe durch Erhöhung der Hydrophilie erleichtern und somit die Anreicherung lipophiler Stoffe im Gewebe verhindern. Diese Umwandlungsprozesse werden unter dem Begriff Biotransformation zusammengefasst.⁽¹⁾ Biotransformation findet hauptsächlich in der Leber statt, aber in geringerem Maße sind auch andere Gewebe wie Darm, Niere, Gehirn, Lunge, Haut, Milz, Muskulatur oder Blut zur Biotransformation befähigt. Meist sind die metabolisierenden Enzyme intrazellulär strukturell gebunden in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Mitochondrien oder strukturell ungebunden als lösliche Enzyme im Cytosol zu finden. Die Biotransformationsreaktionen lassen sich in Phase I und Phase II Reaktionen einteilen. Die Phase I Reaktionen werden auch als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet und umfassen Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen. Dabei werden funktionelle Gruppen eingeführt, an die in einer anschließenden Phase II ein aktiviertes körpereigenes hydrophiles Molekül wie Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion, S-Adenosylmethionin oder Glycin konjugiert werden kann. Wenn entsprechende funktionelle Gruppen schon vorliegen, können Phase II Reaktionen auch direkt ablaufen. Nicht nur die physikochemischen Eigenschaften sondern auch die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften eines Stoffes werden durch die Biotransformation verändert. Meist führt die erhöhte Hydrophilie zu einer geringeren pharmakologischen Aktivität also zu einer Bioinaktivierung. In selteneren Fällen kann es allerdings zu einer Bioaktivierung oder sogar zu einer Biotoxifizierung kommen. Die Bioaktivierung durch den körpereigenen Metabolismus macht man sich beim Prodrug-Prinzip zu Nutze. Hierbei wird ein inaktiver oder wenig aktiver Arzneistoff erst durch die Biotransformation in einen aktiven Metaboliten überführt. Die Entwicklung von Prodrugs bietet die Möglichkeit gewünschte pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften

wie beispielsweise Resorption, Wirkdauer, Bioverfügbarkeit oder Targeting zu verbessern.

1.1.2 Biotransformationsstudien

Zur Beurteilung und Entwicklung neuer Arzneistoffe sind Biotransformationsuntersuchungen unentbehrlich und gemäß dem Arzneimittelgesetz im Rahmen des Zulassungsverfahrens vorgeschrieben. Die Aufklärung und Charakterisierung der komplexen Prozesse des Fremdstoffmetabolismus ist von entscheidender Bedeutung um Aspekte der Pharmakokinetik, Wirkung, Wirksamkeit, Nebenwirkungen und Toxizität, aber auch spezielle Fragen, wie den Wirkmechanismus ableiten zu können. Gleichzeitig können Biotransformationsstudien in der Grundlagenforschung ein nützliches Tool zur Aufklärung verschiedenster biochemischer Prozesse sowie zur Identifikation und Aufklärung der Funktion von Zielstrukturen darstellen.

Biotransformationsstudien lassen sich in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen einteilen. *In vivo* Untersuchungen im Tier und auch im Mensch sind zur Erfassung der komplexen Vorgänge im Gesamtorganismus unvermeidbar, da systemische Einflüsse, chronische Effekte und organspezifische Aspekte nur unzureichend mit *in vitro* Systemen aufgeklärt werden können. Grundsätzlich ist allerdings das Ziel die Zahl der *in vivo* Versuche durch vorherige geeignete *in vitro* Studien zu vermindern. Außerdem besteht häufig die Notwendigkeit der Entwicklung von *in vitro* Methoden, da systemische Einflüsse im Gesamtorganismus die Untersuchung eines gezielten Prozesses oder enzymatischer Grundlagen behindern können. So ist häufig der Erkenntnisgewinn bei der Verwendung sinnvoller *in vitro* Testsysteme höher als bei Untersuchungen im Gesamtorganismus.

Den größten Teil unter den *in vitro* Methoden nehmen Zellkulturen ein. Zellkulturen lassen sich in Primärkulturen und permanente Zelllinien einteilen. Ausgangsmaterial für Primärkulturen sind durch Isolierung aus Organen oder Geweben gewonnene Zellen, deren Lebensdauer unter *in vitro* Bedingungen aufgrund der eintretenden Seneszenz limitiert ist. Bei permanenten Zelllinien handelt es sich um *in vivo* transformierte Tumorzellen oder stabil transfizierte Zellen, die durch ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit immortal sind. Entscheidender Nachteil von permanenten Zelllinien ist jedoch, dass häufig zellspezifische Charakteristika durch genetische Instabilität und Entdifferenzierungsprozesse verloren gehen.

Weitere Testsysteme stellen isolierte perfundierte Organe, Organschnitte, isolierte Enzyme oder subzelluläre Systeme wie Mikrosomen, Mitochondrien oder Cytosol dar. Die verschiedenen Testsysteme weisen unterschiedliche Komplexitätsgrade auf, wobei die Vorteile von molekularen oder zellulären Testmethoden, die zum gezielten Erkenntnisgewinn führen können, gleichzeitig die Aussagekraft begrenzen. Daher sollte je nach Fragestellung der Komplexitätsgrad bei der Auswahl des Modellsystems und Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

1.2 Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen

Reduktionen an Kohlenstofffunktionen spielen im Phase I Metabolismus im Vergleich zu Oxidationen eine eher untergeordnete Rolle. An stickstoffhaltigen Funktionen sind Reduktionen dagegen leicht möglich. Azoverbindungen werden vermutlich über die CYP450-Reduktase zu primären Aminen umgesetzt.⁽¹⁾ Nitroverbindungen werden über die Molybdoenzyme Xanthinoxidoreduktase und Aldehydoxidase sowie durch CYP450 reduziert.⁽²⁻⁴⁾ Über CYP450 katalysierte Metabolisierungen können Stickstoffverbindungen oxyniert werden.⁽⁵⁻⁷⁾ Die Rückreduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen verläuft im Organismus allerdings sehr ausgeprägt und überwiegt die CYP450 katalysierte *N*-Oxygenierung meist um ein Vielfaches.^(8,9) Die enzymatische Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen wurde bereits vor über 40 Jahren beschrieben. Bernheim beobachtete eine mitochondriale membrangebundene NADH-abhängige Hydroxylaminreduktase^(10,11), während Kadlubar und Ziegler die Hydroxylaminreduktase als ein NADH-abhängiges mikrosomales Enzymsystem beschrieben, das aus Cytochrom b₅ (CYB5) und NADH-Cytochrom b₅ Reduktase (CYB5R) sowie einer dritten nicht identifizierten Komponente besteht und das für die Reduktion von Hydroxylaminen verantwortlich ist⁽¹²⁾. Später konnte gezeigt werden, dass vermutlich dasselbe Enzymsystem neben der Reduktion von Hydroxylaminen auch für die Reduktion von *N*-hydroxylierten Amidinen, Guanidinen und Amidinohydrazonen verantwortlich ist.^(6,13-17) Inzwischen sind für eine Vielzahl von *N*-hydroxylierten Verbindungen sowohl mikrosomale als auch mitochondriale Reduktionen beschrieben. Allerdings können üblicherweise in Mitochondrien-Fractionen deutlich höhere Umsetzungsraten als in Mikrosomen beobachtet werden.^(15,17,18) Während meist ein Enzymsystem aus den Elektronentransportproteinen CYB5 und CYB5R und einer dritten unbekannte Kompo-

nente beschrieben wird, ohne die keine oder vergleichsweise geringe *N*-reduktive Aktivität zu beobachten ist ^(12, 15, 19), postulieren andere ein mikrosomales *N*-reduktives Zwei-Komponenten-Enzymsystem, das nur aus CYB5 und CYB5R ohne eine dritte Komponente besteht ^(20, 21). Erst 2006 konnte die dritte Komponente aus porcinen Lebermitochondrien isoliert und als das bis dato unbekannte Molybdoenzym mARC (mitochondrial Amidoxime Reducing Component) identifiziert werden.⁽²²⁾

1.2.1 *N*-hydroxylierte Verbindungen als Prodrugs stark basischer Amidin- und Guanidinfunktionen

Eine wichtige pharmakologische Bedeutung haben enzymatische Reduktionen *N*-hydroxylierter Verbindungen bei der Bioaktivierung von Prodrugs stark basischer Stickstoffverbindungen. In zahlreichen Wirkstoffklassen sind stark basische Amidin- oder Guanidinstrukturen vertreten, da diese häufig für die Interaktion mit Carboxylat-Anionen der Targetmoleküle verantwortlich sind. Des Weiteren können diese Funktionen die Teilstruktur des Arginins imitieren und sind daher häufig Bestandteil peptidomimetischer Wirkstoffe.⁽²³⁾ Aufgrund ihrer starken Basizität bei einem pKs von 11 bzw. 13 liegen Amidine und Guanidine bei physiologischem pH-Wert fast vollständig geladen vor. Sie besitzen daher eine zu geringe Lipophilie, um im Gastrointestinaltrakt absorbiert werden zu können, was eine intravenöse Gabe der entsprechenden Arzneistoffe erforderlich macht. Entwickelt wurde daher ein Prodrug-Prinzip, bei dem durch *N*-Hydroxylierung der entsprechenden Verbindungen die Basizität gesenkt wird (pKs 4-5), so dass diese unter physiologischen Bedingungen überwiegend unprotoniert vorliegen. Diese Eigenschaft führt zu einer leichteren Resorption durch Diffusion und damit zu einer verbesserten oralen Bioverfügbarkeit. Durch enzymatische Reduktion können die resorbierten Prodrugs dann im Organismus in die aktive Wirkform überführt werden.⁽⁹⁾ (vgl. Abb. 1.1)

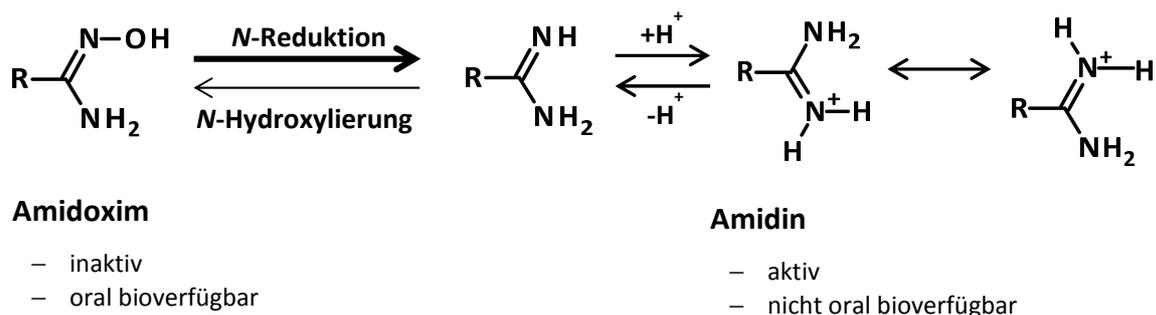


Abb. 1.1: Amidoxime als Prodrugs von Amidinen

Dieses Prodrug-Prinzip wurde ursprünglich für das Antiprotozoikum Pentamidin entwickelt.⁽²⁴⁾ Durch die Hydroxylierung der beiden Amidinfunktionen konnte eine signifikante anti-pneumocystische Aktivität nach oraler Applikation beobachtet werden.^(25,26) Mittlerweile wurde das Amidoxim-Prodrug-Prinzip auf viele weitere Verbindungen übertragen. Beispiele hierfür sind der Thrombininhibitor Melagatran (Ximelagatran)^(18,27), das Antihypertonikum Guanabenz (Guanoxabenz)⁽¹⁵⁾, der Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptorantagonist Ro 44-3888 (Sibrafiban)^(15,23,28) und der Serinproteaseinhibitor WX-UK1 (Upamostat)⁽²⁹⁾.

1.2.2 Entgiftung toxischer *N*-hydroxylierter Verbindungen

Die *N*-Oxygenierung im Phase I Metabolismus von aromatischen und heterocyclischen Aminen durch CYP450 Enzyme stellt häufig eine Biotoxifizierung dar. Von vielen dieser Substanzen ist bekannt, dass sie ihre toxischen und karzinogenen Eigenschaften über die Metabolisierung zu den entsprechenden *N*-hydroxylierten Verbindungen erhalten.^(7,8) Über instabile Esterkonjugate, die zu Nitreniumionen zerfallen, können die *N*-hydroxylierten Metabolite DNA-Addukte bilden oder mit anderen zellulären Makromolekülen reagieren.^(7,30)

Ebenso werden die zum Teil schweren Nebenwirkungen einiger Arzneistoffe, die aromatische Amine enthalten, wie die Antibiotika Sulfamethoxazol und Dapson, mit der Toxifizierung des aromatischenamins über CYP450 zum Hydroxylamin in Verbindung gebracht.^(31,32) Die reduktive Entgiftung dieser *N*-hydroxylierten Verbindungen stellt daher im Fremdstoffmetabolismus eine wichtige und effektive Detoxifizierungsreaktion dar.⁽⁸⁾

1.2.3 *N*-hydroxylierte Basenanaloga

Basenanaloga können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit natürliche Nukleinbasen imitieren. Dabei wirken sie als Antimetabolite und können so den Nukleinsäurebasenstoffwechsel hemmen oder sie werden analog zur kanonischen Base in die DNA bzw. RNA inkorporiert und übernehmen dort dessen Funktion. Nicht-kanonische Basenanaloga haben allerdings häufig die Eigenschaft durch eine im Vergleich zu den natürlichen Basen erhöhte Frequenz tautomerischer Shifts Fehlpaarungen auszulösen. Diese Fähigkeit zur ambivalenten Basenpaarung kann zu Transitionen innerhalb der DNA-Sequenz führen und so Mutationen auslösen.⁽³³⁾

In der Arzneimitteltherapie finden Basenanaloga aufgrund ihrer Eigenschaften Anwendung als Virustatika oder Zytostatika. Prominente Beispiele sind hier das Aciclovir, das ein Analogon des Guanins mit einer acyclischen Ribose darstellt und bei Infektionen durch Herpesviren angewendet wird, oder die Zytostatika 6-Thioguanin und 5-Fluoruracil, deren Anwendungsgebiete vor allem in der Chemotherapie gegen Formen der Leukämie liegen.

N-hydroxylierte Basenanaloga wie *N*-Hydroxycytosin (4-Hydroxyimino-2-Oxopyrimidine, HIOP), *N*-Hydroxyadenin (6-*N*-Hydroxylaminopurin, HAP) und 2-Amino-*N*-Hydroxyadenin (2-Amino-6-*N*-Hydroxylaminopurin, AHAP) oder die entsprechenden Nucleoside haben sich in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen als toxisch und mutagen erwiesen.^(34, 35)

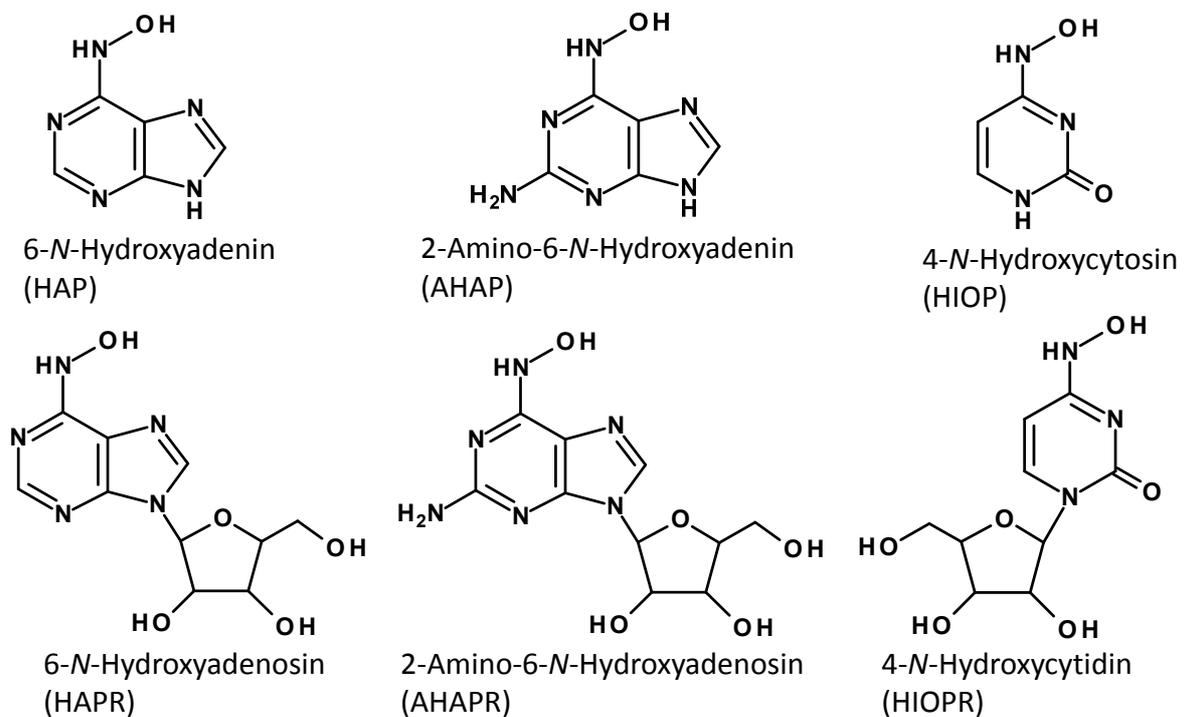


Abb. 1.2: Mutagene *N*-hydroxylierte Basenanaloga mit ihren Bezeichnungen und Abkürzungen. Die Abkürzungen stammen von den entsprechenden IUPAC Namen.

N-hydroxylierte Basenanaloga können über verschiedene Wege im Zuge des zellulären Metabolismus aus den natürlichen Nucleobasen entstehen und so zur Kontamination der Nucleotid-Pools führen. HAP kann über eine CYP450 katalysierte Oxygenierung des Adenins im Laufe der Biotransformation entstehen.⁽³⁶⁾ Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Adenylosuccinat-Synthase, ein Enzym der de-novo Purinbiosynthese,

HAP-Monophosphat (HAPMP) aus Inosinmonophosphat (IMP) generieren kann, wenn anstelle von Aspartat Hydroxylamin zur Verfügung steht.⁽³⁷⁾ Bei saurem pH kann die Aminogruppe von Adenosin oder auch Cytosin bereits rein chemisch durch Hydroxylamin substituiert werden.⁽³⁸⁾ HAP ist außerdem das Hauptprodukt der Oxidation von Adenin durch Peroxylradikale, die in signifikanten Konzentrationen bei oxidativem Stress, wie beispielsweise Entzündungsprozessen, in der Zelle gebildet werden.⁽³⁹⁾ Obwohl *N*-hydroxylierte Basenanaloga über diese Stoffwechselwege *in vivo* auf natürlichem Wege in den Nukleotid-Pool gelangen könnten, wurde bisher eine Kontamination über eine direkte Messung nicht nachgewiesen (vgl. Abb. 1.3).

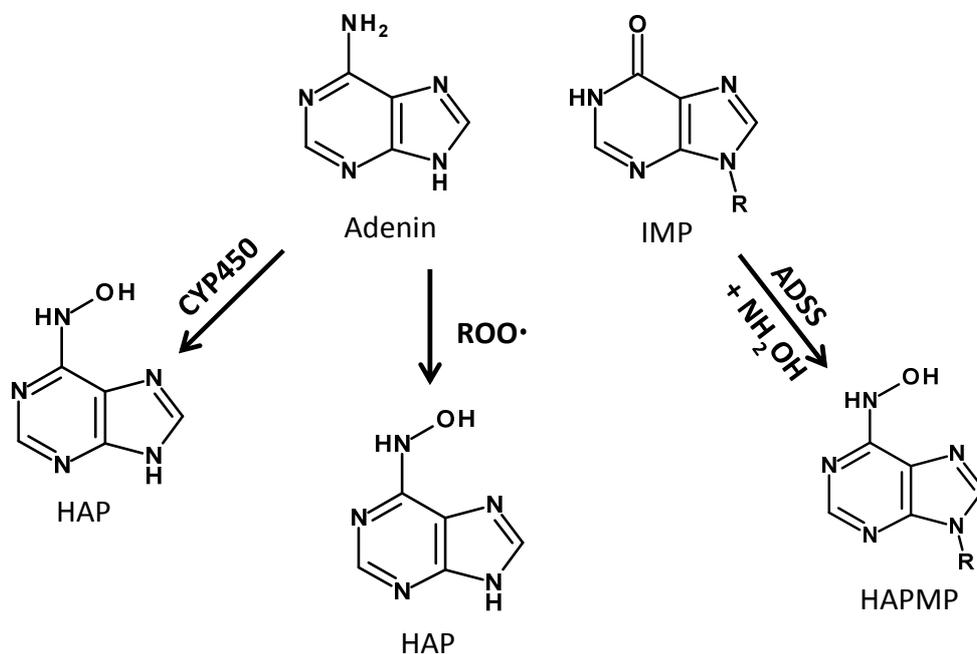


Abb. 1.3: Mögliche *in vivo* Generierung *N*-hydroxylierter Basenanaloga am Beispiel von 6-*N*-Hydroxylaminopurin. Adenin kann über CYP450 im Zuge der Phase I Biotransformation hydroxyliert werden.⁽³⁶⁾ Steht während der de-novo Purinbiosynthese Hydroxylamin zur Verfügung, kann die Adenylosuccinat-Synthase (ADSS) dieses anstelle von Aspartat mit IMP umsetzen. Es entsteht HAPMP.⁽³⁷⁾ Peroxylradikale (ROO·), wie sie bei oxidativem Stress in der Zelle vorkommen, können Adenin zu HAP oxidieren.⁽³⁹⁾

Die Mutagenität der *N*-hydroxylierten Basenanaloga ist auf deren Inkorporation in die DNA zurückzuführen.^(35, 40) Hierfür müssen die Basenanaloga zunächst im zellulären Metabolismus wie die entsprechenden natürlichen Basen zu den korrespondierenden Nukleosidtriphosphaten umgesetzt werden. Für die *N*-hydroxylierten Basenanaloga des Adenins ist der Mechanismus der Aktivierung gut untersucht. Postuliert wird, dass HAP ebenso wie Adenin im Salvage Pathway von der Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) zum Monophosphat umgesetzt wird.^(41, 42) Im Gegensatz zu HAP wird HAPR

anscheinend von der Adenosinkinase zum Monophosphat aktiviert.⁽⁴³⁾ Anschließend stellt HAPMP ein Substrat für die AMP-Kinase dar und kann von dieser zum HAP-Diphosphat umgesetzt werden. HAPDP kann dann wahrscheinlich den gewöhnlichen Stoffwechselweg über die Reduktion zum Desoxydiphosphat durch die Ribonukleotid-diphosphatreduktase und Phosphorylierung zum dHAPTP über die ADP-Kinase verfolgen. Gezeigt werden konnte, dass dHAPTP im Zuge der DNA-Synthese als Substrat für die DNA-Polymerase dienen kann und dabei sowohl Adenin als auch Guanin substituieren kann.^(44, 45) Aufgrund dessen wird angenommen, dass HAP im Sinne einer ambivalenten Basenpaarung sowohl in der Hydroxyamino-Form mit Thymin als auch in der Hydroxyimino-Form mit Cytosin paaren kann (vgl. Abb. 1.4). Kommt es durch den Einbau der *N*-hydroxylierten Base zu Fehlpaarungen, kann es in Folge dessen zu AT↔GC Übergängen kommen.^(44, 46)

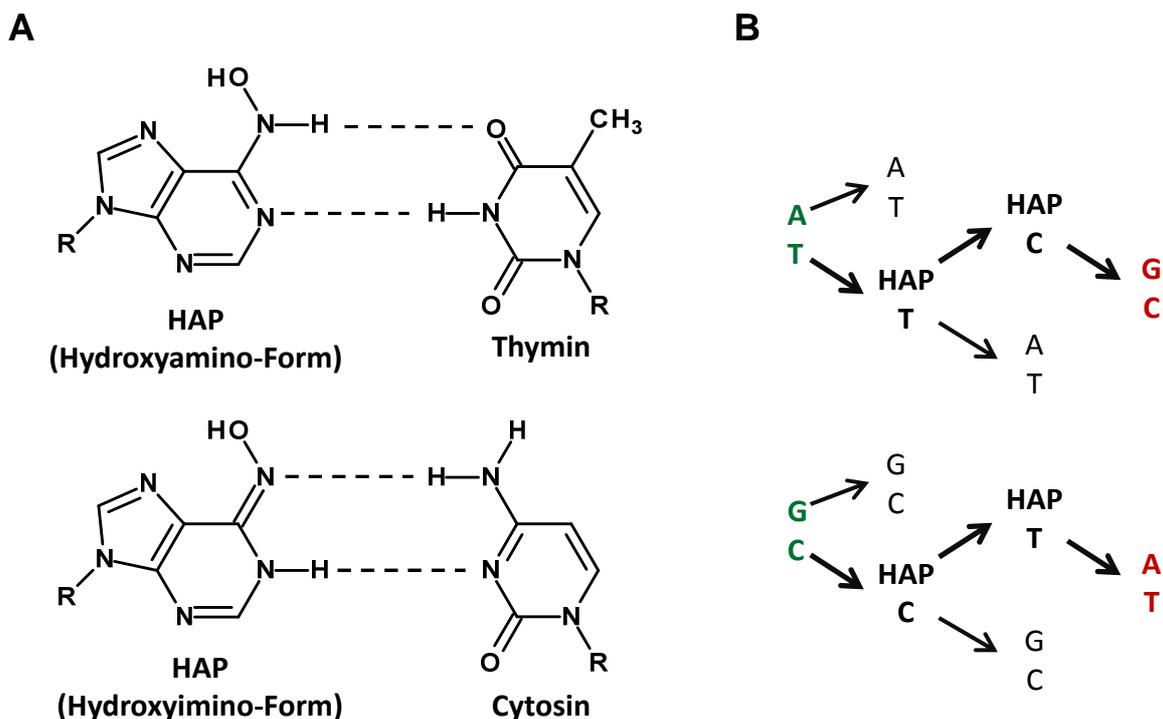


Abb. 1.4: Ambivalente Basenpaarung von 6-*N*-Hydroxylaminopurin (modifiziert nach Abdul-Masih und Bessman⁽⁴⁴⁾ und Freese⁽³³⁾). (A) HAP kann aufgrund seiner verschiedenen tautomeren Formen in der Hydroxyamino-Form mit Thymin und in der Hydroxyimino-Form mit Cytosin paaren. (B) Schematisch dargestellt ist, wie der Einbau von HAP in die DNA aufgrund der Fähigkeit zur ambivalenten Basenpaarung im Laufe von Replikationszyklen zu AT→GC sowie zu GC→AT Transitionen führen kann. A=Adenin, T=Thymin, G=Guanin, C=Cytosin.

Eine fehlerfreie Replikation genetischen Materials ist allerdings Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des Genoms und verhindert die Entstehung von Neoplasien. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Organismus über akkurate Entgiftungs-

und Reparatur-Mechanismen verfügt, die durch das schrittweise Ineinandergreifen ihrerseits die Replikationsgenauigkeit erhöhen. Für die *N*-hydroxylierten Basenanaloga des Adenins sind an mehreren Stellen des Nukleinsäuremetabolismus Mechanismen beschrieben, die der Inkorporation der mutagenen Base HAP in die DNA vorbeugen können. Je nach Enzymausstattung können sich diese von Spezies zu Spezies unterscheiden. In *E. coli* wurde mit Ycbx ein Molybdoenzyme gefunden, das HAP zur natürlichen Base Adenin reduzieren und somit entgiften kann.⁽⁴⁷⁾ Sollte HAP über den Salvage Pathway in den Nukleotid-Pool gelangen, kann HAPTP oder auch dHAPTP durch die Inosintriophosphatpyrophosphatase (ITPase) allerdings wieder zum Monophosphat gespalten werden. Sollte dHAPTP dennoch in die DNA inkorporiert werden, erkennt und schneidet die Endonuklease V an dieser Stelle und initiiert die Reparatur der Läsion durch DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen.⁽⁴⁵⁾ Wie in *E. coli*, ist in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* die Beteiligung eines Molybdoenzym an der Entgiftung von HAP nachgewiesen. Es wird postuliert, dass das dem humanen mARC ähnliche crARC für die Detoxifizierung mittels Reduktion zur natürlichen Base Adenin verantwortlich ist.⁽⁴⁸⁾ Auch der Detoxifizierungsweg von HAP in *Saccharomyces cerevisiae* ist gut untersucht. Die Reparaturmechanismen unterscheiden sich insofern, dass diese Spezies nicht dazu befähigt ist Molybdoenzyme auszubilden. Allerdings wurde in *Saccharomyces cerevisiae* eine Adeninaminohydrolase gefunden, die dazu in der Lage ist, HAP zu Hypoxanthin umzusetzen und so analog zum Molybdoenzym Ycbx in *E. coli* eine wichtige Rolle in der Entgiftung des Basenanalogs übernimmt. Ebenso wie in *E. coli* spielt auch in *Saccharomyces cerevisiae* die ITPase eine wichtige Rolle bei der Dekontamination des Nukleotid-Pools.⁽⁴²⁾

Das Entgiftungssystem *N*-hydroxylierter Basenanaloga des Adenins in Säugetier-Organismen und im speziellen im humanen Organismus ist bisher nur wenig untersucht. Beschrieben ist allerdings auch die Beteiligung der ITPase, die die Spaltung von HAPTP zum Monophosphat in humanen Zellen katalysiert und so den Einbau in die DNA verhindern kann. Des Weiteren wird angenommen, dass ebenfalls Endonukleasen HAP in der DNA erkennen und durch Schneiden entfernen können, da nachgewiesen wurde, dass HAP in humanen Zellen DNA-Strangbrüche induzieren kann.^(49, 50)

1.3 Molybdoenzyme

1.3.1 Vorkommen und Funktion

Molybdän ist als Spurenelement für nahezu alle Organismen essentiell, da es wesentlicher Bestandteil des aktiven Zentrums vieler wichtiger Enzyme ist. Molybdän wird von Organismen in Form von Molybdat über spezielle Transporter aufgenommen und kann dann eingebunden in einem Molybdäncofaktor (Moco) in die entsprechenden Enzyme eingebaut werden. Durch die vielseitigen Redox-Eigenschaften des Molybdäns können Molybdoenzyme diverse Redoxreaktionen katalysieren und sind daher im Kohlenstoff-, Stickstoff-, und Schwefelmetabolismus unerlässlich.⁽⁵¹⁾ Höhere Organismen tolerieren einen Moco-Verlust nicht.⁽⁵²⁾

Es sind über 50 Molybdoenzyme beschrieben, wobei die weit überwiegende Mehrzahl prokaryotischen Ursprungs ist.⁽⁵²⁾ Lediglich sieben Molybdoenzyme wurden bisher in Eukaryoten identifiziert, wovon nur vier in Säugetieren beschrieben sind. Mit Ausnahme der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, die keine Molybdoenzyme besitzen, konnten in allen eukaryotischen Organismen die Molybdoenzyme Sulfitoxidase, Xanthinoxidoreduktase, Aldehydoxidase und das erst kürzlich identifizierte mARC gefunden werden. Weiterer wichtiger Vertreter ist die Nitratreduktase, die ausschließlich in autotrophen Organismen zu finden ist. Auch die Pyridoxaloxidase und die Nikotinathydroxylase gehören zu den eukaryotischen Molybdoenzymen, sind allerdings lediglich in *Drosophila melanogaster* und *Aspergillus nidulans* vorhanden. Für gewöhnlich katalysieren Molybdoenzyme Zwei-Elektronentransferreaktionen, bei denen Sauerstoff aus Wasser oder in Wasser übertragen wird. Der Oxidationsstatus des Molybdäns variiert dabei zwischen +IV und +VI.⁽⁵²⁾

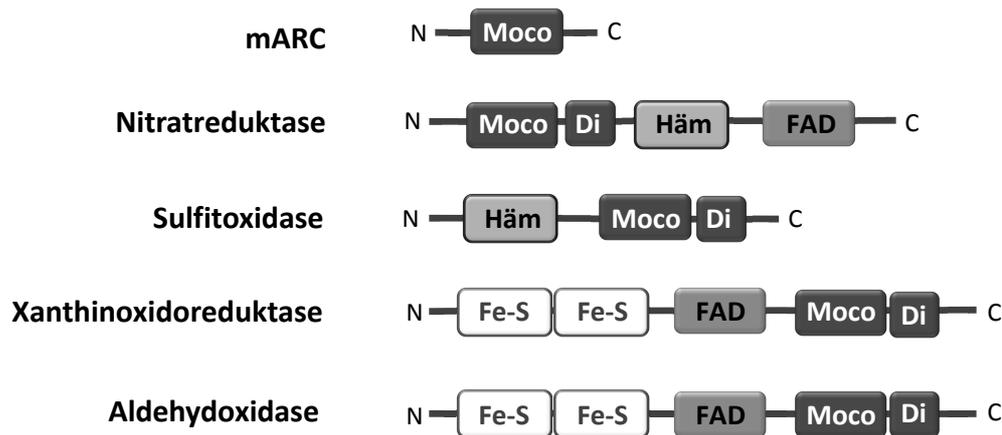


Abb. 1.5 Domänen-Struktur eukaryotischer Molybdoenzyme (modifiziert nach Mendel und Kruse⁽⁵²⁾). Di=Dimerisierungsdomäne

Die Sulfitoxidase (SO) katalysiert den letzten Schritt des Abbaus schwefelhaltiger Aminosäuren und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Sulfit-Detoxifizierung, indem sie Sulfit zu Sulfat oxidiert.⁽⁵³⁾ Die tierische und die pflanzliche SO unterscheiden sich in ihrem Aufbau. Die tierische SO besteht aus einer Häm-bindenden und einer Moco-bindenden Domäne und stellt ein Homodimer dar⁽⁵³⁾. Die pflanzliche SO besitzt lediglich eine Moco-bindende Domäne.

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) spielt eine Schlüsselrolle beim Purin-Abbau, indem sie die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zur Harnsäure katalysiert.⁽⁵⁴⁾ Das Enzym ist ein Homodimer, das aus einer Domäne, die zwei Fe-S-Cluster enthält, einer FAD-bindenden Domäne sowie einer Moco-haltigen Domäne besteht.⁽⁵¹⁾

Die Aldehydoxidase katalysiert Oxidationen von Aldehyden sowie aromatischen und nicht-aromatischen Heterozyklen und zeigt ein sehr breites Substratspektrum. Die physiologische Funktion der menschlichen Aldehydoxidase ist allerdings noch nicht bekannt.⁽⁵¹⁾ Da die Aldehydoxidase durch eine primordiale Genduplikation von der XOR abstammt⁽⁵⁵⁾, zeigen die beiden Enzyme eine hohe Sequenzähnlichkeit, binden die selben Cofaktoren und bilden beide Homodimere.

Mit nur einer Moco-bindenden Domäne ist mARC das kleinste bisher gefundene Molybdoenzym. Bisher ist unklar, ob es als Monomer oder Dimer vorliegt. Heterolog in *E. coli* exprimiertes humanes Protein liegt als Monomer vor⁽⁵⁶⁾, während bei einer Expression im eukaryotischen System eine dimerische Form isoliert werden kann (persönliche Mitteilung F. Bittner, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig). Als Bestandteil

des mitochondrialen *N*-reduktiven Systems ist mARC an der Reduktion *N*-hydroxylierter Fremdstoffe beteiligt.⁽²²⁾

1.3.2 Molybdäncofaktor

In allen bisher bekannten Molybdoenzymen, mit Ausnahme der bakteriellen Nitrogenase, wird das Molybdän im aktiven Zentrum in einem tricyclischen Pterin, dem Molybdopterin (MPT), über eine Dithiolengruppe komplexiert und bildet so den biologisch aktiven Molybdäncofaktor (Moco). Die Pterin Struktur des Mocos ist in der Natur einzigartig und mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen verschiedenster Molybdoenzyme konnte eine in allen Organismen konservierte Struktur des Mocos nachgewiesen werden.^(53, 57)

1.3.2.1 Biosynthese

Die einheitliche Struktur des Mocos in verschiedenen Organismen ist auf seine hochkonservierte Biosynthese zurückzuführen. Sie kann in vier Schritte untergliedert werden (Abb. 1.6). Die an der humanen Moco-Biosynthese beteiligten Proteine wurden nach der MOCS-Nomenklatur (molybdenum cofactor synthesis) benannt.⁽⁵⁸⁾ Die Moco-Biosynthese beginnt mit der Umwandlung von GTP zu cyclischem Pyranopterin-Monophosphat (cPMP). Dieser Schritt wird von den Enzymen MOCS1A und MOCS1B katalysiert und erfolgt in der Mitochondrien-Matrix.⁽⁵⁸⁾ Da alle weiteren Schritte der Synthese im Cytosol stattfinden, erfolgt der Export von cPMP voraussichtlich über den ATP-binding cassette (ABC)-Transporter ABCB7 aus den Mitochondrien ins Cytosol.^(52, 59) Im zweiten Schritt wird cPMP durch Einfügen der Dithiolen-Funktion in MPT überführt. Die Übertragung der beiden Schwefelatome wird von der MPT-Synthase katalysiert, die sich aus den Untereinheiten MOCS2A und MOCS2B zusammensetzt. Nach Abgabe des Schwefels wird die MPT-Synthase von MOCS3 resulfuriert und so regeneriert.^(58, 60) Strukturanalysen konnten Kupfer als intermediären Liganden der Dithiolen-Gruppe des MPT identifizieren. Angenommen wird daher, dass dieses das Dithiol vor Oxidation schützt und eine geeignete Abgangsgruppe für einen Metall-Austausch darstellt.⁽⁶¹⁾ Die Insertion des Molybdäns in das MPT erfolgt in zwei anschließenden Schritten, die im Menschen beide vom Enzym Gephyrin katalysiert werden. Zunächst wird MPT an die G-Domäne des Gephyrins gebunden und ATP und Mg²⁺-abhängig zu MPT-AMP adenyliert. Anschließend erfolgt die Übertragung von MPT-AMP auf die

E-Domäne wo final in Anwesenheit von Molybdat die Hydrolyse des MPT-AMP, gekoppelt mit dem Austausch des Kupfers gegen Molybdän, erfolgt und so der biologisch aktive Moco erhalten wird.^(60,62) Der in Eukaryoten synthetisierte Moco trägt am Molybdän neben den Schwefelliganden der Dithiolengruppe zwei Oxoliganden sowie eine Hydroxylgruppe.⁽⁶²⁾

Nach der Synthese muss die Inkorporation in das entsprechende Apo-Enzym erfolgen. Der Ablauf des Einbaus ist bislang noch nicht geklärt. Da der Moco extrem instabil und oxidationsempfindlich ist ⁽⁶³⁾, wird angenommen, dass entweder eine direkte Übertragung des aktiven Mocos auf das Zielprotein stattfindet oder Carrier-Proteine durch Bindung des Mocos diesen vor Oxidation schützen und so bis zur Verwendung speichern können. Ein solches Moco-Carrier-Protein konnte in *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden werden.⁽⁶⁴⁾

Defekte in der Moco-Biosynthese führen zur Moco-Defizienz und zum kompletten Aktivitätsverlust aller Molybdoenzyme.⁽⁶⁵⁾ Moco-Defizienz beim Menschen ist eine seltene rezessiv vererbte Krankheit, die zum frühen Kindes-Tod führt. Betroffene zeigen schwere neurologische Anomalien, die hauptsächlich durch den Verlust der Sulfitoxidase-Aktivität, die normalerweise eine Anreicherung von toxischem Sulfit in den Organen verhindert, verursacht werden sollen. Moco-Defiziente Patienten können je nach dem in welchem Schritt der Moco-Biosynthese der Defekt vorliegt in Typ A (Mutation im *MOCS1*-Gen, keine Bildung von cPMP), Typ B (Mutation im *MOCS2/3*-Gen, Akkumulation von cPMP) und Typ C (Defekt im Gephyrin-Gen) klassifiziert werden. Zwei Drittel der Moco-defizienten Patienten weisen eine Typ A Defizienz auf. Typ A Patienten können durch die regelmäßige intravenöse Gabe von aus *E. coli* gereinigtem cPMP, das einzige einigermaßen stabile Intermediat der Moco-Biosynthese, erfolgreich behandelt werden.⁽⁶⁶⁾

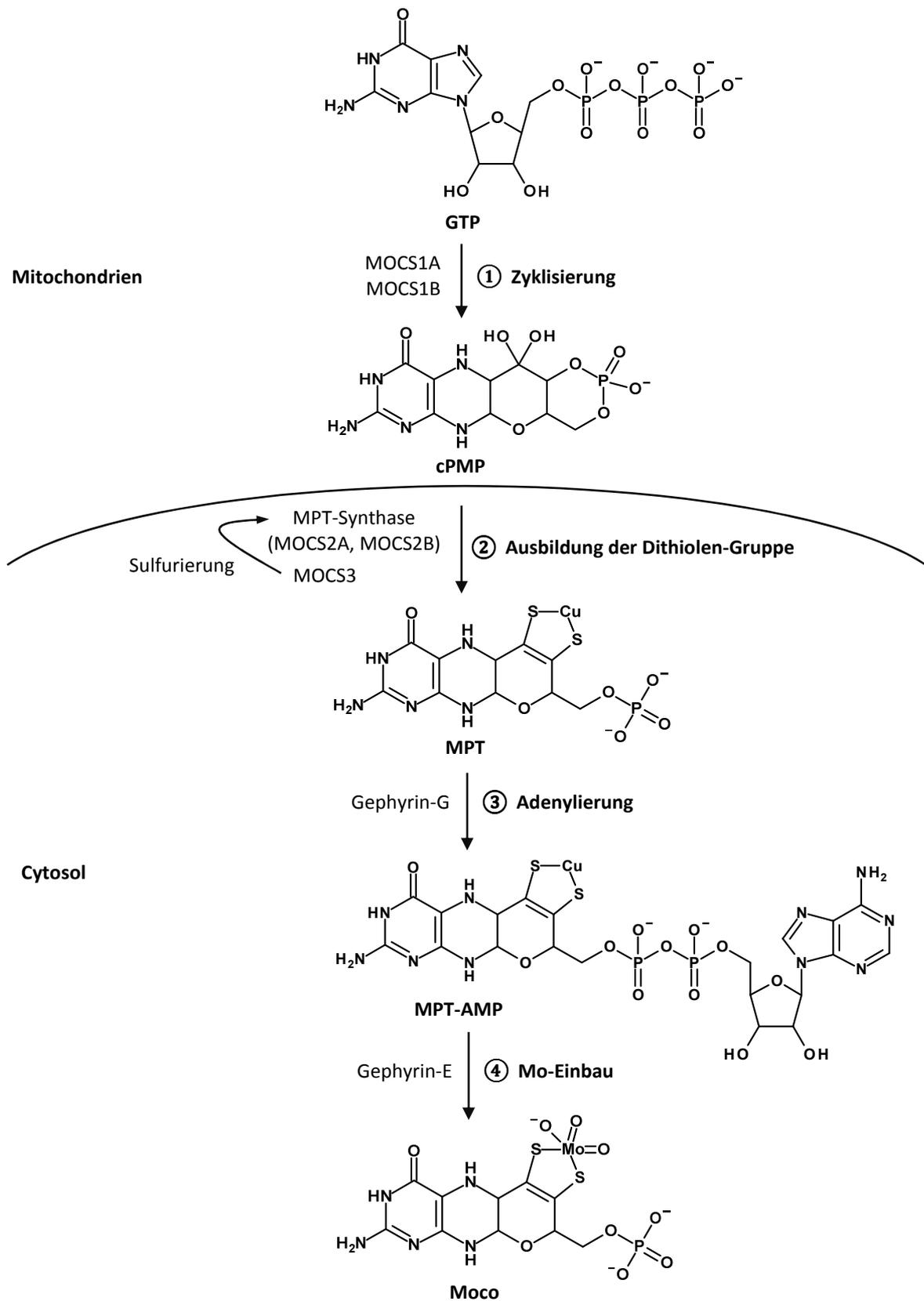
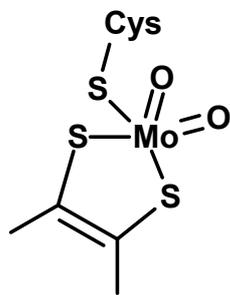


Abb. 1.6: Biosynthese des eukaryotischen Molybdäncofaktors (modifiziert nach Mendel und Bittner⁽⁶⁰⁾). Im ersten Schritt wird GTP in cPMP umgewandelt. Im Menschen wird dieser Schritt von MOCS1A und MOCS1B katalysiert und erfolgt in der Mitochondrien-Matrix. Im Cytosol wird cPMP als nächstes von der humanen MPT-Synthase durch Einfügen der Schwefelatome in MPT überführt. MOCS3 regeneriert die MPT-Synthase. Die abschließende Inkorporation des Molybdäns durch das humane Gephyrin erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird MPT an der G-Domäne adenyliert und anschließend an der E-Domäne unter Abspaltung des AMP das Molybdän gegen Kupfer ausgetauscht.

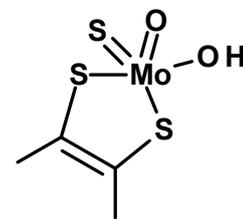
1.3.2.2 Einteilung der Molybdoenzyme nach der Struktur des Mocos

Eukaryotische Molybdoenzyme können anhand ihrer Molybdänliganden im Moco in zwei Familien unterteilt werden.⁽⁵²⁾ Die Enzyme der Sulfitoxidase (SO)-Familie sind bereits nach dem Einbau des Mocos aktiv. Sie zeichnen sich durch eine Bindung des Molybdäns zu einem für gewöhnlich hoch konservierten Cystein-Rest des Proteins aus. Des Weiteren wird das Molybdän in diesen Enzymen neben den zwei Schwefelatomen der Dithiolengruppe über die zwei Oxoliganden komplexiert. Zu der SO-Familie zählen in Eukaryoten die Sulfitoxidase, die Nitratreduktase und mARC.⁽⁵²⁾ Das Molybdän der Enzyme der Xanthinoxidase (XO)-Familie weist keine Bindung zum Protein auf. Außerdem ist für die Aktivität des Enzyms eine finale Modifizierung des Mocos unerlässlich. Hierbei wird ein Oxoligand durch einen Schwefelliganden ersetzt. Diese Reaktion wird im Menschen von der Moco-Sulfurase HMCS katalysiert. Zu der XO-Familie zählen in Eukaryoten die Xanthinoxidoreduktase und die Aldehydoxidase.⁽⁵²⁾ Ausschließlich in Prokaryoten sind zusätzlich noch Molybdoenzyme zu finden, die einer dritte Familie, der Dimethylsulfoxid-Reduktase (DMSOR)-Familie, zuzuordnen sind.



Sulfitoxidase-Familie

- Nitratreduktase
- Sulfitoxidase
- mARC



Xanthinoxidase-Familie

- Xanthinoxidoreduktase
- Aldehydoxidase

Abb. 1.7: Einteilung eukaryotischer Molybdoenzyme nach der Koordinierung des Molybdäns im Moco.

1.4 Das mARC-haltige mitochondriale *N*-reduktive Enzym-system

Das *N*-reduktive Enzymssystem ist für die sauerstoffunabhängige Reduktion diverser *N*-hydroxylierter Substanzen wie Amidoxime, *N*-hydroxylierte Guanidine, Hydroxylamine, Sulhydroxamsäure, Oxime, *N*-Oxide und *N*-hydroxylierte Amidinohydrazone verantwortlich.⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ Das *N*-reduktive System ist somit das Gegenstück zu CYP450- und FMO-katalysierten Oxidationen an Stickstofffunktionen und kann die Rückreduktion aller *N*-oxygenierter Strukturen katalysieren. Es ist ebenfalls allgemein akzeptiert, dass das *N*-reduktive System eine zentrale Rolle bei der Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs spielt. Über die physiologischen Substrate und demzufolge über die physiologische Funktion des *N*-reduktiven Systems ist allerdings bisher wenig bekannt. Es wird angenommen, dass das *N*-reduktive System im Rahmen des Metabolismus bedeutend an der Detoxifizierung toxischer und mutagener aromatischer Hydroxylaminen wie beispielsweise *N*-hydroxylierten DNA-Basenanaloga beteiligt ist.⁽⁷⁰⁾ Des Weiteren wird die Stickstoffmonoxid (NO)-Vorstufe *N*^ω-Hydroxy-L-Arginin (NOHA) als putatives physiologisches Substrat beschrieben.⁽⁷¹⁾ Bei der NO-Biosynthese erfolgt zunächst die NO-Synthase katalysierte Oxidation zu NOHA und anschließend zu NO.⁽⁷²⁾ NO übernimmt wichtige Funktionen im kardiovaskulären System, im Immunsystem und im ZNS als Neurotransmitter.⁽⁷³⁾ Das *N*-reduktive System könnte dementsprechend über die Rückreduktion von NOHA zu L-Arginin regulatorische Funktionen in der L-Arginin-abhängigen NO-Biosynthese übernehmen.

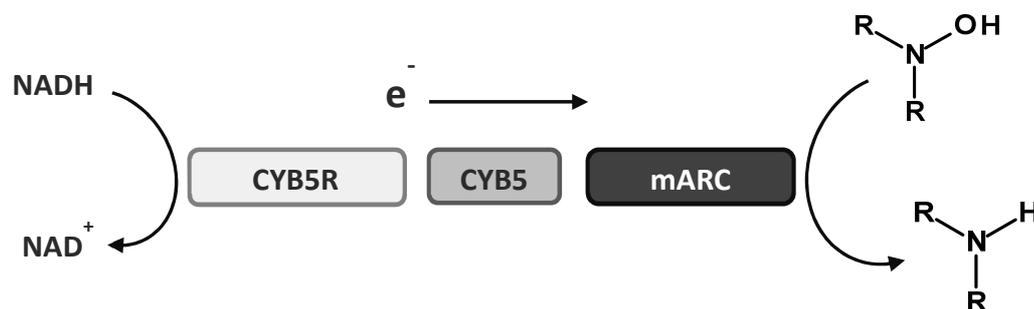


Abb. 1.8: Aufbau und Elektronenfluss des *N*-reduktiven Enzymsystems.

Aktivitätsstudien und Lokalisationsuntersuchungen zeigen, dass das *N*-reduktive Enzymssystem in der äußeren mitochondrialen Membran (OMM) lokalisiert ist und aus dem Molybdoenzym mARC und den Elektronentransportproteinen CYB5 und der CYB5R besteht (Abb. 1.8).^(17, 22, 74, 75) Alle drei Komponenten sind für die *N*-reduktive Katalyse

unentbehrlich. Das Enzymsystem ähnelt mit seinen Komponenten der Domänenstruktur der in Pflanzen vorkommenden Nitratreduktase. Während allerdings die Nitratreduktase sowie alle weiteren eukaryotischen Molybdoenzyme die Komponenten der Elektronentransportkette in verschiedenen Domänen des Proteins beinhalten, stellt das *N*-reduktive Enzymsystem das einzige System mit separaten Elektronentransportproteinen dar. Es wird angenommen, dass der Elektronenfluss des mARC-haltigen Enzymsystems identisch dem der Nitratreduktase ist, und die Elektronen von NADH über das FAD der CYB5R auf das Häm des CYB5 gelangen und anschließend auf den Moco von mARC transferiert werden, wo final das *N*-hydroxylierte Substrat reduziert wird.⁽⁷⁶⁾

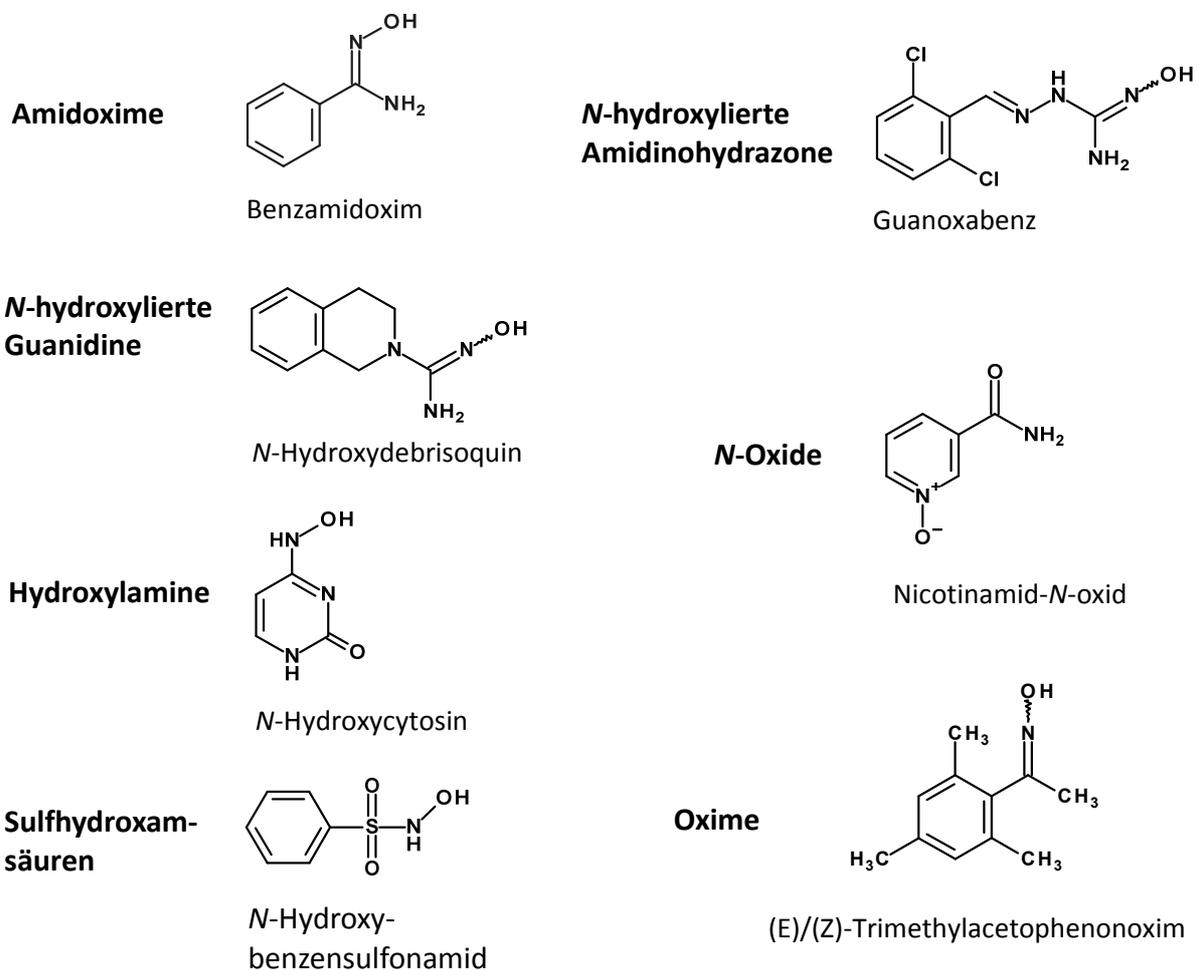


Abb. 1.9: Beispiele für Substrate des mARC-haltigen *N*-reduktiven Enzymsystems

1.4.1 Das Molybdoenzym mARC

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente mARC ist eines der vier in Säugetieren vorkommenden Molybdoenzyme. Erst 2006 konnte mARC aus der äußeren Membran von Schweinelebermitochondrien im Zuge der Untersuchung des *N*-reduktiven Systems als dritte Komponente isoliert und als ein bis dahin unbekanntes Molybdän-haltiges Protein identifiziert werden.⁽²²⁾ Mit einer molekularen Masse von etwa 35 kDa und nur einer Moco-bindenden Domäne stellt mARC das kleinste bisher gefundene Molybdoenzym dar. Jedes bisher daraufhin untersuchte Säugetier-Genom codiert für zwei mARC-Proteine (mARC1 und mARC2). Im humanen Genom sind diese in einem Tandem-Arrangement auf dem Chromosom 1 lokalisiert und zeigen eine Sequenzidentität/-ähnlichkeit von 66 % bzw. 80 %.⁽⁵⁶⁾ Die Klassifizierung der Begriffe mARC1 und mARC2 in unterschiedlichen Spezies erfolgt auf Basis von Sequenzalignments zum humanen Protein. Datenbankbasierte Sequenzanalysen sagen für beide humanen Proteine ein Amino-terminales mitochondriales Targeting-Signal, eine β -Barrel-Domäne und eine Carboxy-terminale MOSC-Domäne (Moco Sulfurase C-terminale Domäne) voraus.⁽⁷⁷⁾ Die MOSC-Domäne in mARC zeichnet sich durch eine hohe Sequenzähnlichkeit zum C-Terminus der Moco-Sulfurase und ein für diese Domäne charakteristisches hochkonserviertes Cystein aus. Die Proteine mit einer MOSC-Domäne können der MOSC-Superfamilie zugeordnet werden. In Eukaryoten gehört neben mARC1 und mARC2 allerdings lediglich noch die Moco-Sulfurase zur MOSC-Familie.⁽⁷⁷⁾ Der Moco des mARC-Proteins lässt sich anhand seiner Struktur der SO-Familie zuordnen. Eine Cyanid-Behandlung konnte keinen terminalen Schwefel nachweisen und daher ist eine Zugehörigkeit zur XO-Familie ausgeschlossen.⁽⁵⁶⁾ Damit übereinstimmend lässt sich die Aktivität durch Coinkubation von Apo-mARC mit Moco-Carrier-Protein, welches mit Schwefel-freiem Moco beladen ist, rekonstituieren.⁽⁷⁸⁾ Für die Einordnung in die SO-Familie spricht außerdem, dass die Substitution des MOSC-typischen konservierten Cysteins durch Serin zum Aktivitätsverlust der humanen mARC-Proteine führt.⁽⁷⁸⁾ Des Weiteren zeigen die Untersuchungen des Mocos mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, dass die humanen mARC-Proteine Signale ergeben, die charakteristisch für Enzyme der SO-Familie sind, und die durch den Austausch des konservierten Cysteins gestört werden.^(56, 78)

Immunofluoreszenz-Untersuchungen und Proteom-Analysen bestätigen die durch Reinigungsstudien gefundene Lokalisierung von mARC aus Säugetieren in den Mito-

chondrien^(22, 56, 74, 79). Untersuchungen zeigen, dass mARC über eine *N*-terminale Transmembran-Domäne in der OMM verankert ist, während die *C*-terminale katalytische Domäne ins Cytosol ragt ($N_{(in)}-C_{(out)}$ -Orientierung).⁽⁷⁴⁾ Des Weiteren ist für mARC2 in Ratten eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Peroxisomen beschrieben.^(80, 81)

mARC ist zusammen mit den Elektronentransportproteinen CYB5 und CYB5R Teil des mitochondrialen *N*-reduktiven Enzymsystems und ist daher an der Reduktion diverser *N*-hydroxylierte Substanzen beteiligt. Substratspezifische Unterschiede im rekonstituierten rekombinanten System zwischen mARC1 und mARC2 sind dabei kaum zu beobachten. Alleinige Ausnahme stellen bisher die *N*-Oxide Nicotinamid-*N*-oxid und Amitriptylin-*N*-oxid dar, die ausschließlich von mARC1 reduziert werden.⁽⁶⁹⁾

Die physiologische Funktion der beiden mARC-Proteine ist bisher weitestgehend unbekannt. Erste Hinweise geben Gen-Expressionsanalysen: So konnte eine signifikante Herunterregulation von mARC2 in humanem Darmkrebsgewebe beobachtet werden.⁽⁸²⁾ Des Weiteren ist eine Hochregulation von mARC2 in diabetischen Tiermodellstudien und unter Glucose-Behandlung in renalen Zellen beschrieben.⁽⁸³⁾ Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen mARC und dem Lipid-Stoffwechsel postuliert.^(75, 84) Seit kurzem gibt es erste Informationen über einen homozygoten *mARC2*-Knockout in Mäusen (Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics www.informatics.jax.org/allele/MGI:4435988). Die MGI Datenbank berichtet, dass die Mäuse lebensfähig sind. Der Phänotyp männlicher Mäuse zeichnet sich durch ein vermindertes Gesamtkörperfett und die weiblichen Mäuse durch eine erhöhte Leukozytenzahl und einem erhöhten Blutglukosespiegel aus.

Für ein detaillierteres Verständnis müssen allerdings weitere ausführliche Untersuchungen zu endogenen Substraten des *N*-reduktiven Systems sowie zu den physiologischen Funktionen der mARC-Proteine erfolgen. Dabei sind Funktionen außerhalb des *N*-reduktiven Enzymsystems nicht auszuschließen. Hierauf deutet die peroxisomale Lokalisation hin, da in diesem Kompartiment die für eine *N*-reduktive Katalyse notwendigen Elektronentransportproteine CYB5 und CYB5R nicht zur Verfügung stehen.

1.4.2 Cytochrom b₅

CYB5 ist ein etwa 16 kDa schweres Häm-Protein, das als Elektronentransportprotein ein Elektron von der CYB5R akzeptiert und auf einen weiteren Akzeptor transferiert. Das Häm-Molekül ist nicht-kovalent über zwei Histidine an das CYB5-Protein gebunden.^(85,86) CYB5 kommt als integrales Membranprotein und als lösliche Form vor. Die Isoformen von CYB5 werden von zwei unterschiedlichen Genen codiert.^(87,88) Das humane *CYB5A* ist auf Chromosom 18 lokalisiert. Es codiert für die membrangebundene mikrosomale Isoform, die in der Membran des ER zu finden ist. Außerdem codiert es für die lösliche Isoform, die wahrscheinlich durch gewebespezifisches alternatives Splicing generiert wird und im Cytosol von Erythrozyten lokalisiert ist.⁽⁸⁹⁾ Das humane *CYB5B* ist auf Chromosom 16 lokalisiert und codiert für die membrangebundene mitochondriale Isoform, die sich ausschließlich in der OMM befindet.^(90,91)

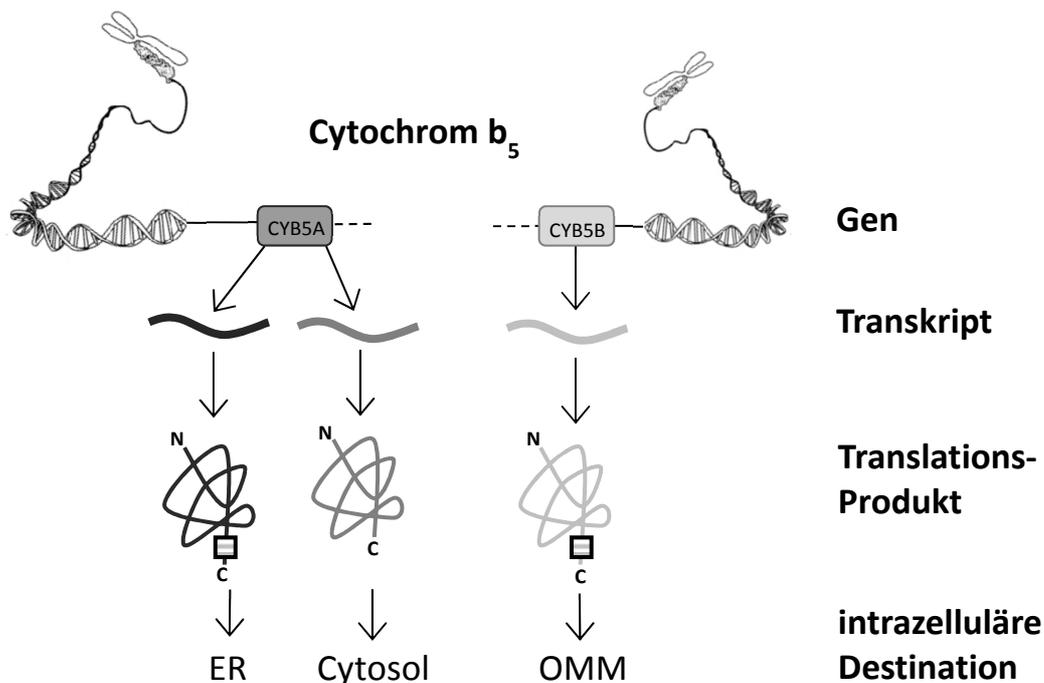


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Biogenese und des intrazellulären Targetings der Cytochrom b₅ Isoformen (modifiziert nach Borgese *et al.* ⁽⁸⁸⁾). Durch alternatives Splicing entstehen aus dem *CYB5A*-Gen zwei Transkripte und zwei CYB5-Proteine. Eines trägt einen Membrananker und ist im ER lokalisiert, das zweite ist löslich und cytosolisch in Erythrozyten zu finden. Das *CYB5B*-Gen codiert für das membranständige mitochondriale Protein, das dort in der äußeren Membran (OMM) zu finden ist.

Die membranären CYB5-Proteine sind amphiphile Proteine, die aus einer hydrophilen N-terminalen Domäne und einer lipophilen C-terminalen Domäne bestehen. Die N-terminale Domäne ist cytosolisch exponiert, trägt das Häm-Molekül und ist somit die katalytisch aktive Domäne, welche mit dem Redoxpartner interagiert.^(85,86) Die C-terminale Domäne enthält den Membrananker. Das mikrosomale CYB5A wird nicht

wie viele andere ER-gebundene Enzyme co-translational sondern post-translational in die ER-Membran eingefügt.^(88, 92) CYB5A ist zusammen mit CYB5R an der Cholesterol-Biosynthese und der Fettsäure-Desaturierung und -Elongation beteiligt.⁽⁹³⁾ Neben der CYB5R kann auch die CYP450-Reduktase als Elektronendonator für CYB5 dienen. Für einige CYP450 katalysierte Reaktionen konnte eine modulative oder sogar obligatorische Funktion für CYB5 nachgewiesen werden.⁽⁹⁴⁾ Die lösliche Form besitzt keinen Membrananker und ähnelt somit stark der *N*-terminalen Domäne des mikrosomalen CYB5A. Lösliches CYB5A katalysiert zusammen mit CYB5R in den Erythrozyten die Methämoglobin-Reduktion.⁽⁹⁵⁾

Das mitochondriale CYB5B trägt *C*-terminal neben der transmembranären Domäne auch das Targeting-Signal für den spezifischen Einbau in die OMM.^(88, 96) Über die Funktionen des mitochondrialen CYB5B ist bisher wenig bekannt. Es ist beschrieben, dass CYB5B zusammen mit CYB5R an der Cytochrom *c*-Reduktion beteiligt ist⁽⁹⁷⁾ und die Androgensynthese stimulieren kann⁽⁹⁸⁾. Außerdem ist CYB5B über die Reduktion von Ascorbat-Radikalen an der Regeneration von Ascorbat beteiligt.⁽⁹⁹⁾

1.4.3 NADH-Cytochrom *b*₅ Reduktase

Die CYB5R ist ein etwa 34 kDa schweres Flavin-Protein, das ein FAD-Molekül als prosthetische Gruppe enthält.⁽¹⁰⁰⁾ Als Elektronentransportprotein vermittelt sie den Transfer vom Zwei-Elektronen-Donator NADH auf den Ein-Elektronen-Akzeptor CYB5.⁽¹⁰¹⁾

Es existieren vier Gene, die für Cytochrom *b*₅ Reduktasen codieren (*CYB5R1-4*). CYB5R1 und CYB5R2 sind Membranproteine, deren subzellulären Lokalisationen und spezifischen Funktionen bislang wenig beschrieben sind. CYB5R1 wurde bisher in Mitochondrien gefunden.⁽¹⁰²⁾ CYB5R4 ist ein lösliches 58 kDa großes Protein mit einer Häm-bindenden und einer FAD-bindenden Domäne, welches im Lumen des ER lokalisiert ist.⁽¹⁰³⁾ Es gibt Hinweise, dass CYB5R4 β -Zellen vor oxidativem Stress schützt.⁽¹⁰³⁾

CYB5R3 ist mit Abstand am besten charakterisiert und Expressionsanalysen zeigen, dass es mengenmäßig den anderen Reduktasen in humanen Geweben stark überlegen ist.⁽¹⁰⁴⁾ (Expressionsdaten s. Anhang Abb. XVII, Abb. XVIII und Abb. XIX). Das humane *CYB5R3*-Gen ist auf Chromosom 22 lokalisiert und codiert für zwei Isoformen. Isoform 1 ist membrangebunden und kommt in der OMM und im ER vor. Dementsprechend sind im Gegensatz zum CYB5 die mikrosomale und die mitochondriale vorkommende Form

molekular identisch. Isoform 2 ist löslich und ist in den Erythrozyten lokalisiert. Als Splicevariante unterscheidet sie sich von der Isoform 1 lediglich dadurch, dass die Membranankerdomäne fehlt.⁽⁸⁸⁾ Die membrangebundene CYB5R3 ist ein amphiphiles Protein mit einer hydrophoben *N*-terminalen und einer hydrophilen *C*-terminalen Domäne. Die *C*-terminale Domäne ist cytosolisch exponiert und kann in eine NADH-bindende Domäne und eine FAD-bindende Domäne unterteilt werden. Sie stellt die katalytisch aktive Domäne dar. Die *N*-terminale Domäne enthält den co-translational myristylierten Membrananker.⁽¹⁰⁵⁾ Der Einbau in die ER-Membran und die OMM erfolgt post-translational.^(88, 106) Die Targeting-Mechanismen sind weitestgehend unbekannt. Dennoch muss der Import in die Membranen aus unterschiedlichen Sortiermechanismen resultieren. Dabei ist die Myristylsäure zwar am Einbau in die OMM beteiligt, am Einbau in das ER aber nicht.⁽¹⁰⁷⁾ Daher wird vermutet, dass die Myristylsäure entweder direkt mit einem Rezeptor der OMM interagiert oder indirekt, indem sie die Konformation der *N*-terminalen Domäne der Reduktase beeinflusst und so das Membran-Targeting ermöglicht. Der Einbau der Reduktase in die mikrosomale Membran könnte möglicherweise unspezifisch über die hydrophobe Domäne erfolgen.⁽¹⁰⁷⁾ Physiologische Funktionen bestehen vor allem in der Desaturierung und Elongation von Fettsäuren und in der Cholesterolsynthese.⁽⁹³⁾ Die lösliche Isoform ist zusammen mit CYB5 in den Erythrozyten an der Methämoglobin-Reduktion beteiligt.⁽⁹⁵⁾

1.5 Zielsetzung der Arbeit

mARC bildet zusammen mit den Elektronentransportproteinen CYB5 und CYB5R das *N*-reduktive Enzymsystem, das für die Reduktion vieler *N*-hydroxylierter Substanzen verantwortlich ist und daher im *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus als Gegenpart zu CYP450 katalysierten Oxygenierungen eine wichtige Rolle spielt. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *in vitro* beide rekombinanten humanen mARC-Proteine dazu in der Lage sind, *N*-hydroxylierte Substrate zu reduzieren, wenn sie mit ihren Elektronentransportproteinen CYB5 und CYB5R rekonstituiert werden.^(56, 68) Die *in vivo* Funktionen der beiden mARC-Proteine und ob auch im lebenden Organismus mARC1 und mARC2 am *N*-reduktiven Stoffwechsel beteiligt sind, ist jedoch bisher noch weniger untersucht. Die Elektronentransportproteine CYB5 und CYB5R konnten schon früh durch Enzymreinigungstudien und Rekonstitutionsassays als Komponenten des *N*-reduktiven Systems identifiziert werden.^(12, 21, 22, 56, 108) Neben dem mitochondrialen *N*-reduktiven Drei-Komponenten-System wird allerdings von anderen ein mikrosomales Zwei-Komponenten-System aus CYB5 und CYB5R ohne die dritte Komponente mARC postuliert.⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾ Die mikrosomale und die mitochondriale CYB5-Isoformen werden von zwei verschiedenen Genen codiert. *CYB5A* codiert für die membrangebundene mikrosomale und lösliche Isoform und *CYB5B* für die mitochondriale Isoform. Widersprüchliche Annahmen existieren daher in der Literatur, welche CYB5-Isoformen *in vivo* an der *N*-Reduktion beteiligt sein könnten. Um Aufschlüsse über die Beteiligung der einzelnen Komponenten am *N*-reduktiven Metabolismus im humanen Zellstoffwechsel zu erlangen, war es Ziel dieser Arbeit einen siRNA-vermittelten Knockdown der entsprechenden Proteine in humanen Zelllinien zu etablieren. Der Einfluss der Herunterregulierung auf den *N*-reduktiven Stoffwechsel der Zellen sollte anhand der Umsetzung des Modells substrats Benzamidoxim zu Benzamidin überprüft werden. Mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi)-Untersuchungen galt es dabei Erkenntnisse zu gewinnen, ob im Zellmetabolismus beide oder nur eine mARC-Form beteiligt und welche der CYB5-Isoformen im *N*-reduktiven Zellstoffwechsel involviert sind. Über Knockdown Studien sollte ferner die für das *N*-reduktive System essentielle Reduktase identifiziert werden.

Es wird angenommen, dass der Elektronenfluss des mARC-haltigen Enzymsystems vom NADH über das FAD der CYB5R auf das Häm des CYB5 erfolgt und anschließend die Elektronen auf den Moco von mARC transferiert werden, wo dann das *N*-hydroxylierte

Substrat reduziert wird. Da mittels Steady-State-Kinetik zwischen CYB5 und mARC bisher kein Elektronenfluss gemessen werden konnte ⁽¹¹²⁾, konnte diese Annahme bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht verifiziert werden. Es sind einige CYP450-katalysierte Reaktionen bekannt, die von Apo-CYB5, also Häm-unabhängig, stimuliert werden.⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾ Es wird angenommen, dass CYB5 in diesen Reaktionen nicht als Elektronentransportprotein fungiert, sondern die Katalyse über allosterische Effekte stimuliert. Um den Mechanismus zu untersuchen, über den CYB5 im mARC-haltigen *N*-reduktiven System beteiligt ist, sollte Apo-CYB5 generiert werden, und untersucht werden, inwieweit die *N*-reduktive Katalyse auf das CYB5-Häm angewiesen ist.

Die endogenen Substrate des *N*-reduktiven Systems und die physiologische Funktion von mARC sind bisher weitestgehend unbekannt. Der in der Arbeit etablierte mARC-Knockdown sollte anschließend als Tool genutzt werden, um eine mögliche Funktion des *N*-reduktiven Systems als Detoxifizierungssystem in humanen Zellen zu prüfen. *In vitro* ist das rekonstituierte rekombinante Enzymsystem dazu in der Lage *N*-hydroxylierte Nukleobasen sowie *N*-hydroxylierte Nukleoside zu den korrespondierenden natürlichen Nukleobasen und Nukleosiden zu reduzieren.⁽⁷⁰⁾ Da sich die *N*-hydroxylierten Nukleobasen als toxisch und mutagen erwiesen haben ^(116, 117), ist die Frage nach der physiologischen Relevanz der *in vitro* beobachteten mARC-vermittelten *N*-Reduktion als Entgiftungsweg in humanen Zellen von besonderem Interesse. Zu diesem Zweck sollte in dieser Arbeit die Beteiligung von mARC an der reduktiven Umsetzung der *N*-hydroxylierten Nukleobase HAP und dem *N*-hydroxylierten Nukleosid HAPR im Zellstoffwechsel mittels Knockdown verifiziert werden und anschließend mittels geeigneter Apoptose-Assays der Einfluss des mARC-Knockdowns auf die Sensibilität humaner Zellen gegenüber HAP untersucht werden.

2 Materialien und Geräte

2.1 Zelllinien

	Zelltyp	Firma
HEK-293	humane embryonische Nierenzellen	Cell Lines Service GmbH (Eppelheim)
ZR-75-1	humane Mammakarzinomzellen	Cell Lines Service GmbH (Eppelheim)
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Kalthoff (Sektion für Molekulare Onkologie, UKSH Kiel)

2.2 Medien und Mediensupplemente

	Firma
Accutase	GE Healthcare Life Sciences (Chalfont St Giles, UK)
DMEM	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
FBS	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
L-Glutamin	GE Healthcare Life Sciences (Chalfont St Giles, UK)
HBSS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
HEPES Buffer solution 1 M	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Lipofectamine® RNAiMAX	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
MEM	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Natriumbicarbonat	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Natriumpyruvat	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Opti-MEM	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
PBS, Dulbeccos w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
RPMI Medium 1640	Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Trypsin/EDTA (0,05%)	GE Healthcare Life Sciences (Chalfont St Giles, UK)

2.3 siRNA-Oligonukleotide

Targetgen	siRNA	Sequenz	Firma
mARC1	HSS127702, stealth HSS127703, stealth HSS127704, stealth	GGCUUGUGAUCAACCAGGAGGGAAA GCGACCGAGACGUCCUCAUCAAUA GAGGAUUCUUGGGAUGAGCUUCUUA	Invitrogen, (Carlsbad, USA)
mARC2	On-Target plus smart pool human MOSC2	CCUAAUUGGUAGUGUAGAA GAUCUAUUUUAUCAGUGGAA GCAACGAUACAUCAGCAAA GGAUUGACUGAGAUCUAAA	Thermo Scientific (Waltham, USA)
CYB5B	HSS149532, stealth HSS149533, stealth HSS149534, stealth	GAGGAGGUGGCAAAGCGCAACUCCU CCUCAACGAGCACCCUGGAGGAGAA GGUUCUGCUGGAACAAGCUGGUGUA	Invitrogen (Carlsbad, USA)
CYB5A	HSS141743, stealth HSS141744, stealth HSS175741, stealth	CCAUCCAGAUGACAGACCAAAGUUA GGAAACUCUUAUCACUACUAUUGAU CAAGGUGUACGAUUUGACCAAUUU	Invitrogen (Carlsbad, USA)
CYB5R3	HSS141829, stealth HSS141830, stealth HSS176177, stealth	GCACAUUCUACCUCUCGGCUCGAAUU GGAAACCUGGUCGUCGCGCCCUAUA GCGCCAUCAUGAAGGACCCUGAUGA	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Neg. Control	low GC, stealth	nonsense, 36% GC	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Neg. Control	med GC, stealth	nonsense, 48% GC	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Neg. Control	high GC, stealth	nonsense, 68% GC	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.4 Proteine

Protein	GeneID	Firma
CYB5A (human, rekombinant)	1528	Mobitec (Göttingen)
Adenosindesaminase (human, rekombinant aus <i>E. coli</i>)	100	Sigma (St. Louis, USA)

2.5 Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma
anti-mARC1 (AP9754c)	Kaninchen, polyklonal	Abgent (San Diego, CA, USA)
anti-mARC2 (HPA015085)	Kaninchen, polyklonal	Sigma (St. Louis, MO, USA)
anti-CYB5B (HPA007893)	Kaninchen, polyklonal	Sigma (St. Louis, MO, USA)
anti-CYB5A (H-114)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-CYB5R3 (HPA001566)	Kaninchen, polyklonal	Sigma (St. Louis, MO, USA)
anti-PARP (9542)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-GAPDH (G9545)	Kaninchen, polyklonal	Sigma (St. Louis, MO, USA)
anti-Calnexin (AP03028SU-N)	Kaninchen, polyklonal	Acris Antibodies GmbH (Herford)
anti-Kaninchen IgG (HRP-gekoppelt)	Ziege, polyklonal	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)

2.6 Materialien und Reagenzien

Nicht gelistete Reagenzien wurden von Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Reagenz	Firma
BCA-Protein-Assay Kit	Pierce (Rockford, USA)
2-Butanon	Merck KGaA (Darmstadt)
Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH (Rotkreuz, Schweiz)
HAP	Apollo Scientific Ltd. (Cheshire, UK)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
NADH, Dinatriumsalz	Merck KGaA (Darmstadt)
Nonidet® P-40	BioChemica AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ocytlylsulfonat	Tokyo Chemical Industry GmbH (Eschborn)

PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I SDS	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) Merck KGaA (Darmstadt)
Material	Firma
Amicon® Ultra-0,5 centrifugal Filter	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Cryovials CRYO.S.™	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Falcon-Tubes	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Filter Tips, steril, Biosphere®	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
96-Well Microplate, clear, schwarz, advanced TC Oberfläche, steril	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
96-Well Microplate, OptiPlate-96, white Opaque	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Microcon Molekularfilter	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
PVDF-Membran	Hybond-P, GE Healthcare Amersham (Chalfont St Giles, UK)
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße, steril, Biosphere®	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Serologische Pipetten, steril	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Wellplates, steril	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Whatman® Paper	GE Healthcare Life Sciences (Chalfont St Giles, UK)
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)

2.7 Geräte

Gerät	Bezeichnung / Firma
Autoklav	LTA32/25 (Zirbus technology, Bad Grund)
Brutschrank	Heraeus GmbH, Hanau
Dispenser	Multipette® plus (Eppendorf AG, Hamburg)
Durchflusszytometer	Gallios 3L Flowcytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
Einfriercontainer	Nalgene™ Cryo Freezing Container Mr. Frosty™ (Thermo Scientific, Waltham, USA)

Elektrophoresekammer	Mini Trans-Blot® Cell (BioRad, Hercules, CA, USA)
Entwicklungskammer	Cawomat 2000 IR (CAWO, Schrobenhausen)
HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump Waters 717plus Autosampler Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector Software Breeze 3.30
ICP-Quadrupol-Massenspektrometer	7500cs (Agilent Technologies, Böblingen)
Fluoreszenzmikroskop	Image Xpress Micro XL, Software Meta Xpress 5.1.0.41 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
Fluoreszenz-Spektrometer	PerkinElmer precisely LS 55, FL Winlab Software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
Megafuge®	Heraeus® Megafuge® 1.0 R (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved Bright Line (LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK)
pH-Meter	Microprocessor pH537 (WTW GmbH, Weilheim)
Pipetten	Eppendorf Research®/Reference® (Eppendorf AG, Hamburg)
Pipettierhelfer	accu jet® (Brand GmbH & Co KG, Wertheim)
Plattenschüttelinkubator	Sky Line DTS-4 (LTF Labortechnik, Wasserburg)
Schüttelwasserbad	GFL 1087 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Sterilwerkbank	Laminar Air® HB2448 (Heraeus GmbH, Hanau)
Tischzentrifuge	Micro 200 Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen)
Umkehrmikroskop	Olympus CK2 (Olympus, Hamburg)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK510H (Bandelin GmbH, Berlin)
Ultrazentrifuge	L7-65 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
UV-Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Scan/50 MPR Cary Win UV-Software 2.0 (Varian GmbH, Darmstadt)
Vortexer	RS-Va10 (Phoenix Instrument, Garbsen)
Waage	MC 1 Research RC 210 P (Sartorius, Göttingen)

3 Experimentelle Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Verwendet wurden die Zelllinien HEK-293, ZR-75-1 und HeLa. HEK-293 ist eine Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 entstand. ZR-75-1 stellt eine humane Brustkrebszelllinie dar. HeLa sind die ersten humanen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie hervorging. Die Zellen sind mit dem humanen Papillomavirus 18 infiziert und entstammen dem Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks, deren Name zur Benennung der Zelllinie diente. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte als adhärenter Einzelzellrasen in Kulturflaschen bei 37 °C in 5 % CO₂. Für die Kultivierung wurden folgende Nährmedien verwendet:

HEK-293	MEM supplementiert mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat und 1,5 g/l Natriumbicarbonat
ZR-75-1	RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat
HeLa	MEM supplementiert mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 1,5 g/l Natriumbicarbonat und 20 mM HEPES

HEK-293 Zellen wurden 2-3 x pro Woche passagiert, so dass der Zellrasen nie länger als 24 h vollständig konfluent war. Hierfür wurde das Kulturmedium zunächst abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die adhärenenten Zellen wurden durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05%) von der Unterlage gelöst, in vorgewärmtem Medium sorgfältig resuspendiert und im gewünschten Splitterhältnis

auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Zum Ausplattieren einer gewünschten Zellzahl für experimentelle Versuche wurde diese mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Aufgrund der längeren Verdopplungszeit (ca. 80 h) von ZR-75-1 erfolge hier das Passagieren 1 x pro Woche wobei zusätzlich alle 2-3 Tage das Nährmedium erneuert wurde. HeLa Zellen haben eine sehr kurze Verdopplungszeit von ca. 24 h, so dass diese 3-4 x pro Woche passagiert werden mussten. Die Zelllinien wurden nicht länger als 20 Passagen oder 2 Monate in Kultur gehalten. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium in einer Konzentration von $3-5 \times 10^6$ Zellen/ml aufgenommen, in einem Einfriercontainer mit einer Rate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ auf -80°C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: Nährmedium
 50 % (HEK-293)/10 % (ZR-75-1)/20 % (HeLa) FBS
 10 % DMSO

3.1.2 Design der Knockdown Experimente

Die siRNA Transfektion erfolgte gemäß dem Forward Transfektions Protokoll von Invitrogen (vgl. Kap. 4.2). HEK-239 oder ZR-75-1 Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und 24 h vor Transfektion in Kulturmedium in 24-Well Plates ausplattiert, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion zu 10-50 % konfluent waren. Für jedes zu transfizierende Well wurden die siRNA-Oligonukleotide in 100 µl Opti-MEM, einem Serum reduzierten Medium, verdünnt. 2 µl Transfektionsreagenz (Lipofectamine® RNAiMAX) wurden mit weiteren 100 µl Opti-MEM vermischt. Die beiden Verdünnungen wurden vereinigt und 20 min inkubiert, so dass sich Liposom-siRNA Komplexe ausbilden konnten. Diese wurden anschließend zu den ausplattierten Zellen hinzugefügt.

Da die siRNA-vermittelte Reduktion der Proteinlevel stark von der Halbwertszeit des jeweiligen Proteins abhängig ist, und daher die Zeit, die für optimale Knockdown Ergebnisse benötigt wird, variiert, wurden die Effekte an verschiedenen Tagen nach der Transfektion untersucht. Um sicherzustellen, dass das beobachtete Silencing auf spezifische Effekte der siRNA auf das entsprechende Targetgen und nicht auf off-target Effekte zurückzuführen ist, wurden mindestens drei verschiedene siRNA Sequenzen für ein Targetgen getestet und die optimale siRNA Konzentration ermittelt. Negativkontrollen beinhalteten eine non-targeting siRNA und Transfektionsreagenzien ohne siRNA. Die Herunterregulierung der Proteinexpression wurde mittels Western Blot Analyse verifiziert.

3.1.3 Bestimmung der *N*-reduktiven Aktivität in humanen Zelllinien

Die *N*-reduktive Aktivität der Zellen wurde anhand der Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Benzamidoxim wurde aus Benzonitril und Hydroxylamin von Melissa Zietz synthetisiert und zur Verfügung gestellt.⁽¹¹⁸⁾

3.1.3.1 Biotransformationsansatz in humanen Zellen

Zur Validierung des Inkubationsassays wurde für jede Zelllinie der lineare Zeitbereich und die Enzymkinetik der Umsetzung ermittelt. Hierfür wurden die Zellen zunächst in 24-Wellplates ausplattiert und die Experimente ausgeführt wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-100 % aufwiesen. Da für die HeLa Zellen zwar eine *N*-reduktive Umsetzung ermittelt werden konnte, diese allerdings sehr gering war und nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik folgte, wurde für die HeLa Zellen auf die Erstellung eines

Inkubationsassays verzichtet. Aus den erhaltenen Informationen wurde anschließend der Inkubationsassay für weiterführende Untersuchungen erstellt.

Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen vorsichtig 2 x mit 500 µl vorgewärmtem substratfreiem Inkubationsmedium (HBSS mit 10 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen und 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden alle Wells simultan mit 250 µl vorgewärmtem substrathaltigem Inkubationsmedium (5 mM Benzamidoxim) versetzt und die Zellen für 120 min (HEK-293) bzw. 180 min (ZR-75-1) bei 37 °C inkubiert. Nach der vorgesehenen Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand vorsichtig abpipettiert und anschließend zentrifugiert, um zelluläre Reste zu eliminieren. Die Analyse des Überstands erfolgte per HPLC. Als Negativkontrolle diente zur Bestimmung der chemischen Zersetzung bzw. Verunreinigung jeweils ein entsprechend mitgeführter Ansatz ohne Zellen.

3.1.3.2 HPLC-Analytik

Zur Trennung und Quantifizierung der zu untersuchenden Analyten Benzamidoxim und Benzamidin aus dem Zellkulturüberstand wurde folgende nach Schwering modifizierte Methode verwendet ⁽¹¹⁹⁾.

Stationäre Phase	Phenomenex GEMINI®, 5 µm, C18, 110Å, 150 x 4,6 mm Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)	
Mobile Phase	50 mM Ammoniumacetat, pH 7,0 / 10 % (v/v) MeOH	
Flussrate	1 ml/min, isokratisch	
Injektionsvolumen	40 µl	
Detektion	UV: 229 nm	
Laufzeit	15 min	
Retentionszeiten	Benzamidin:	5,2 min ± 0,5 min
	Benzamidoxim:	12,0 min ± 0,5 min

Für Benzamidin erfolgte die Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 0,1-200 µM. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2=0,9997$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 0,1 µM.

3.1.4 Gewinnung der zellulären Proteine

Zur Extraktion von zellulärem Gesamtprotein wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig 1 x mit eisgekühltem PBS gewaschen und erneut mit PBS versetzt. Anschließend wurden die Zellen durch suspendieren mit der Pipette oder, wenn nötig, mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 10 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet mit 100-200 µl eisgekühltem NP-40 Lysispuffer versetzt. Die Lyse erfolgte dann durch Schütteln für 60 min bei 4 °C. Nicht-lösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation vom Zelllysate abgetrennt und der Überstand direkt verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

Bei der Herstellung von Gesamtproteinextrakten zur Apoptosedetektion wurde geringfügig anders verfahren. Unter anderem um zu verhindern, dass Zellen während der Behandlung apoptotisch werden und, um die für den Assay ausschlaggebenden Proteine für die Analyse optimal zu extrahieren. Um lose, und damit tote oder evtl. apoptotische, Zellen durch das Entfernen des Mediums zu nicht verlieren, wurde hierauf verzichtet und die Zellen direkt mit einem Zellschaber abgelöst und inklusive des Kulturmediums für 10 min bei 1000 *g* pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit PBS (RT) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde mit 100-200 µl eisgekühltem NP-40 Lysispuffer versetzt, homogenisiert und 20 min auf Eis stehen gelassen. Zusätzlich wurde zur Scherung der DNA 10 s sonifiziert. Durch kurzes Zentrifugieren wurden die nicht-löslichen Bestandteile abgetrennt und der Überstand direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

NP-40 Lysispuffer: 1% (v/v) NP-40
 150 mM NaCl
 50 mM Tris, pH 8,0
 Complete Protease Inhibitor Cocktail
 zusätzlich für Lyse zur Apoptosedetektion:
 1 mM EDTA
 2 mM DTT

3.1.5 Zellviabilitätsmessung mittels Resazurin-Assay

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines Resazurin-Assays gemessen. Hierbei wird das Reduktionspotential einer viablen Zelle ausgenutzt, die Resazurin (blau, nicht-fluoreszierend) zu Resorufin (pink, fluoreszierend) metabolisieren kann.^(120, 121) Die Bildung des fluoreszierenden Produkts Resorufin ist proportional zur Anzahl viabler Zellen. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde eine 0,01 %ige Resazurinlösung in PBS unter aseptischen Bedingungen hergestellt und bei 2-8 °C lichtgeschützt gelagert. 100 µl dieser Lösung wurden direkt zum Kulturmedium der in 24-Wellplates ausplattierten Zellen gegeben (entspricht 10 % des Kulturmediumvolumens und 0,001 % Resazurin). Nach 180 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die fluorimetrische Vermessung des Überstandes ($\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$). Unter diesen Bedingungen lag für HEK-293 Zellen die LLD bei 50.000 Zellen/Well und Linearität war bis > 800.000 Zellen/Well gegeben. Für ZR-75-1 lag die LLD < 5000 Zellen/Well und Linearität war bis 200.000 Zellen/Well gegeben.

3.1.6 Bestimmung der reduktiven Biotransformation von Sulfamethoxazol-Hydroxylamin durch HEK-293

Zur Herstellung des substrathaltigen Inkubationsmediums wurde Sulfamethoxazol-Hydroxylamin (SMX-HA) zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit Inkubationsmedium (HBSS mit 10 mM HEPES, pH 7,4) vermengt. Um die Stabilität von SMX-HA über die Inkubationszeit zu gewährleisten, wurde dem Inkubationsmedium als Oxidationsschutz 1 mM Ascorbinsäure hinzugefügt. Die DMSO Konzentration im Medium betrug 0,5 %. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen vorsichtig 2 x mit 500 µl vorgewärmten substratfreiem Inkubationsmedium gewaschen und 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden alle Wells simultan mit 250 µl vorgewärmtem 3 mM SMX-HA-haltigem Inkubationsmedium versetzt und die Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach 180 min Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand vorsichtig abpipettiert und anschließend zentrifugiert, um zelluläre Reste zu eliminieren. Die Analyse des Überstands erfolgte per HPLC mit der von Ott beschriebenen Methode.⁽¹²²⁾ Als Negativkontrolle diente zur Bestimmung der chemischen Zersetzung bzw. Verunreinigung jeweils ein entsprechend mitgeführter Ansatz ohne Zellen.

3.1.7 Bestimmung der reduktiven Biotransformation des N-hydroxylierten Basenanalogs 6-N-Hydroxylaminopurin durch HEK-293

3.1.7.1 Biotransformationsansatz

Die Stabilität von HAP im Inkubationsmedium (HBSS mit 10 mM HEPES, pH 7,4) wurde vorhergehend per HPLC überprüft und war über den benötigten Zeitraum gegeben. Zur Charakterisierung der HAP-Reduktion durch HEK-293 wurden der lineare Zeitbereich und die Enzymkinetik der Umsetzung ermittelt. Hierfür wurden die Zellen zunächst in 24-Wellplates ausplattiert und die Experimente ausgeführt wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-100 % aufwiesen. Aus den hieraus erhaltenen Informationen konnte anschließend der Inkubationsassay für weiterführende Untersuchungen erstellt werden.

Zur Herstellung des substrathaltigen Inkubationsmediums wurde HAP zunächst in heißem DMSO gelöst und anschließend mit Inkubationsmedium vermengt, wobei die DMSO Konzentration im Medium stets 0,5 % DMSO betrug. Das Kulturmedium wurde

entfernt und die Zellen vorsichtig 2 x mit 500 µl vorgewärmtem substratfreiem Inkubationsmedium gewaschen und 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden alle Wells simultan mit 250 µl vorgewärmtem HAP-haltigem Inkubationsmedium versetzt und die Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach der vorgesehen Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand vorsichtig abpipettiert und anschließend zentrifugiert, um zelluläre Reste zu eliminieren. Die Analyse des Überstands erfolgte per HPLC. Als Negativkontrolle diente zur Bestimmung der chemischen Zersetzung bzw. Verunreinigung jeweils ein entsprechend mitgeführter Ansatz ohne Zellen.

3.1.7.2 HPLC-Analytik

Zur Trennung und Quantifizierung der zu untersuchenden Analyten HAP und Adenin aus dem Zellkulturüberstand wurde folgende nach Krompholz modifizierte Methode verwendet.⁽¹²³⁾

Stationäre Phase	Lichrospher®60 RP-select B, C8, 5 µm, LiChroCart 125 x 4 mm; Vorsäule: RP-select B, 4 x 4 mm	
Mobile Phase	10 mM Octylsulfonat, 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0 / 10 % (v/v) MeCN	
Flussrate	1 ml/min, isokratisch	
Injektionsvolumen	10 µl	
Detektion	UV: 262 nm	
Laufzeit	18 min	
Retentionszeiten	HAP:	11,6 min ± 0,5 min
	Adenin:	15,1 min ± 0,5 min

Für Adenin erfolgte die Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 0,1-100 µM. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2=0,9998$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 0,5 µM.

3.1.8 Untersuchung der Biotransformation des *N*-hydroxylierten Basenanalogs 6-*N*-Hydroxyadenosin durch HEK-293

Die Synthese von HAPR erfolgte nach Too *et al.* aus 6-Chloropurinribosid und Hydroxylamin in EtOH/H₂O (1:1).⁽¹²⁴⁾ Die Identität wurde mittels NMR und MS bestätigt.

3.1.8.1 Biotransformationsansatz

Die Stabilität von HAPR im Inkubationsmedium (HBSS mit 10 mM HEPES, pH 7,4) wurde vorhergehend per HPLC überprüft und war über den benötigten Zeitraum gegeben. Aufgrund der höheren Löslichkeit konnte HAPR im Gegensatz zu HAP direkt im Inkubationsmedium gelöst werden, so dass auf Zusatz von DMSO verzichtet werden konnte. Zur Untersuchung der HAPR-Metabolisierung durch HEK-293 wurden die Zellen zunächst in 24-Wellplates ausplattiert und die Experimente ausgeführt wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-100 % aufwiesen. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen vorsichtig 2 x mit 500 µl vorgewärmten substratfreiem Inkubationsmedium gewaschen und 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden alle Wells simultan mit 250 µl vorgewärmtem HAPR-haltigem Inkubationsmedium versetzt und die Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach der vorgesehen Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand vorsichtig abpipettiert und anschließend zentrifugiert, um zelluläre Reste zu eliminieren. Die Analyse des Überstands erfolgte per HPLC. Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten wurden variiert. Als Negativkontrolle diente zur Bestimmung der chemischen Zersetzung bzw. Verunreinigung jeweils ein entsprechend mitgeführter Ansatz ohne Zellen.

3.1.8.2 Metabolisierung nach Hemmung der Adenosindesaminase in HEK-293

Zur Aufklärung der Metabolisierung von HAPR wurde die Umsetzung in HEK-293 bei gleichzeitiger Hemmung der Adenosindesaminase mit Dipyridamol untersucht. Hierfür wurde zunächst Dipyridamol in verschiedenen Konzentrationen in EtOH/H₂O (2:1) gelöst. Die Inkubation fand wie unter 3.1.8.1 beschrieben statt, wobei die Methode insofern variiert wurde, als dass je Well 10 µl der jeweiligen Dipyridamol-Stammlösungen (bzw. 10 µl des EtOH-Wassergemisches) dem substrathaltigen Inkubationsmedium beigemischt wurde. Als Substrat wurden neben 2 mM HAPR zum Vergleich

und zur Kontrolle auch 2 mM Adenosin und 2 mM Benzamidoxim eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 120 min.

3.1.8.3 HPLC-Analytik

Zur Trennung und Quantifizierung der zu untersuchenden Analyten HAPR, Adenosin und Inosin aus dem Zellkulturüberstand wurde folgende Methode verwendet.

Stationäre Phase	Lichrospher®60 RP-select B, C8, 5 µm, LiChroCart 125 x 4 mm; Vorsäule: RP-select B, 4 x 4 mm	
Mobile Phase	10 mM Octylsulfonat, 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,5 / 5 % (v/v) MeCN	
Flussrate	1 ml/min, isokratisch	
Injektionsvolumen	10 µl	
Detektion	UV: 260 nm	
Laufzeit	20 min	
Retentionszeiten	HAPR:	9,5 min ± 0,5 min
	Adenosin:	17,2 min ± 0,5 min
	Inosin:	4,1 min ± 0,1 min

Für Adenosin erfolgte die Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 0,1-100 µM. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2=0,9999$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 0,5 µM. Für Inosin erfolgte die Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 0,1-1000 µM. Linearität war in dem betrachteten Konzentrationsbereich gegeben ($R^2=0,9995$). Die Quantifizierungsgrenze lag bei 0,5 µM.

3.1.9 HAP-Sensibilisierungs-Assay durch mARC-Knockdown in HeLa

Da HEK-293 und ZR-75-1 unter den getesteten Bedingungen keine Sensibilität gegenüber HAP zeigten, wurden die Untersuchungen zur HAP-Toxizität nach mARC-Knockdown mit HeLa Zellen durchgeführt. Für HeLa Zellen ist eine HAP-induzierte Mutagenese bereits beschrieben.⁽⁵⁰⁾ Die siRNA Transfektion erfolgte gemäß dem Reversen Transfektions Protokoll von Invitrogen (vgl. Kap. 4.2). Die siRNA-Oligonukleotide wurden dementsprechend direkt im Well mit 200 μ l Opti-MEM verdünnt und mit 2 μ l Transfektionsreagenz (Lipofectamine® RNAiMAX) inkubiert. Zu den Liposom-siRNA-Komplexen wurde anschließend die Zellsuspension hinzugefügt, so dass die siRNA Konzentrationen 10 nM bzw. je 5 nM bei dem mARC-Doppelknockdown betragen. Als Negativkontrollen wurden eine non-targeting siRNA und Transfektionsreagenzien ohne siRNA mitgeführt.

Die HAP-Toxizität beruht auf Mutagenese, die eine aktive Zellteilung voraussetzt.⁽⁵⁰⁾ Da die Zellen zum Zeitpunkt der optimalen Knockdown-Effizienz allerdings schon vollständig konfluent waren, wurden die transfizierten Zellen am Tag 3 nach der Transfektion gesplittet. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit Kulturmedium vereinzelt und dann die Zellzahlen der Suspensionen ermittelt. Anschließen wurden je 75.000 Zellen/Well für den 24 h Assay und 40.000 Zellen/Well für den 48 h Assay in 24-Wellplates ausplattiert. Dies führte zu einer Konfluenz < 100 % am Tag der Apoptosedetektion, was für eine niedrige basale Apoptose der Zellen entscheidend war. Bewusst wurde dem Kulturmedium zur HeLa Kultivierung 20 mM HEPES zur CO₂-unabhängigen pH-Kontrolle zugesetzt, da sich HAP bei einem pH > 7,5 extrem schnell zersetzt.⁽¹²⁵⁾ Etwa 4 h nach Aussaat der transfizierten Zellen erfolgte die Zugabe von HAP. Hierfür wurde HAP in heißem DMSO gelöst und Stammlösungen in den entsprechenden Konzentrationen mit DMSO hergestellt. Von der jeweiligen Stammlösung wurden anschließend 10 μ l zu jedem Well gegeben und die Zellen 24 h bzw. 48 h im Brutschrank inkubiert. Die DMSO Konzentration im Well betrug 1 %. Zur Positivkontrolle wurden die Zellen mit 100 μ M Etoposid behandelt. Der Knockdown ließ sich mittels Western Blot Analyse mit den Zelllysaten vom Tag der Ausplattierung verifizieren.

3.1.10 Apoptosedetektion

HAP ist als Mutagen in der Lage in humanen Zellen Apoptose zu induzieren.⁽⁵⁰⁾ Um die Zelltoxizität von HAP zu detektieren, wurden daher in dieser Arbeit mit der Detektion der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und der Annexin V-PE/7-AAD-Färbung zwei voneinander unabhängige Apoptose-Assays etabliert. Zum Nachweis apoptotischer Merkmale wurde zudem eine Hoechst-Färbung durchgeführt.

3.1.10.1 Annexin V-PE/7-AAD-Färbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie

Für die Analyse der mit HAP behandelten Zellen wurde das PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen™ verwendet. Die hier entwickelte Methode ist an das von BD mitgelieferte Staining Protokoll angelehnt, allerdings mussten viele zellart-spezifische Veränderungen vorgenommen werden.

Zunächst wurde das Kulturmedium je Well abgenommen und gesammelt, so dass auch apoptotische oder tote lose Zellen mit analysiert wurden. Dann wurde jedes Well zum Ablösen der Zellen mit 50 µl vorgewärmter Accutase versetzt und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Accutase Reaktion wurde mit dem zunächst abgenommenen Kulturmedium gestoppt, die Zellen vorsichtig vereinzelt, die Zellsuspension mit 600 g für 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der in dem Kit enthaltene Annexin V binding buffer erwies sich als unbrauchbar für HeLa Zellen, da diese die Messzeit darin nicht überlebten. Als optimal erwies sich das HeLa Kulturmedium mit Zusatz von 0,5 mM CaCl₂ als Binding-Medium. Die Zellen wurden je Well in 100 µl Binding-Medium gut resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in Zytometer-Tubes überführt, mit 2 µl Annexin V-PE versetzt und für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 3 µl 7-AAD und weitere 5 min Inkubation. Anschließend wurden 150 µl Binding-Medium zugefügt und die Röhrchen bis zur Vermessung auf Eis gestellt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte innerhalb 1 h. Die Zytometer-Einstellung und das Setzen der Gate-Grenzen erfolgten mit nur mit je einem Farbstoff angefärbten unbehandelten Zellen, mit Etoposid behandelten Zellen sowie auf 60 °C erhitzten Zellen. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm Kaluza 1.2 über Fluoreszenz-Dotplots (Annexin V-PE Fluoreszenz vs. 7-AAD Fluoreszenz).

Zytometer Settings:

Exzitation:	blauer Laser, 488 nm	
Detektion:	FS	Voltage: 100; Gain:2,0
	SS	Voltage: 25; Gain:5,0
	FL2 (575 BP 30; Annexin V-PE)	Voltage: 250; Gain:1,0
	FL4 (695 BP 30; 7-AAD)	Voltage: 346; Gain:1,0
Stop-Kriterium:	10.000 Events	

Spillover [%]:

FL2:	16,63
FL4:	1,0

3.1.10.2 Detektion von Poly(ADP-ribose)-Polymerase-Spaltprodukten

Zur Detektion des 89 kDa PARP-Spaltprodukts wurden die mit HAP behandelten HeLa Zellen wie in 3.1.4 beschrieben lysiert und das full-length Protein sowie das 89 kDa Fragment mit einem spezifischen Antikörper per Western Blot analysiert.

3.1.10.3 Hoechst-Färbung

Für die Hoechst-Färbung wurde eine 0,1 %ige Hoechst 33342 Stammlösung in Aqua bidest hergestellt und lichtgeschützt gelagert. Der Zellassay wurde wie unter Kap. 3.1.9 beschrieben durchgeführt, jedoch mit der Abweichung, dass die Aussaat der Zellen und Kultivierung in Gegenwart von HAP am dritten Tag nach der siRNA Transfektion in schwarzen 96-Well Microplates mit transparenter Bodenplatte erfolgte (15.000 Zellen/Well). Die Zellen wurden über 48 h unter Einfluss von HAP inkubiert. Für die Anfärbung wurden 2 µl der Hoechst-Stammlösung zum Kulturmedium hinzugegeben (entspricht 0,001 % Hoechst) und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x vorsichtig mit warmen Kulturmedium gewaschen und mit 200 µl Zellkulturmedium versetzt. Die Detektion erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden nach der BCA-Methode von Smith *et al.* durchgeführt. Hierfür wurde das BCA-Protein-Assay Kit (Pierce) gemäß Angaben des Herstellers verwendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine, welches dann mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet. Dieser kann durch photometrische Messung bei 562 nm mit Hilfe einer mit Rinderserumalbuminlösung erstellten Kalibriergrade photometrisch quantifiziert werden.⁽¹²⁶⁾

3.2.2 Western Blot Analyse

3.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus Zellysaten oder subzellulären Fraktionen erfolgte durch diskontinuierliche denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli.⁽¹²⁷⁾ Die zu untersuchenden Proteinproben wurden zunächst mit Ladepuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 6 min bei 95 °C inkubiert. Die Trennung erfolgte je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins in 7,5 %igen, 12,5 %igen oder 15 %igen Acrylamid-Gelen. Es wurden jeweils gleiche Mengen an Protein geladen und anschließend elektrophoretisch bei 85 V im Sammelgel fokussiert und bei 185 V im Trenngel aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot zur Immunodetektion auf eine Trägermembran übertragen.

Ladepuffer	0,2 M Tris	Sammelgelpuffer	0,25 M Tris, pH 6,8
(4x):	8 % (m/v) SDS	(4x):	0,4 % (m/v) SDS
	40 % (v/v) Glycerin		
	20 % (v/v) β -Mercaptoethanol		
	0,02 % (m/v) Bromphenolblau		

Trenngelpuffer	0,75 M Tris, pH 8,8	Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris
(4x):	0,4 % (m/v) SDS	(10x):	1,92 M Glycin
			1 % (m/v) SDS

3.2.2.2 Western Blot

Das Transferieren der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolge in einer Elektrophoresekammer im Nassblotverfahren in Transferpuffer durch Anlegen einer Spannung von 90 V für 2 h unter Kühlung. Zur Immunodetektion wurde die Membran anschließend mit Milchpulverlösung (5 % Milchpulver in TBST-Puffer) unspezifisch blockiert und dann mit primär-Antikörper inkubiert. Die primär-Antikörper wurden in Milchpulverlösung verdünnt und in folgenden Konzentrationen eingesetzt: anti-mARC1 1:1000, anti-mARC2 1:500, anti-CYB5B 1:1000, anti-CYB5A 1:500, anti-CYB5R3 1:2000, anti-Calnexin 1:10.000, anti-GAPDH 1:8000 und anti-PARP 1:1000. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit HRP-gekoppeltem goat anti-rabbit IgG (1:10.000) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST-Puffer erfolgte die Detektion der HRP-Aktivität unter Verwendung eines ECL-Substrats (enhanced chemiluminescence) und Aufnahme der Chemilumineszenz auf Fotofilm.

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

ECL-Reagenz: Lösung A: 0,25 g/l Luminol in 100 mM Tris, pH 8,6
Lösung B: 1,1 g/l p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
vor Gebrauch pro Membran:
2 ml Lösung A, 2 µl H₂O₂ 30 %, 200 µl Lösung B

3.2.3 Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus CYB5A-Knockout- und Wildtyp-Mauslebern

Homozygote mikrosomale CYB5-Knockout Mäuse (KO, CYB5A^{-/-}) und Wildtyp Kontrollmäuse (Wildtyp, CYB5A^{+/+}) wurden im Arbeitskreis Wolf (Medical Research Institute, University of Dundee), wie bei McLaughlin *et al.* beschrieben, generiert und uns zur Verfügung gestellt.⁽¹²⁸⁾ Durch differentielle Zentrifugation wurde dann das Mauslebergewebe in Homogenat, Mitochondrien und Mikrosomen fraktioniert. Nach Homogenisation der Lebern wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 6300 *g* pelletiert und anschließend die Mikrosomen bei 14000 *g* vom Cytosol getrennt. Die Verarbeitung der Lebern wurde in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und Complete Protease Inhibitor Cocktail bei 4 °C ausgeführt.

3.2.4 Expression und Reinigung der rekombinanten humanen Proteine

Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine mARC1 (reference sequence NP_073583), mARC2 (reference sequence NP_060368), CYB5B (reference sequence NP_085056) und CYB5R3 Isoform 2 (reference sequence NP_015565, lösliche Isoform) erfolgte im Arbeitskreis Mendel wie bei Wahl *et al.* beschrieben.⁽⁵⁶⁾ Es wurde für alle Proteine der Expressionsvektor pQE80 des Qiaexpress-Systems der Firma Qiagen verwendet. Alle Proteine verfügen über einen *N*-terminalen His₆-Tag. Für die Expression von CYB5B und CYB5R3 wurde der *E. coli* Expressionsstamm DL41 verwendet. Die Expression der mARC-Proteine erfolgte im *E. coli* Expressionsstamm TP 1000, der den Moco in der eukaryotischen Form exprimiert. Bei den cDNA Konstrukten von mARC1 und 2 ist das *N*-terminale mitochondriale Targeting-Signal sowie bei dem Konstrukt des CYB5B die *C*-terminale Membranankerdomäne abgeschnitten. Bisher war nur ohne diese hydrophoben Domänen eine befriedigende Expression und Aufreinigung möglich. Rekombinantes CYB5A wurde von MoBiTec (Göttingen) käuflich erworben.

3.2.5 Bestimmung der Cofaktor-Konzentrationen der rekombinanten humanen Proteine

Um die humanen rekombinanten Proteine des *N*-reduktiven Systems in einem rekonstituierten System in molaren Anteilen ins Verhältnis setzen zu können, wurden die Konzentrationen der prosthetischen Gruppen in den jeweiligen Enzymquellen bestimmt.

3.2.5.1 Bestimmung des FAD-Gehalts der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase

Der FAD-Gehalt der humanen rekombinanten CYB5R wurde durch Messung der Absorption bei 450 nm bestimmt.⁽¹²⁹⁾ Zunächst wurde das Protein mit Phosphatpuffer 50 mM, pH 7,0 auf ca. 1 mg/ml Protein verdünnt, 10 min bei 100 °C im Dunkeln erhitzt, erkalten gelassen und bei 13000 rpm zentrifugiert. Der gelbfarbene Überstand wurde bei 450 nm vermessen und die Konzentration anhand des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ errechnet. Die Wiederfindung der FAD-Standards (0,4-5,0 mg/l) in der Proteinprobe lag bei 98-102%.

3.2.5.2 Bestimmung des Cytochrom b₅-Häm-Gehalts

Die Bestimmung des CYB5-Häm-Gehalts erfolgte nach dem Verfahren von Estabrook und Werringloer durch Aufnahme eines Differenzspektrums von oxidiertem und NADH-reduzierter Form des CYB5. Die resultierende Absorptionsdifferenz zwischen dem Absorptionsmaximum (426 nm) und -minimum (409 nm) wurde ermittelt und daraus, unter Berücksichtigung des Absorptionskoeffizienten $\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ der reduzierten Form, der CYB5-Häm-Gehalt berechnet.⁽¹³⁰⁾

3.2.5.3 Bestimmung des Moco-Gehalts von mARC

Im Falle von mARC konnte der Moco nicht direkt bestimmt werden, weil dieser extrem oxidationsempfindlich ist. Daher erfolgte die Quantifizierung indirekt über die Bestimmung des durch entsprechende Probenvorbehandlung aus dem Moco freigesetzten Molybdäns. Da der eukaryotische Moco ein mol Molybdän pro mol Cofaktor bindet, konnte auf diese Weise auf den Moco-Gehalt der untersuchten mARC-Enzymquellen geschlossen werden.

Die Molybdän-Gehaltsbestimmung der mARC-Enzymproben erfolgte mittels ICP-MS in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Ulrike Westernströer und Dr. Dieter Garbe-Schönberg am

Institut für Geowissenschaften der CAU Kiel. Um eventuelle Molybdänverunreinigungen im Medium der Enzymproben zu entfernen erfolgte ein Pufferaustausch mittels einer NAP-25 Säule und 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 20 % (m/v) Glycerol, 0,1 mM DTT, 1 mM Na₂EDTA, pH 7,4. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 150 µl der Enzymfraktion 10 min bei 100 °C erhitzt, um das Protein zu denaturieren und das Molybdän freizusetzen. Diese 150 µl wurden mit 2 %iger (v/v) oberflächendestillierter Salpetersäure auf 2000 µl verdünnt und mit internem Standard (Indium, In) versetzt. Zur Abtrennung des gefällten Proteins wurde die salpetersaure Proteinsuspension dann über einen Microcon Molekularfilter (cut-off 30 kDa) zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend zur Vermessung manuell dem ICP-Quadrupol-Massenspektrometer mittels Mikrozerstäuber mit einer Probenaufnahme von 100 µl/min zugeführt. Für die Analyse auf Molybdän wurden die Signale (in counts per second) auf den Massen 92, 94, 95, 96 und 98 m/z ausgewertet. Für die Quantifizierung wurde das Signal auf 98 m/z verwendet, das frei von Interferenzen war. Die Richtigkeit wurde mit internat. Standardreferenzmaterialien (1643e, BIR-1, BHVO-2) überprüft. Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens lag bei 0,5 ng/ml Mo, bezogen auf die zentrifugierte Proteinlösung.

3.2.6 Herstellung von Apo-Cytochrom b₅

Die Herstellung von Apo-CYB5B erfolgte auf der Grundlage von Teales Methylethylketon-Methode durch Spaltung des Häm-Protein-Links mittels saurer 2-Butanon Behandlung.⁽¹³¹⁾ Humanes rekombinantes CYB5B wurde mit eiskaltem destilliertem Wasser auf ca. 10 mg/ml Protein verdünnt. Unter ständiger Eiskühlung wurde die Proteinlösung durch tropfenweise Zugabe von 0,1 M HCl auf pH 2,5 eingestellt. Anschließend wurde 2-Butanon in gleichem Volumenverhältnis hinzugegeben und die Mischung 30 s geschüttelt und ca. 1 min bei 0 °C stengelassen bis sich die obere nun rotgefärbte Häm-haltige Butanonphase und die farblose Apo-Enzym-haltige wässrige Phase vollständig getrennt hatten. Die Ketonphase wurde vorsichtig entfernt. Der Puffer der übriggebliebenen wässrigen Phase wurde mittels Ultrafiltration (Amicon® Ultra-0,5 centrifugal Filter Devices) mit Lagerpuffer (10 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂EDTA, 0,1 mM DTT, 10 % (m/v) Glycerol) ausgetauscht. Der Verlust des Häms wurde mittels CYB5-Häm-Bestimmung bestätigt.

3.2.7 Häm-Inkorporation in Apo-Cytochrom b₅

Die Herstellung der Häm-Lösung und dessen Inkorporation in Apo-CYB5 erfolgten in Anlehnung an Mulrooneys und Waskells Beschreibung.⁽¹³²⁾ Die Häm-Lösung wurde angefertigt, indem Häminchlorid bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zu einer 50 %igen EtOH/Wasser Mischung gegeben wurde. Unter Zugabe von etwas 1 M NaOH konnte das Hämin gelöst werden. Die Lösung wurde für 5 min stengelassen, damit sich restliche Partikel setzen konnten. Ein 50 µl Aliquot wurde abgenommen und mit 950 µl 20 mM Tris, pH 8,0 mit 1 mM EDTA verdünnt. Die Absorption des nun entstandenen Tris-Hämin Komplexes wurde bei 385 nm vermessen und erneut NaOH-Lösung zugegeben bis die Absorption bei 385 nm nicht mehr anstieg. Für die anschließende Häm-Inkorporation wurde das Apo-CYB5 zunächst mit 20 mM Tris, pH 8,0 mit 1 mM EDTA und 0,4 % (m/v) Natriumcholat auf eine Konzentration von ca. 2 mg/ml Protein verdünnt. Aliquote der Häm-Lösung wurden dann zum Apo-CYB5 hinzugefügt und die Rekonstitution mittels Aufnahme von Absorptionsspektren zwischen 350 nm und 500 nm überwacht. Die Rekonstitution wurde als vollständig angesehen, wenn der Soret Peak von CYB5 bei 413 nm in ein Plateau überging, verursacht durch einen Überschuss an freiem Tris-komplexiertem Hämin. Erhalten wurde schließlich eine rotgefärbte

Proteinlösung, was die erfolgreiche Häm-Bindung indizierte. Die finale Häm-Konzentration des rekonstituierten CYB5B wurde wie in 3.2.5.2 beschrieben bestimmt.

3.3 Enzymassays

3.3.1 *In vitro* N-Reduktions-Assay im rekombinanten System

Die N-reduktive Aktivität der *in vitro* rekonstituierten rekombinanten Enzyme mARC, CYB5 und CYB5R3 wurde anhand der Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Die Inkubationen wurden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Inkubationsansätze enthielten 3 mM Substrat in einem Volumen von 150 µl 20 mM MES-Puffer, pH 6,0. Die rekombinanten Enzyme wurden nach ihren Cofaktoren eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben enthielten die Ansätze 15 pmol FAD der CYB5R, 150 pmol Häm des CYB5 und 150 pmol Moco von mARC. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Nach 15 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zusatz von 150 µl eiskaltem MeOH gestoppt, 5 min geschüttelt und dann 5 min zur Abtrennung des Proteins zentrifugiert. Der Überstand wurde anhand der von Clement *et al.* beschriebenen Methode per HPLC analysiert.⁽¹⁵⁾

3.3.2 *In vitro* N-Reduktions-Assay mit subzellulären Fraktionen

Die N-reduktive Aktivität der subzellulären Fraktionen wurde anhand der Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim zu Benzamidin bestimmt. Die Inkubationen erfolgten analog der unter 3.3.1 beschriebenen Methode. Als Inkubationspuffer wurde allerdings 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, gewählt und als Enzymquellen wurden subzelluläre Fraktionen der CYB5A-KO- und Wildtyp-Mauslebern eingesetzt. Die Inkubationsansätze enthielten je 0,05 mg Gesamtprotein der Fraktionen.

3.3.3 Untersuchung der Biotransformation des Basenanalogs 6-*N*-Hydroxyadenosin durch rekombinante humane Adenosin-desaminase

Zur Charakterisierung der Umsetzung von HAPR durch rekombinante Adenosin-desaminase erfolgten Inkubationen bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad. Die Inkubationsansätze enthielten 0,05 mg Adenosindesaminase in einem Volumen von 150 µl 20 mM MES-Puffer, pH 6,0. Substratkonzentrationen wurden variiert. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet. Nach 15 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zusatz von 150 µl eiskaltem MeOH gestoppt, 5 min geschüttelt und dann 5 min zur Abtrennung des Proteins zentrifugiert. Der Überstand wurde per HPLC analysiert. Zur Kontrolle und Vergleich wurde analog die Umsetzung des bekannten Substrats Adenosin durch die Adenosindesaminase gemessen.

3.4 Datenanalyse

Alle experimentellen Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Statistische Analysen wurden unter Verwendung der SigmaPlot 11 Software (Systat Software Inc.) ausgeführt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz von Unterschieden wurde der ungepaarte Student t-Test oder im Falle eines Mehrfachvergleichs der Bonferroni Test herangezogen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des *N*-reduktiven Metabolismus verschiedener humaner Zelllinien

Zur Charakterisierung des *N*-reduktiven Metabolismus der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien HEK-293, ZR-75-1 und HeLa und zur Validierung eines entsprechenden Biotransformationsassays wurden die zeitabhängigen und substratabhängigen Umsetzungen des Modells substrats Benzamidoxim zu Benzamidin mit der in Kap. 3.1.3.1 beschriebenen Methode ermittelt.

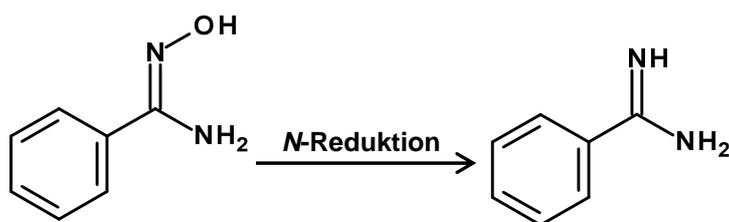


Abb. 4.1: Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim zu Benzamidin durch humane Zellen.

Die Analyten Benzamidoxim und Benzamidin wurden aus dem Zellkulturüberstand mit der in Kap. 3.1.3.2 beschriebenen HPLC-Methode quantifiziert. Ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 4.2 gezeigt.

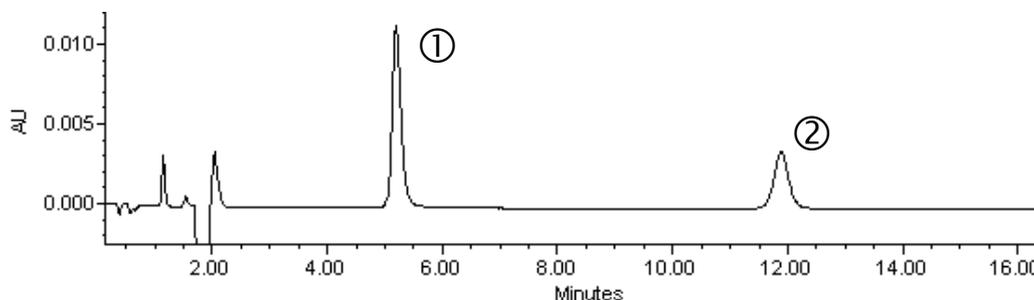


Abb. 4.2: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm: Dargestellt ist die Trennung eines Stoffgemisches aus 5 μ M Benzamidin (①) und 5 μ M Benzamidoxim (②).

Bei allen Zelllinien ist über den betrachteten Zeitraum ein linearer Anstieg der Benzamidinkonzentration zu beobachten (Abb. 4.3 A). Die reduktive Umsetzung durch HEK-293 und ZR-75-1 folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik. Das System ist in beiden Zelllinien ab einer Substratkonzentration von ca. 2 mM gesättigt (Abb. 4.3 B). Die Benzamidoximreduktion durch HeLa Zellen folgt nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik. In HeLa konnte bis zu einer Substratkonzentration von 30 mM keine Sättigung des Systems beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). HEK-293 Zellen zeigen im gesättigten System von allen getesteten Zelllinien mit Abstand die höchste Umsetzungsrate. Daher eignet sich die Zelllinie gut für quantitative Untersuchungen des *N*-reduktiven Metabolismus und wurde hierfür bevorzugt verwendet.

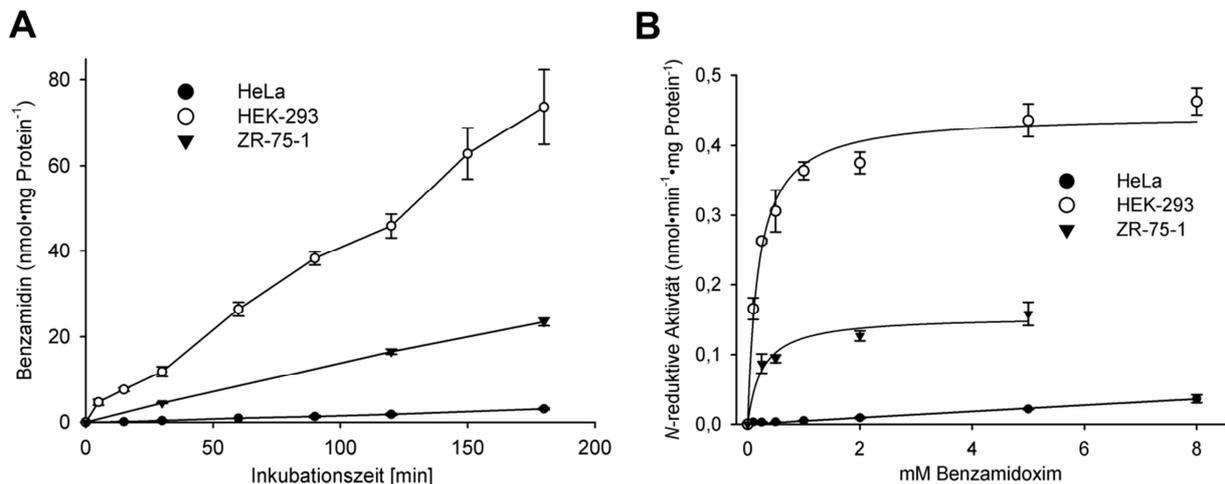


Abb. 4.3: Charakterisierung des *N*-reduktiven Metabolismus verschiedener humaner Zelllinien. Die Inkubationen erfolgten wie unter 3.1.3.1 beschrieben. Inkubationszeiten und Benzamidoximkonzentrationen wurden variiert ($n=3$). **(A)** Zeitabhängigkeit (5 mM Benzamidoxim) **(B)** Substratabhängigkeit (Inkubationszeit für HEK-293 60 min, für ZR-75-1 und HeLa 180 min)

4.2 siRNA-vermittelter Knockdown

Der Knockdown eines Gens kann mittels RNAi erreicht werden. RNAi ist die Wechselwirkung kurzer doppelsträngiger RNA (dsRNA) mit der mRNA unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe. In Folge dessen wird die mRNA gespalten und so die Translation zum Protein verhindert. Die RNAi ist ein natürlich vorkommender Mechanismus, bei dem zunächst der Dicer lange dsRNA in kurze dsRNA-Fragmente mit 19-25 Basenpaaren schneidet. Es entsteht *micro* RNA (miRNA), die durch genomische DNA codiert ist, oder *small interfering* RNA (siRNA), die aus langer dsRNA meist exogenen Ursprungs entsteht. Anschließend wird die miRNA oder siRNA auf einen Enzymkomplex, dem RISC (*RNA induced silencing complex*), übertragen und dort in Leit- und Passagierstrang gespalten. Die zum Leitstrang komplementäre Ziel-mRNA wird daraufhin vom RISC durch Endonukleaseaktivitäten gespalten und abgebaut, so dass die Translation zum Protein unterdrückt wird. RNAi spielt so eine große Rolle bei der Regulation der Genexpression oder beispielsweise bei der Virusabwehr. Experimentell ist man mit Hilfe der RNAi in der Lage jedes beliebige Gen in Zellen zu supprimieren. Hierzu wird direkt synthetisch hergestellte siRNA in Zellen eingebracht oder vektorbasiert Gene transfiziert, die für siRNA codieren. Dadurch dass relativ schnell Knockdown Phänotypen erzeugt und untersucht werden können, bieten siRNAs daher die Möglichkeit für schnelle funktionelle Genomanalysen.

In dieser Arbeit wurden synthetische siRNA-Oligonukleotide erworben, die durch chemische Modifikationen eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen in der Zelle und im Serum aufweisen und wodurch außerdem unspezifische Effekte durch stressbedingte Interferon-Induktion minimiert werden. Zusätzliche Modifikationen sollen die Interaktion des Passagierstrangs mit dem RISC verhindern und die Spezifität des Leitstrangs erhöhen. Die siRNA-Sequenzen werden mittels Alignments ausgewählt, so dass Homologien zu anderen Genen ausgeschlossen werden können. All diese Maßnahmen reduzieren das Risiko für das Auftreten von off-target Effekten. Schematisch ist der Knockdown mittels synthetischer siRNA in Abb. 4.4 dargestellt.

Aufgrund der negativen Ladung der Oligonukleotide sind Transfektionsreagenzien oder physikalische Verfahren nötig, um die siRNAs in die Zelle bringen zu können. In dieser Arbeit wurden hierfür kationische Lipide zugesetzt, welche sich zu Liposomen zusammenlagern und so die Aufnahme vermitteln.

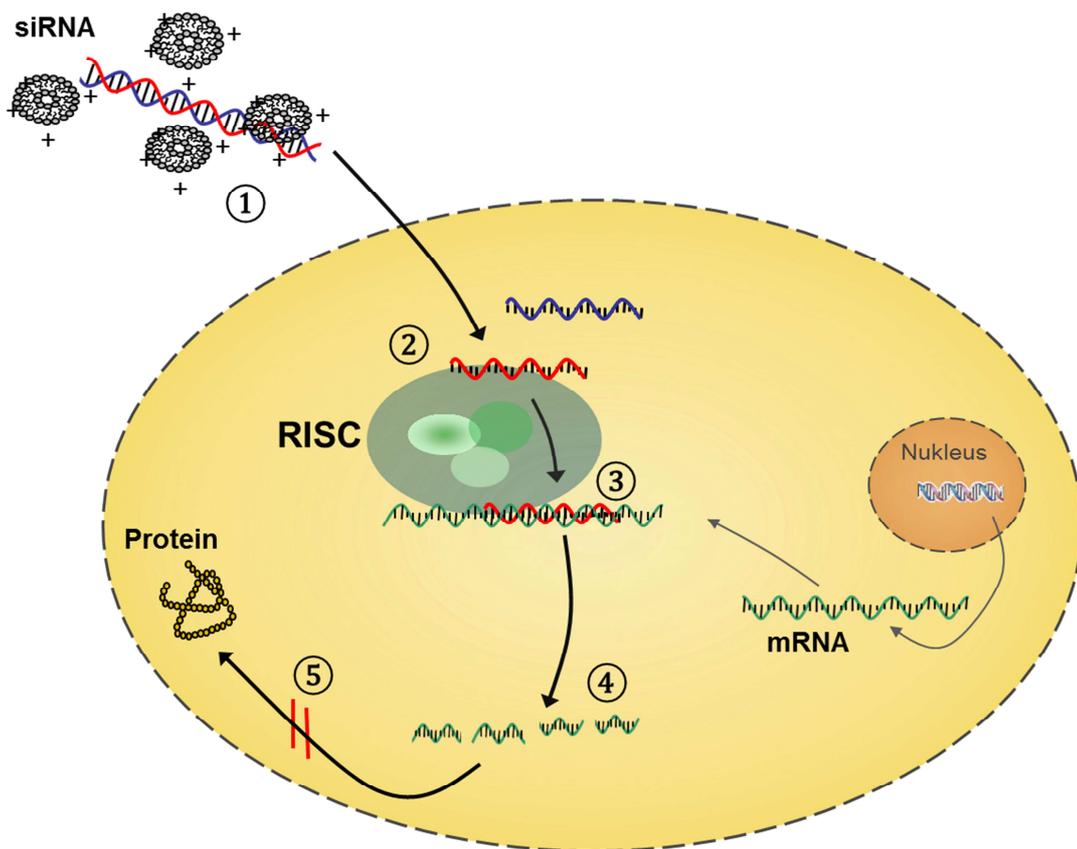


Abb. 4.4: Schematische Darstellung eines Knockdowns mittels synthetischer siRNA. ① Eine für das Targetgen spezifische synthetisch hergestellte siRNA wird in das Medium, das die Zelle umgibt, gegeben. Damit die stark negativ geladene siRNA in die Zelle gelangen kann, wird ein Transfektionsreagenz hinzugefügt, welches in diesem Fall ein kationisches Lipid ist. Die Lipide bilden positiv geladene Liposomen, die sich an die siRNA anlagern. Dieser Komplex kann von der Zelle aufgenommen werden. ② Die siRNA wird auf den RISC übertragen, dort entwunden und der Doppelstrang getrennt. Der Leitstrang verbleibt im Komplex. ③ Eine zum Leitstrang komplementäre mRNA wird in den RISC eingebaut. ④ Die mRNA wird durch Endonukleaseaktivität gespalten und abgebaut. ⑤ Die Translation zum entsprechenden Protein kann nicht mehr erfolgen.

Für eine effiziente Aufnahme sind zwei Transfektionsmethoden gebräuchlich. Bei der Forward Transfektion werden die Zellen am Tag vor der Transfektion ausplattiert, so dass zum Zeitpunkt der Transfektion aktive, sich teilende Zellen vorliegen. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Reversen Transfektion die Aussaat der Zellen und die Transfektion gleichzeitig. Dies hat den Vorteil der Zeitersparnis und führt häufig auch zu einer höheren Knockdown-Effizienz. Die Forward Transfektion hingegen kann für adherente Zellen schonender sein und ist daher bei der Etablierung eines Knockdowns vorzuziehen.

4.3 mARC1 und mARC2 im *N*-reduktiven Metabolismus humaner Zellen

In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass beide rekombinanten humanen mARC-Proteine *in vitro* im rekonstituierten System dazu in der Lage sind, *N*-hydroxylierte Substrate zu reduzieren.^(56, 68) Um aufzuklären, ob dies auch im vollständigen Zellmetabolismus der Fall ist, wurden siRNA-vermittelte mARC-Knockdown Studien mit humanen Zellen durchgeführt. Es wurden mindestens drei verschiedene siRNA Sequenzen für ein Targetgen getestet. Da die Ergebnisse der siRNAs für ein Targetgen übereinstimmten, wurde die Darstellung auf die Ergebnisse einer siRNA beschränkt.

Der mARC1-Knockdown in HEK-293 ließ sich anhand des Verlusts des Proteins im Vergleich zur non-targeting Kontrolle im Western Blot konzentrations- und zeitabhängig nachweisen (Abb. 4.5). Ein maximaler Effekt konnte zwischen 3 und 5 Tagen nach Transfektion beobachtet werden. Die mARC1 Proteinexpression war zwischen 8 und 11 Tagen nach siRNA Transfektion annähernd vollständig wiederhergestellt (Abb. 4.5 B). In HEK-293 Zellen resultierte die mARC1 Herunterregulierung in einer drastisch verminderten *N*-reduktiven Aktivität auf ca. 35 % im Vergleich zur non-targeting Kontrolle (Abb. 4.5). Mit der Wiederherstellung der mARC1 Proteinexpression ab Tag 8 nach Transfektion konnte ein simultaner Anstieg der *N*-reduktiven Umsetzung beobachtet werden (Abb. 4.5 B).

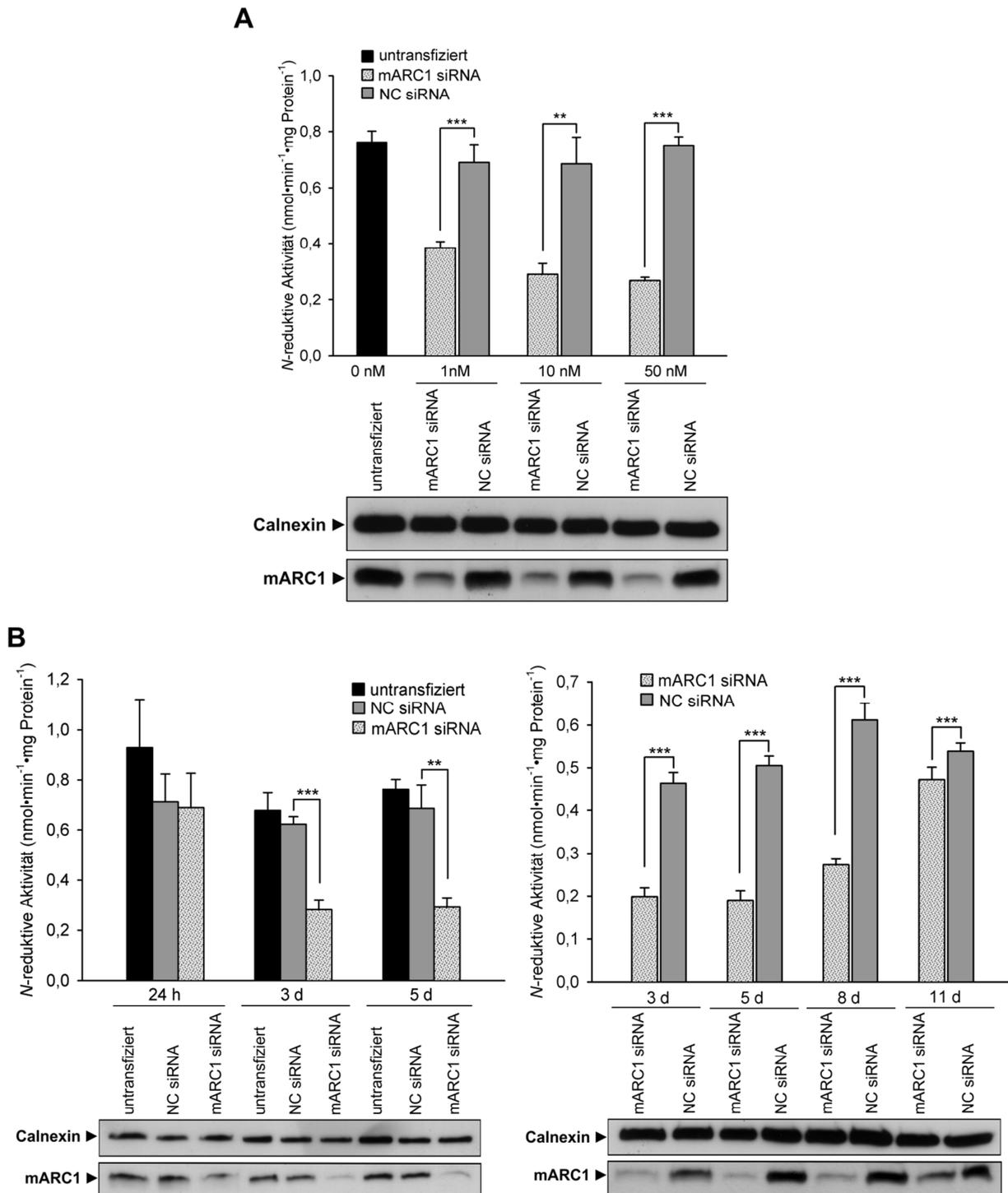


Abb. 4.5: Auswirkung des mARC1-Knockdowns auf die N-reduktive Aktivität in HEK-293. (A) Konzentrationsabhängigkeit des mARC1-Knockdowns: HEK-293 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an mARC1 oder non-targeting (NC) siRNA transfiziert. Die N-reduktive Aktivität der Zellen wurde wie unter 3.1.3 beschrieben an Tag 5 nach Transfektion bestimmt (n=3). **(B)** Zeitabhängigkeit des mARC1-Knockdowns: Der Knockdown auf Proteinebene und die N-reduktive Aktivität wurden an verschiedenen Tagen nach Transfektion untersucht. HEK-293 Zellen wurden mit 10 nM mARC1 siRNA oder non-targeting siRNA transfiziert. Die N-reduktive Aktivität der Zellen wurde wie unter 3.1.3 beschrieben bestimmt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der betreffenden Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-mARC1 oder anti-Calnexin Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert.

Der mARC2-Knockdown konnte 5 Tage nach Transfektion auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die mARC1 Proteinlevel wurden durch die mARC2 siRNA Transfektion nicht beeinflusst. Im Gegensatz zum mARC1-Knockdown hatte der mARC2-Knockdown in HEK-293 keinen Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität der Zellen (Abb. 4.6). Auch der simultane Knockdown von mARC1 und mARC2 in HEK-293 zeigte lediglich eine geringe aber keine signifikante verminderte *N*-Reduktion im Vergleich zum alleinigen mARC1-Knockdown (Abb. 4.7 A). Der Resazurin-Assay belegt, dass die Zellviabilität von HEK-293 durch den mARC-Knockdown nicht beeinflusst wird, so dass eine Veränderung der *N*-Reduktions-Kapazität aufgrund von verminderter Vitalität ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.7 B). Die Umsetzung von SMX-HA nach mARC-Knockdown ergibt ein ähnliches Ergebnis wie mit dem Modells substrat Benzamidoxim. Auch hier kann durch den mARC1-Knockdown eine verminderte Reduktion zu SMX beobachtet werden, während der mARC2-Knockdown die Umsetzung im Vergleich zur non-targeting Kontrolle nicht beeinflusst (Abb. 4.8).

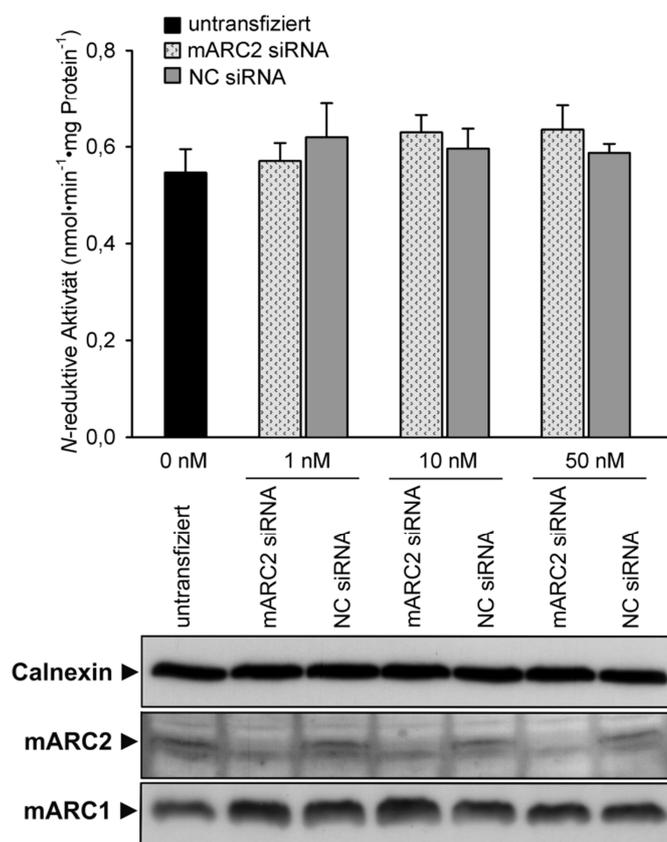


Abb. 4.6: Auswirkung des mARC2-Knockdowns auf die *N*-reduktive Aktivität in HEK-293. HEK-293 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an mARC2 oder non-targeting (NC) siRNA transfiziert. Die *N*-reduktive Aktivität der Zellen wurde wie unter 3.1.3 beschrieben an Tag 5 nach Transfektion bestimmt ($n=3$). Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der betreffenden Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-mARC1, anti-mARC2 oder anti-Calnexin Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert.

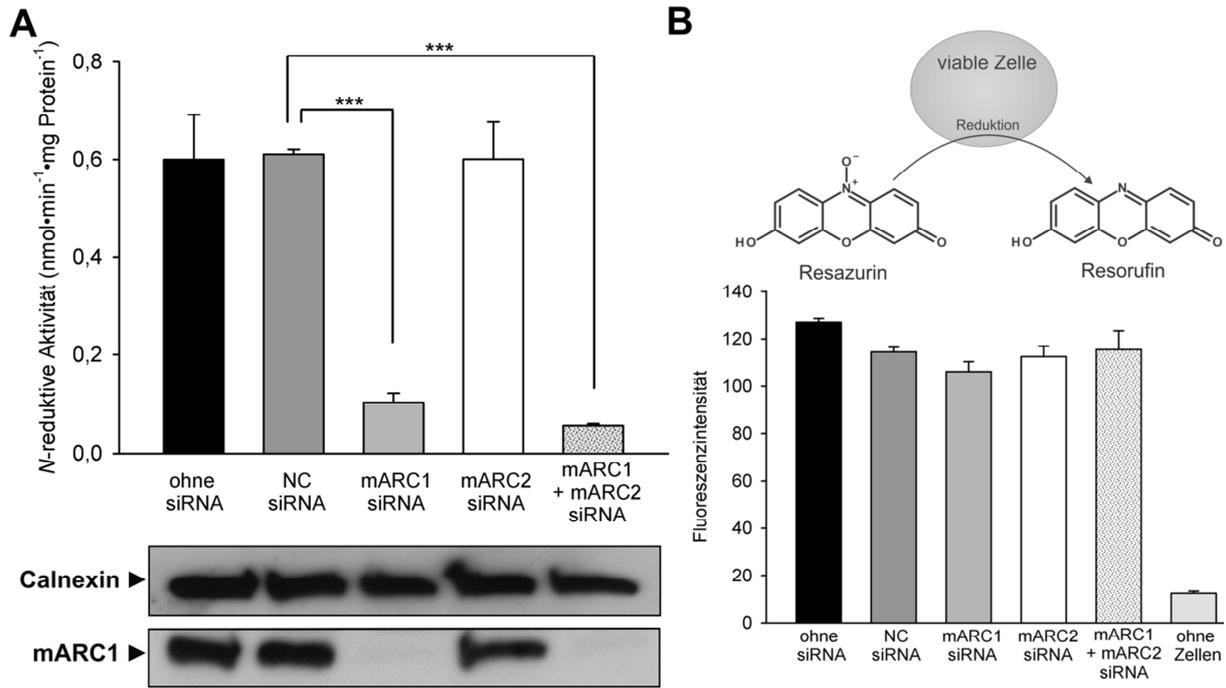


Abb. 4.7: Auswirkung des mARC-Doppelknockdowns auf die N-reduktive Aktivität und Zellviabilität in HEK-293. (A) HEK-293 Zellen wurden mit 20 nM non-targeting (NC), mARC1 oder mARC2 siRNA mittels reverser Transfektion transfiziert bzw. für den simultanen Knockdown mit 10 nM mARC1 und 10 nM mARC2 siRNA transfiziert. Die N-reduktive Aktivität der Zellen wurde wie unter 3.1.3 beschrieben an Tag 5 nach Transfektion bestimmt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der betreffenden Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-mARC1, anti-mARC2 oder anti-Calnexin Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert. mARC2-Protein konnte nicht detektiert werden. (B) Die Zellviabilität wurde mit dem in 3.1.5 beschriebenen Resazurin-Assay an Tag 5 nach Transfektion bestimmt.

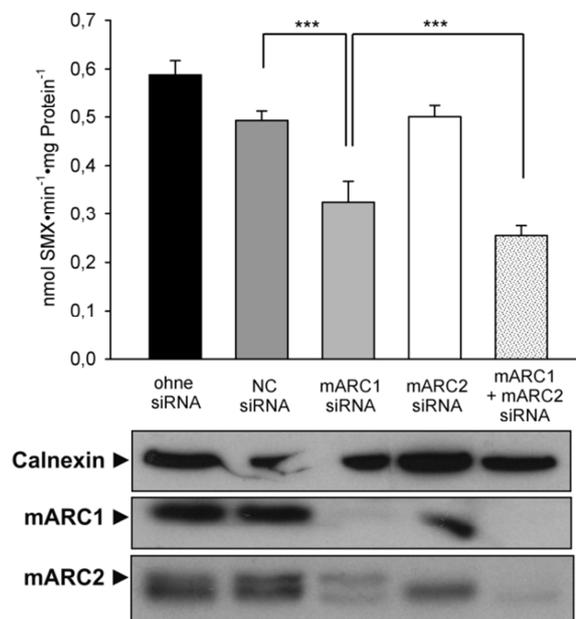


Abb. 4.8: Sulfamethoxazol-Hydroxylamin (SMX-HA) Reduktion in HEK-293 nach mARC-Knockdown. HEK-293 Zellen wurden mit 20 nM non-targeting (NC), mARC1 oder mARC2 siRNA bzw. für den simultanen Knockdown mit 10 nM mARC1 und 10 nM mARC2 siRNA mittels reverser Transfektion transfiziert. Die SMX-HA Reduktion der Zellen wurde wie unter 3.1.6 beschrieben an Tag 5 nach Transfektion bestimmt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der betreffenden Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-mARC1, anti-mARC2 oder anti-Calnexin Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert.

Die mARC2 Expression in HEK-293 Zellen scheint allerdings allgemein sehr gering zu sein, da nur schwer Protein mittels Western Blot detektiert werden konnte (vgl. Abb. 4.6). Um herauszufinden, ob der fehlende Effekt des mARC2-Knockdowns auf die *N*-reduktive Aktivität auf die geringe mARC2 Expression zurückzuführen ist, oder ob mARC2 generell nicht an der *N*-Reduktion im Zellmetabolismus beteiligt ist, wurden weitere Untersuchungen mit ZR-75-1, einer Zelllinie mit annähernd gleicher mARC1 und mARC2 Expression, durchgeführt (Expressionsdaten s. Anhang Abb. XI und Abb. XII). Wie aus Abb. 4.9 A hervorgeht, konnte in ZR-75-1 sowohl mARC1 wie auch mARC2 deutlich nachgewiesen werden. Die RNAi Experimente mit ZR-75-1 zeigten, dass die Herunterregulierung von mARC1 und auch von mARC2 zu einer moderaten aber signifikanten Verminderung der *N*-reduktiven Aktivität führt. Infolgedessen hatte der simultane Knockdown beider Homologe signifikant additive verringerte Effekte auf die Aktivität (Abb. 4.9 A). Die Zellviabilität von ZR-75-1 war nach dem mARC-Knockdown unvermindert, so dass ein Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität aufgrund veränderter Vitalität ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.9 B).

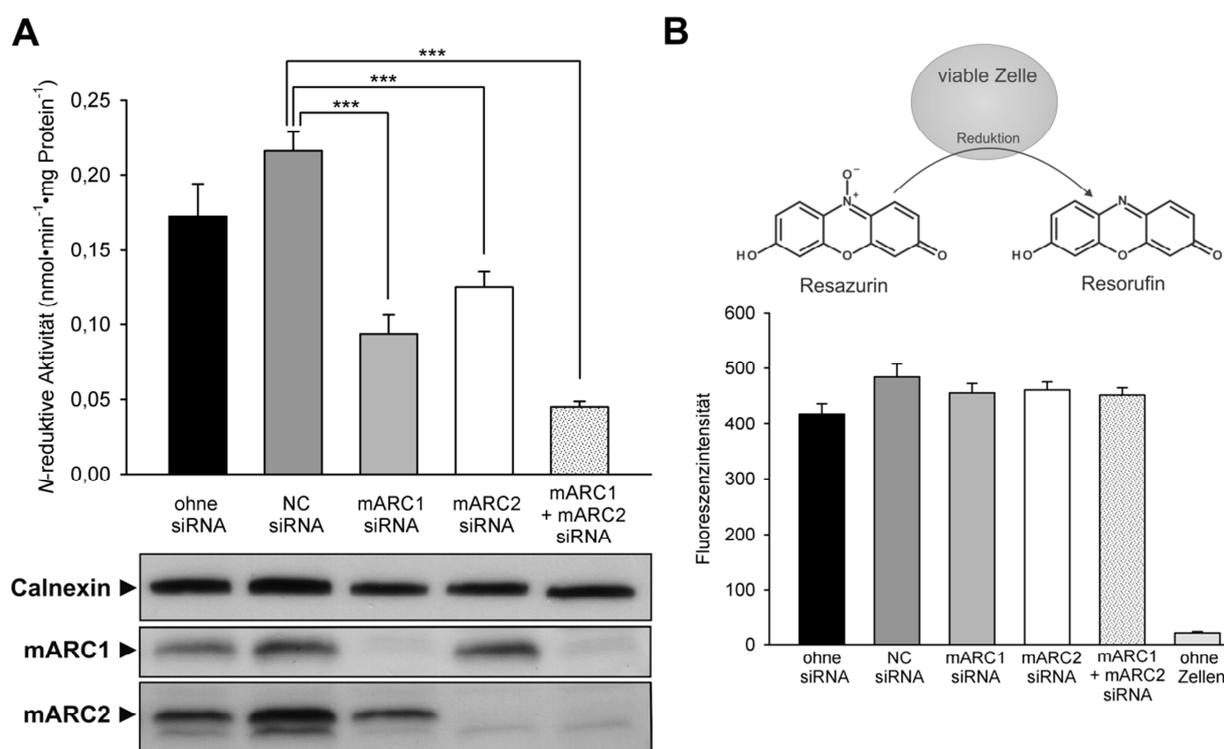


Abb. 4.9: Auswirkung des mARC-Doppelknockdowns auf die *N*-reduktive Aktivität und Zellviabilität in ZR-75-1. (A) ZR-75-1 Zellen wurden mit 20 nM non-targeting (NC), mARC1 oder mARC2 siRNA bzw. für den simultanen Knockdown mit 10 nM mARC1 und 10 nM mARC2 siRNA transfiziert. Die *N*-reduktive Aktivität der Zellen wurde wie unter 3.1.3 beschrieben an Tag 6 nach Transfektion bestimmt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der betreffenden Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-mARC1, anti-mARC2 oder anti-Calnexin Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert. **(B)** Die Zellviabilität wurde mit dem 3.1.5 in beschriebenen Resazurin-Assay an Tag 6 nach Transfektion bestimmt.

4.4 Cytochrom b₅ im *N*-reduktiven System

CYB5 kommt als integrales Membranprotein im ER und in der OMM sowie als lösliche Form in Erythrozyten vor. Die verschiedenen Isoformen werden von zwei Genen codiert. *CYB5A* codiert für die mikrosomale und lösliche Isoform und *CYB5B* für die mitochondriale Isoform.^(87,88) Um aufzuklären welche CYB5-Isoform Bestandteil des *N*-reduktiven Enzymsystems ist, wurden in dieser Arbeit verschiedene Untersuchungen mit dem rekombinanten System, im zellulären System und mit subzellulären Fraktionen durchgeführt.

4.4.1 Mitochondriales und mikrosomales Cytochrom b₅ im rekombinanten *N*-reduktiven System

Das rekombinante humane *N*-reduktive Enzymsystem wurde mit rekombinantem CYB5A oder CYB5B rekonstituiert und die *N*-reduktive Aktivität der Systeme verglichen. Da die rekombinanten Isoformen unterschiedliche Cofaktor-Saturierungen aufwiesen (21 nmol/mg für CYB5A und 4 nmol/mg für CYB5B), wurden für die Studie gleiche Mengen an Cofaktor eingesetzt, aber die Umsetzungsraten zur besseren Vergleichbarkeit nicht auf die Gesamtproteinmenge bezogen. Wie aus Abb. 4.10 hervorgeht lässt sich sowohl das mARC1-haltige also auch das mARC2-haltige *N*-reduktive System mit beiden CYB5-Isoformen mit nahezu gleicher Aktivität rekonstituieren. Das Ergebnis wurde mit weiteren CYB5 Chargen mit unterschiedlichen Cofaktor-Sättigungen reproduziert (Daten nicht gezeigt).

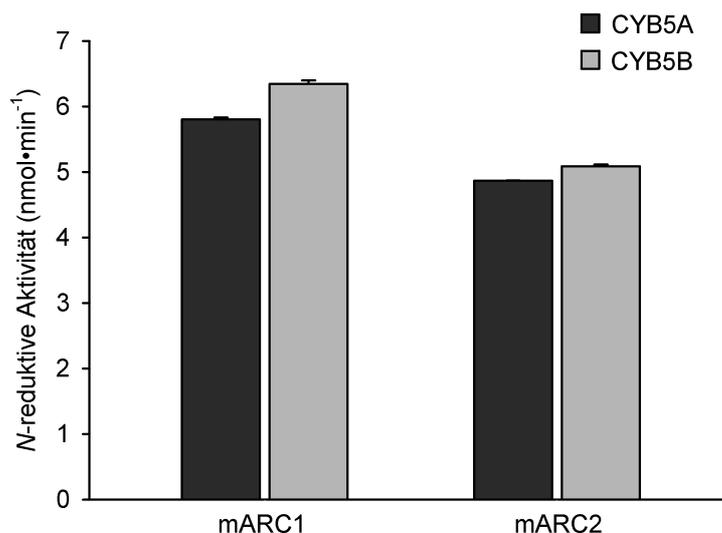


Abb. 4.10: *In vitro* Rekonstitution des humanen *N*-reduktiven Enzymsystems mit CYB5A oder CYB5B. Die *N*-reduktive Aktivität wurde wie in 3.3.1 beschrieben bestimmt. Das mARC-haltige Enzymsystem wurde entweder mit der CYB5A- oder der CYB5B-Isoform vervollständigt (n=2).

4.4.2 Mitochondrialer und mikrosomaler Cytochrom b₅-Knockdown in HEK-293

Um zu untersuchen, ob beide oder nur eine Isoform an der *N*-Reduktion im Zellstoffwechsel beteiligt sind, wurden jeweils einzeln die beiden CYB5-Proteine in HEK-293 Zellen siRNA-vermittelt herunterreguliert. Es wurden drei verschiedene siRNA Sequenzen für ein Targetgen getestet. Da die Ergebnisse der siRNAs für ein Targetgen übereinstimmten, wurde die Darstellung auf die Ergebnisse einer siRNA beschränkt. Die Herunterregulierung der Proteine im Vergleich zur non-targeting Kontrolle wurde mittels Western Blot konzentrations- und zeitabhängig nachgewiesen (Abb. 4.11, Abb. 4.12). Der Knockdown der einen Isoform hatte keine Auswirkung auf die Proteinlevel der anderen Isoform. Maximale Effekte konnten für beide Isoformen zwischen 3 und 5 Tagen nach Transfektion beobachtet werden. Wie in Abb. 4.11 zu sehen, führte der mitochondriale CYB5B-Knockdown in HEK-293 Zellen zu einer enorm herabgesetzten *N*-reduktiven Aktivität auf bis zu 35 % im Vergleich zur non-targeting Kontrolle. Im Gegensatz dazu hatte die Herunterregulierung von mikrosomalem CYB5A keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die *N*-reduktive Aktivität. Mit höheren siRNA Konzentrationen waren hier sogar leicht höhere Umsetzungsraten zu beobachten (Abb. 4.12).

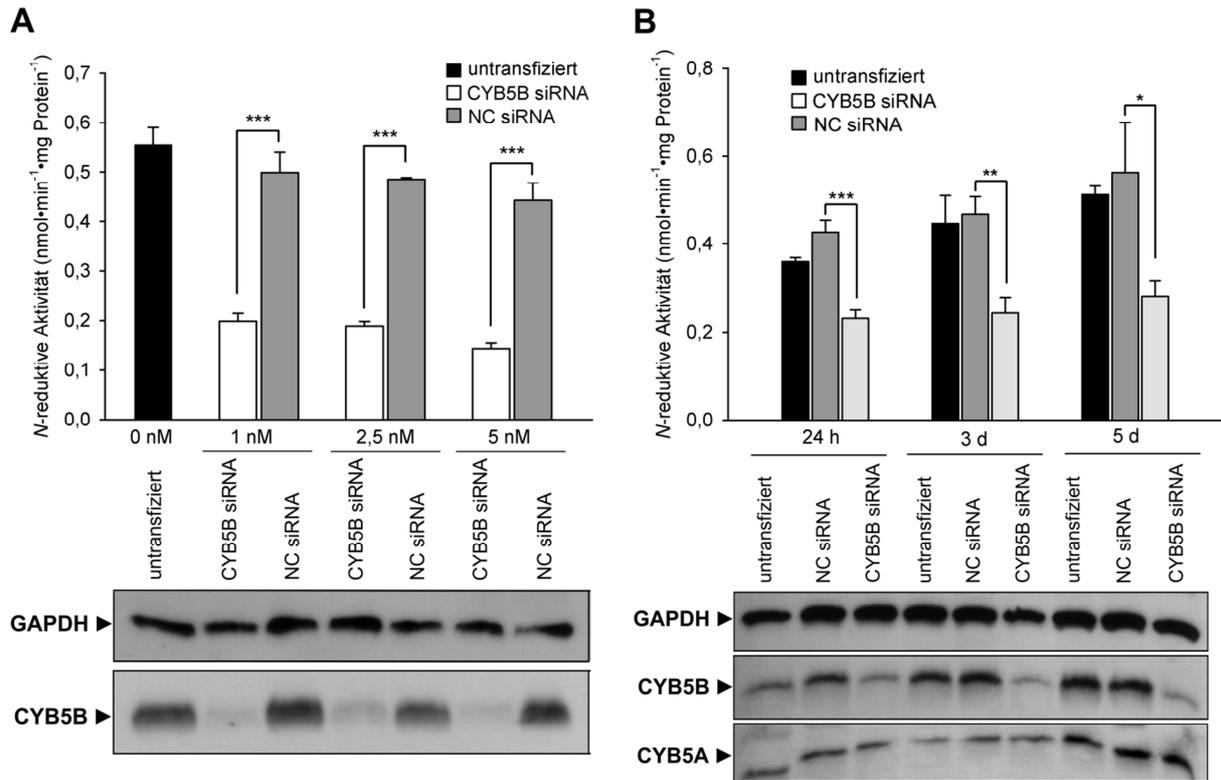


Abb. 4.11: Auswirkung des mitochondrialen Cytochrom b_5 -Knockdowns auf die N -reduktive Aktivität in HEK-293. (A) Konzentrationsabhängigkeit: HEK-293 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an CYB5B oder non-targeting (NC) siRNA transfiziert. Die N -reduktive Aktivität wurde wie unter 3.1.3 beschrieben an Tag 5 nach Transfektion bestimmt ($n=3$). **(B) Zeitabhängigkeit:** HEK-293 Zellen wurden mit 10 nM CYB5B siRNA oder non-targeting siRNA transfiziert. Die N -reduktive Aktivität wurde wie unter 3.1.3 beschrieben bestimmt ($n=3$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-CYB5B, anti-CYB5A oder anti-GAPDH Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert.

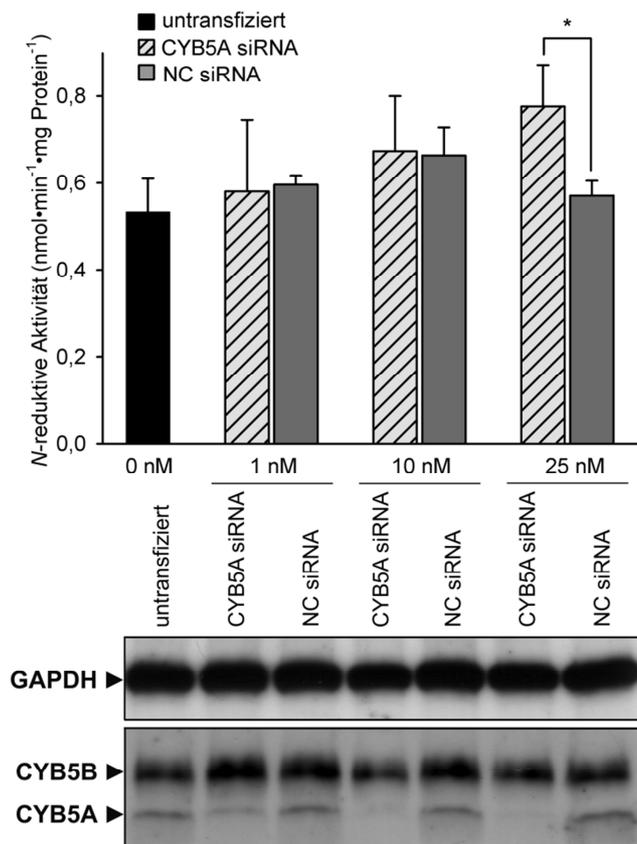


Abb. 4.12: Auswirkung des mikrosomalen Cytochrom b₅-Knockdowns auf die N-reduktive Aktivität in HEK-293. HEK-293 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an CYB5A oder non-targeting (NC) siRNA transfiziert. Die N-reduktive Aktivität der Zellen wurde wie unter 3.1.3 beschrieben an Tag 5 nach Transfektion bestimmt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der betreffenden Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-CYB5A oder anti-GAPDH Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert.

4.4.3 Mikrosomale Cytochrom b₅-Knockout Maus

Ergänzend zu den CYB5A-Knockdown Studien wurden subzelluläre Fraktionen von CYB5A-Knockout-Mauslebern bezüglich der *N*-reduktiven Aktivität untersucht. Subzelluläre Fraktionen wurden aus homozygoten CYB5A-Knockout-Mauslebern (KO, CYB5A^{-/-}) und Wildtyp-Mauslebern (WT, CYB5A^{+/+}) hergestellt und das Fehlen des CYB5A-Proteins mittels Western Blot bestätigt. Die CYB5B Expression blieb durch den CYB5A-Knockout unbeeinflusst (Abb. 4.13). Anschließend wurden Homogenat-, Mikrosomen- und Mitochondrien-Fractionen wie in 3.3.2 beschrieben inkubiert und die *N*-reduktiven Umsetzungen ermittelt. Durch Cross-Kontamination wurde auch CYB5B in der mikrosomalen Fraktion und CYB5A in der mitochondrialen Fraktion von Wildtyp-Mäusen nachgewiesen. Die Reduktase-Aktivität war in der mitochondrialen Fraktion von Wildtyp- und Knockout-Mauslebern im Vergleich zum Homogenat und der Mikrosomen-Fraktion angereichert. Die CYB5A-Knockdown Experimente unterstützend, wurde kein signifikanter Unterschied in der *N*-reduktiven Aktivität zwischen Wildtyp- und CYB5A-Knockout-Proben gefunden (Abb. 4.13).

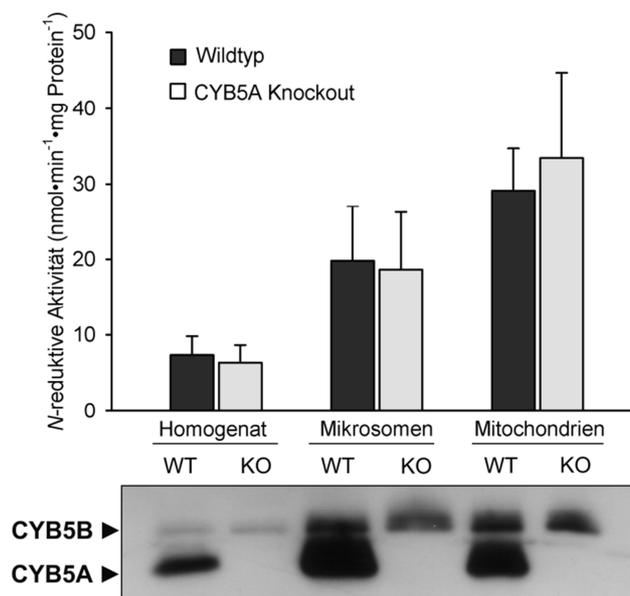


Abb. 4.13: *N*-reduktive Aktivität subzellulärer Fraktionen mikrosomaler CYB5-Knockout-Mauslebern. Die *N*-reduktive Aktivität der subzellulären Fraktionen von Wildtyp (WT)- und CYB5A-Knockout (KO)-Mauslebern wurde wie in 3.3.2 beschrieben bestimmt. Die Assays wurden mit einem Pool aus zwei Leberpräparationen und einer individuellen Leberprobe von Wildtyp oder Knockout Mäusen durchgeführt, die jeweils in einem Doppeltansatz inkubiert wurden ($n=3 \times 2$). Die Abwesenheit von CYB5A-Protein der einzelnen Knockout-Proben wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-CYB5A Antikörper verifiziert.

4.4.4 Beteiligung des Cytochrom b₅-Häms im *N*-reduktiven System

Es wird angenommen, dass CYB5 Elektronen von CYB5R aufnimmt und über das Häm auf den Moco von mARC transferiert und daher als Elektronentransportprotein im *N*-reduktiven Enzymsystem fungiert.⁽⁷⁶⁾ Allerdings sind einige CYP450-katalysierte Reaktionen beschrieben, die durch CYB5 oder auch durch Apo-CYB5 stimuliert werden können.⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾ Diese Erkenntnisse legen nahe, dass CYB5 in diesen Reaktionen nicht als Elektronendonator dient, sondern hier Häm-unabhängige allosterische Effekte ausübt, die den produktiven Elektronentransfer zwischen CYP450-Reduktase und CYP450 erleichtern. Um herauszufinden über welchen Mechanismus CYB5B am mARC-haltigen *N*-reduktiven System beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das *N*-reduktive System mit Apo-CYB5, dem das Häm fehlt und das daher nicht am Elektronentransfer teilnehmen kann, funktionsfähig rekonstituiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde zunächst Apo-CYB5 aus rekombinant exprimiertem Holo-CYB5 durch Entfernung des Häms mittels der in 3.2.6 beschriebenen Butanon-Behandlung hergestellt. Um die Funktionalität von Apo-CYB5 nach der Butanon-Behandlung sicherzustellen, wurde das Protein durch erneute Häm-Inkorporation wieder rekonstituiert. Die Vorgehensweise ist schematisch in Abb. 4.14 dargestellt. Die Häm-Sättigungen von Apo-, Holo- und Häm-reinkorporiertem CYB5 wurde bestimmt, um den Verlust und die Rückgewinnung von CYB5-Häm zu bestätigen (Abb. 4.15 A). Anschließend wurde die Aktivität der *N*-reduktiven Systeme, die mit der jeweiligen CYB5-Form (Holo-, Apo- und rekonstituiertem CYB5) rekonstituiert wurden, bestimmt. Wie in Abb. 4.15 zu sehen ist, war das System mit Holo-CYB5 *N*-reduktiv aktiv, mit Apo-CYB5 hingegen konnte kaum eine Umsetzung gemessen werden. Die geringe Restaktivität ist auf den kleinen verbliebenen Anteil an Häm-haltigen CYB5 in der Apo-CYB5 Aufarbeitung zurückzuführen. Durch das Wiedereinfügen von Häm in Apo-CYB5 konnte die Aktivität wieder hergestellt werden.

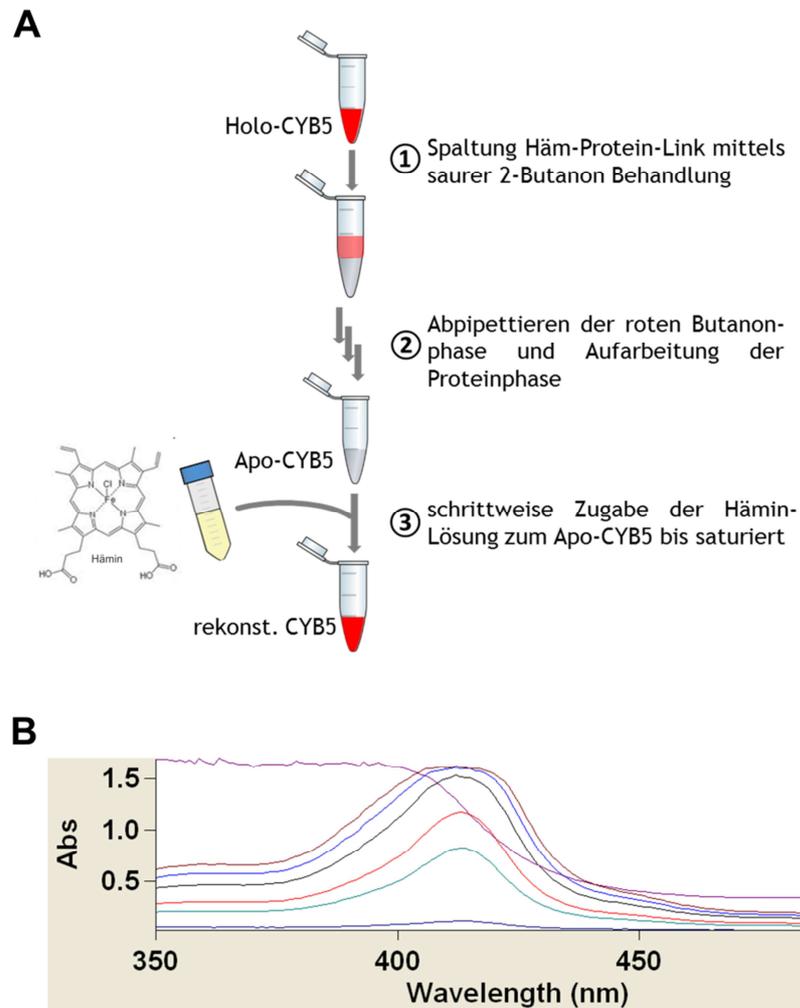


Abb. 4.14: Häm-Cleavage in Cytochrom b_5 und Häm-Reinkorporation in Apo-Cytochrom b_5 . (A) Zur Apo-CYB5 Herstellung wurde im 1. Schritt der Häm-Protein-Link mittels 2-Butanon Behandlung gespalten. Da sich das Häm in der Butanonphase löst, lässt sich im 2. Schritt das Apo-CYB5 durch Entfernen der organischen Phase und Aufarbeitung der wässrigen Proteinphase gewinnen. Durch schrittweise Zugabe der wie in 3.2.7 beschrieben hergestellten Häm-Lösung konnte das Apo-CYB5 wieder mit Häm beladen und so rekonstituiert werden. (B) Die schrittweise Häm-Inkorporation wurde mittels Aufnahme von UV-Vis-Spektren und über den Anstieg des Soret Peaks von CYB5B bei 413 nm verfolgt. Die Rekonstitution wurde als vollständig angesehen, wenn der Soret Peak in ein Plateau überging, verursacht durch einen Überschuss an freiem Tris-komplexiertem Häm (braunes Spektrum). In lila ist das Absorptionsspektrum der Häm-Lösung dargestellt.

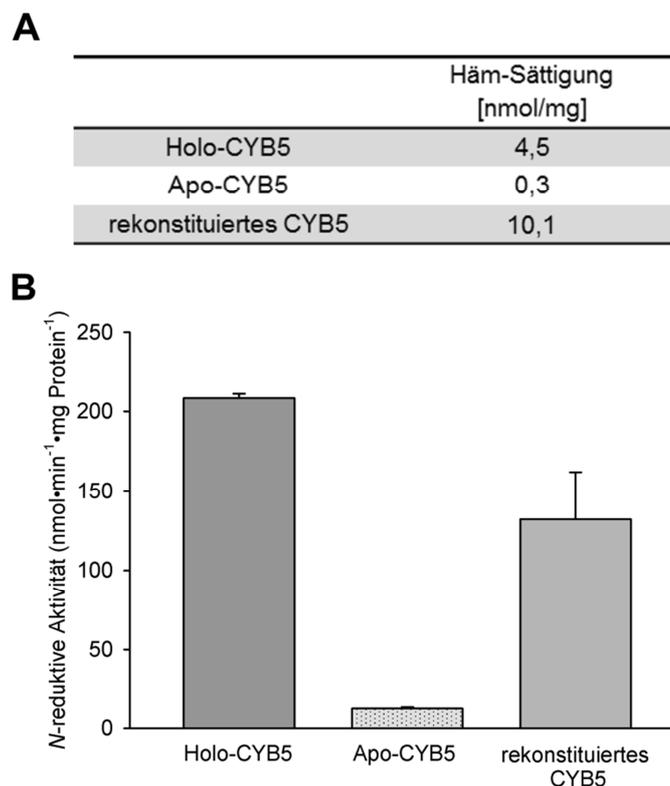


Abb. 4.15: Beteiligung des CYB5-Häms an der N-Reduktion. Rekombinantes CYB5 (Holo-CYB5) wurde wie in 3.2.4 beschrieben erhalten. Apo-CYB5 wurde aus Holo-CYB5 mittels Häm-Cleavage generiert und derselbe Ansatz anschließend durch Häm-Inkorporation rekonstituiert. Das humane rekombinante *N*-reduktive Enzymsystem wurde dann mit mARC1, CYB5R und einer der hergestellten CYB5-Formen rekonstituiert und die *N*-reduktive Aktivität der Systeme ermittelt. **(A)** Häm-Sättigungen von Holo-CYB5, Apo-CYB5 und rekonstituiertem CYB5 wurden wie unter 3.2.5.2 beschrieben bestimmt, um die Häm-Entfernung und Häm-Inkorporation zu verifizieren. **(B)** Die *N*-reduktive Aktivität wurden wie in 3.3.1 beschrieben bestimmt. Inkubationsansätze enthielten 75 pmol mARC1, 7,5 pmol CYB5R und 75 pmol Holo-CYB5 oder rekonstituiertes CYB5 oder die gleiche Menge an Apo-CYB5-Protein wie Holo-CYB5-Protein. (n=2).

Zur Ergänzung der Ergebnisse, die mit durch Häm-Cleavage gewonnenem Apo-CYB5 erhalten wurden, wurden zusätzlich Untersuchungen an einer rekombinanten CYB5 Aufarbeitung vorgenommen, die nach der His-Tag-Aufreinigung zu über 99 % als Apo-Protein vorlag. Mit der in 3.2.7 beschriebenen Methode, wurden aus diesem Apo-CYB5 drei unterschiedlich stark mit Häm gesättigte CYB5-Proteinchargen hergestellt (CYB5 „low“, CYB5 „med“ und CYB5 „high“) (Abb. 4.16 B und C). Das rekombinante *N*-reduktive Enzymsystem wurde anschließend mit je einer CYB5-Aufarbeitung rekonstituiert und die Systeme in ihrer *N*-reduktiven Aktivität verglichen. In Abb. 4.16 A ist zu sehen, dass je stärker das CYB5-Protein mit Häm beladen ist, desto höher ist die Fähigkeit zur *N*-Reduktion.

Die gezeigten Untersuchungen mit den Apo-CYB5-Proteinen bestätigen demzufolge, dass das CYB5-gebundene Häm für die *N*-reduktive Katalyse erforderlich ist.

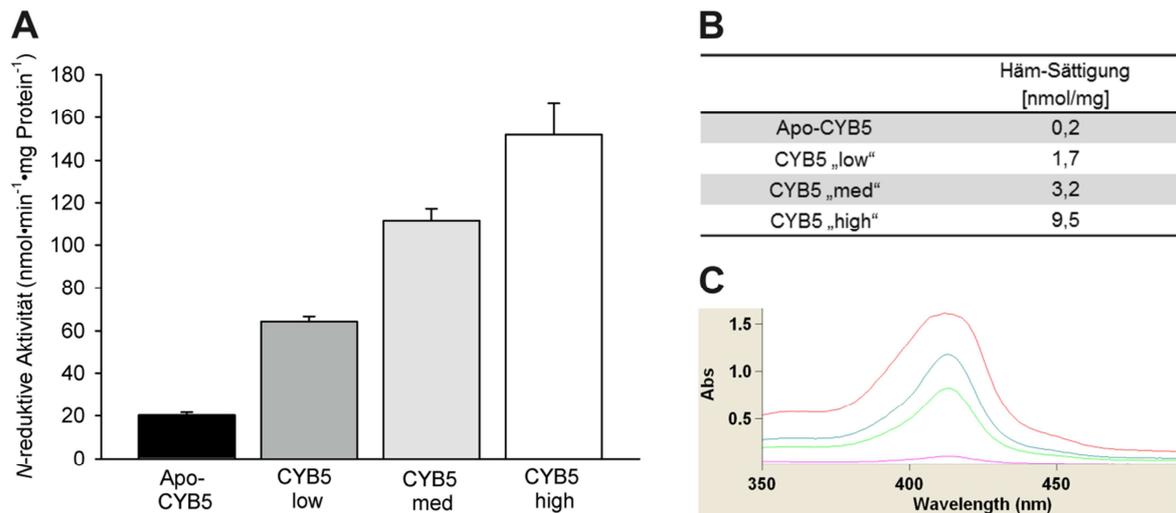


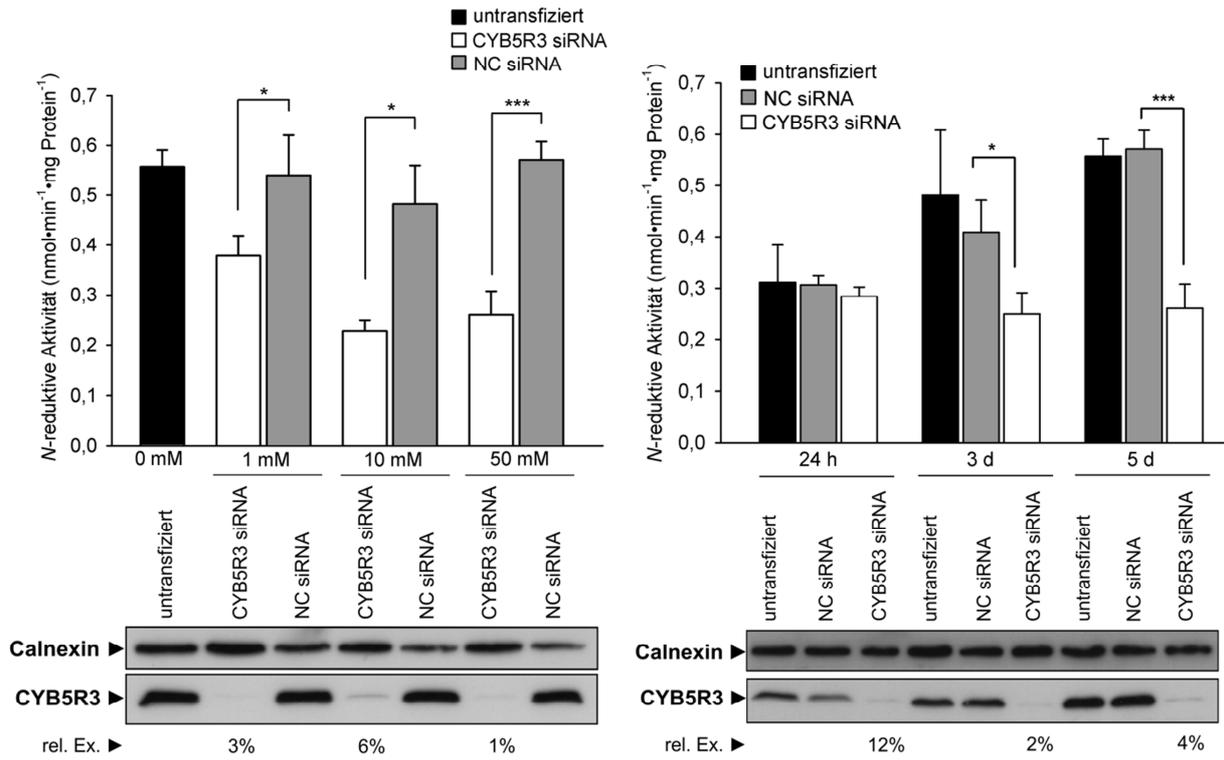
Abb. 4.16: N-Reduktion von CYB5-Proteinen mit unterschiedlichen Häm-Sättigungen. Nach der His-Tag-Aufreinigung erhaltenes rekombinant hergestelltes Apo-CYB5 wurde durch Häm-Inkorporation unterschiedlich stark mit Häm gesättigt. Das humane rekombinante *N*-reduktive Enzymsystem wurde dann mit mARC1, CYB5R und einer der hergestellten CYB5-Formen rekonstituiert und die *N*-reduktive Aktivität der Systeme ermittelt. **(A)** Die *N*-reduktive Aktivität wurden wie in 3.3.1 beschrieben bestimmt. Inkubationsansätze enthielten 75 pmol mARC1, 7,5 pmol CYB5R und 30 µg CYB5. Für Apo-CYB5 entspricht das 6 pmol, für CYB5 „low“ 51 pmol, für CYB5 „med“ 96 pmol und für CYB5 „high“ 285 pmol pro Inkubationsansatz. (n=2). **(B)** Häm-Sättigungen wurden über die in 3.2.5.2 beschriebene Methode bestimmt, um die Häm-Inkorporation zu verifizieren. **(C)** Die Häm-Inkorporation wurde mittels Aufnahme von UV-Vis-Spektren und über den Anstieg des Soret Peaks von CYB5B bei 413 nm verfolgt. Pink=Apo-CYB5; grün=CYB5 „low“; blau=CYB5 „med“; rot=CYB5 „high“.

4.5 NADH-Cytochrom b₅ Reduktase im *N*-reduktiven Metabolismus humaner Zellen

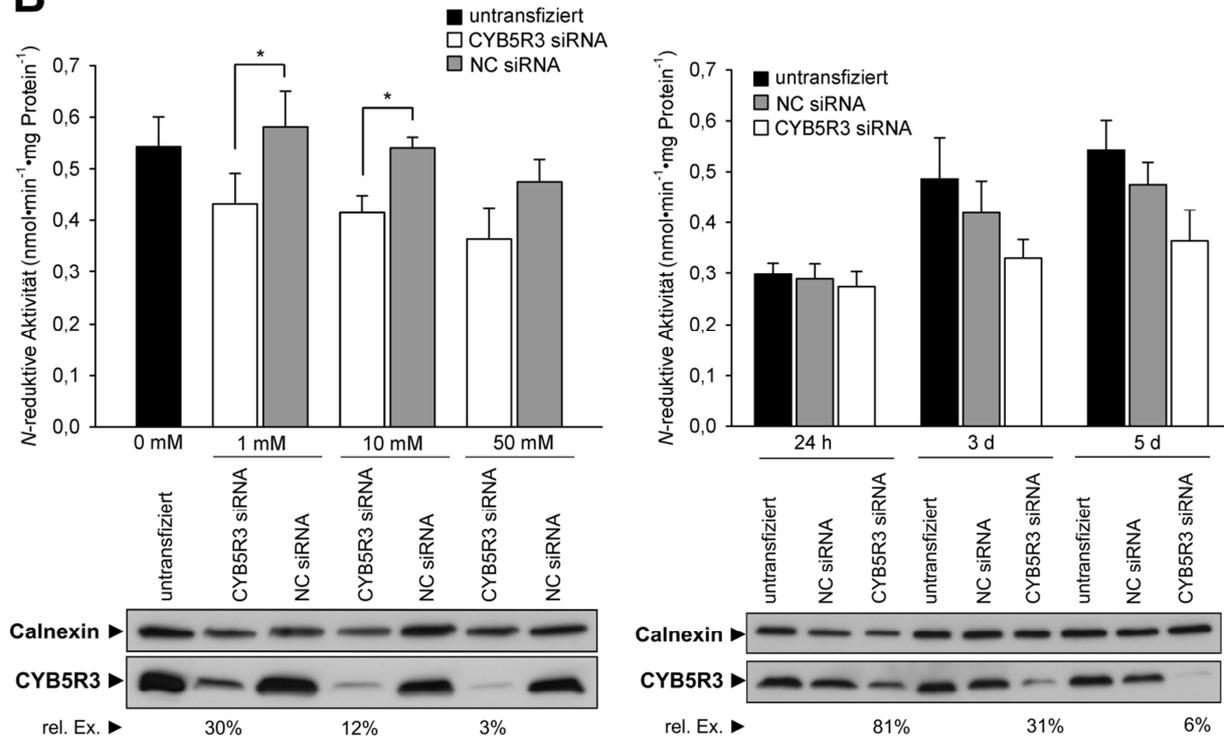
Für das rekombinante *N*-reduktive System wurde CYB5R3 als Komponente ausgewählt.⁽⁵⁶⁾ Ob CYB5R3 ebenfalls die im Zellmetabolismus relevante Reduktase darstellt, wurde über Knockdown Studien in HEK-293 untersucht.

Es wurden drei verschiedene siRNA Sequenzen für das Targetgen getestet. Der CYB5R3-Knockdown in HEK-293 wurde durch Verlust des Proteins im Vergleich zur non-targeting Kontrolle mittels Western Blot konzentrations- und zeitabhängig nachgewiesen (Abb. 4.17). Maximaler Knockdown konnte zwischen 3 und 5 Tagen nach Transfektion beobachtet werden. Mit allen drei siRNA Sequenzen konnte eine Herunterregulation der CYB5R3-Proteinlevel erreicht werden, dennoch sind Unterschiede in der Knockdown-Effizienz zu erkennen. Zur Quantifizierung der Knockdown-Effizienzen wurden densitometrische Messungen der Western Blot-Banden durchgeführt und die relativen Expressionslevel bezogen auf die non-targeting Kontrolle errechnet. Wie aus Abb. 4.17 A hervorgeht, konnte in HEK-293 Zellen mit der Transfektion der siRNA CYB5R3 HSS141829 eine sehr hohe Knockdown-Effizienz mit einer relativen CYB5R3 Expression von bis zu 1 % erreicht werden. Die Transfektion dieser siRNA resultierte in einer auf bis zu 45 % verminderten *N*-reduktiven Aktivität im Vergleich zur non-targeting Kontrolle. Mit der siRNA CYB5R3 HSS176177 ließen sich gute, aber nicht ganz so hohe Knockdown-Effizienzen wie mit der vorherigen siRNA erzielen. Hier führte die Transfektion zu einer schwach herabgesetzten *N*-reduktiven Aktivität um ca. 25 % (Abb. 4.17 B). Die Knockdown-Effizienz nach der Transfektion der dritten CYB5R3 siRNA HSS141830 war nur mäßig. Dementsprechend konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität beobachtet werden (Abb. 4.17 C). Es ist zu erkennen, dass die Knockdown-Effizienz der drei siRNAs meist mit der Abnahme der *N*-reduktiven Aktivität korreliert. Signifikante Effekte auf die *N*-Reduktion sind dabei nur bei einer sehr hohen Knockdown-Effizienz bei relativen CYB5R3 Expressionsleveln von < 15 % zu messen (Abb. 4.17).

A



B



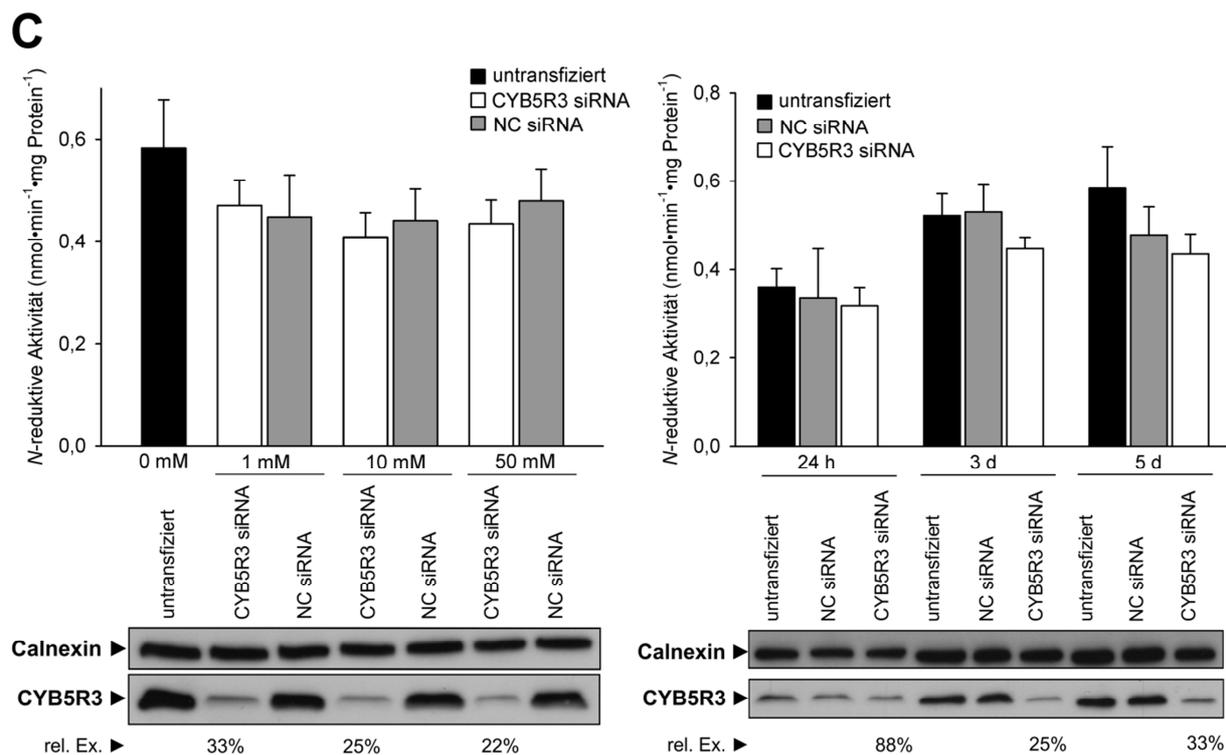


Abb. 4.17: Einfluss der Transfektion von verschiedenen siRNA Sequenzen gegen NADH-Cytochrom b₅ Reduktase 3 auf die N-reduktive Aktivität in HEK-293. (A) Knockdown mit siRNA CYB5R3 HSS176177 (B) Knockdown mit siRNA CYB5R3 HSS141829 (C) Knockdown mit siRNA CYB5R3 HSS141830.

Dargestellt ist jeweils der konzentrationsabhängige Knockdown auf Proteinebene und der Effekt auf den N-reduktiven Metabolismus 5 Tage nach Transfektion und der zeitabhängige Knockdown nach Transfektion von 50 nM CYB5R3 siRNA oder non-targeting siRNA. Die N-reduktive Aktivität der Zellen wurde wie unter 3.1.3 beschrieben bestimmt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der betreffenden Proteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-CYB5R3 oder anti-Calnexin Antikörper (Ladekontrolle) verifiziert. Die Calnexin- und CYB5R3 Western Blot-Banden wurden mit dem Programm ImageJ densitometrisch vermessen und ins Verhältnis gesetzt. Als Maß für die Knockdown-Effizienz wurden hieraus die relativen Expressionslevel bezogen auf NC (rel. Ex.) berechnet.

4.6 Reduktive Detoxifizierung mutagener *N*-hydroxylierter Basen in humanen Zellen durch das mARC-Enzymsystem

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass das *in vitro* rekonstituierte rekombinante Enzymsystem dazu in der Lage ist, *N*-hydroxylierte Nucleobasen sowie *N*-hydroxylierte Nucleoside zu den korrespondierenden natürlichen Nucleobasen und Nucleosiden zu reduzieren.⁽⁷⁰⁾ Da sich die *N*-hydroxylierten Nucleobasen in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen als toxisch und mutagen erwiesen haben^(116,117), ist die Frage nach der physiologischen Relevanz der mARC-vermittelten *N*-Reduktion als Entgiftungsreaktion von besonderem Interesse. In dieser Arbeit wurden daher Untersuchungen zur Entgiftung von HAP als Basenalogon und HAPR als Nucleosidanalogen in humanen Zellen unternommen. Zunächst wurden die Umsetzungen im Zellstoffwechsel charakterisiert und die Beteiligung von mARC mittels Knockdown verifiziert. Anschließend wurde mittels geeigneter Assays untersucht, inwieweit die Herunterregulierung von mARC die Sensibilität humaner Zellen gegenüber HAP beeinflusst.

4.6.1 Reduktive Detoxifizierung von 6-*N*-Hydroxylaminopurin

4.6.1.1 mARC-vermittelte *N*-reduktive Umsetzung durch HEK-293

Die reduktive HAP-Umsetzung wurde in HEK-293 Zellen untersucht. Hierzu wurden zunächst die zeitabhängige und substratabhängige Reduktion zu Adenin wie in Kap. 3.1.7.1 beschrieben ermittelt.

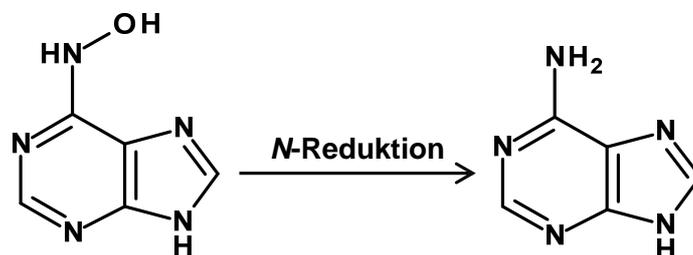


Abb. 4.18: Reduktive Metabolisierung von 6-*N*-Hydroxylaminopurin (HAP) zu Adenin in humanen Zellen.

Die Analyten HAP und Adenin wurden aus dem Zellkulturüberstand mit der in Kap. 3.1.7.2 beschriebenen HPLC-Methode quantifiziert. Ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 4.19 gezeigt.

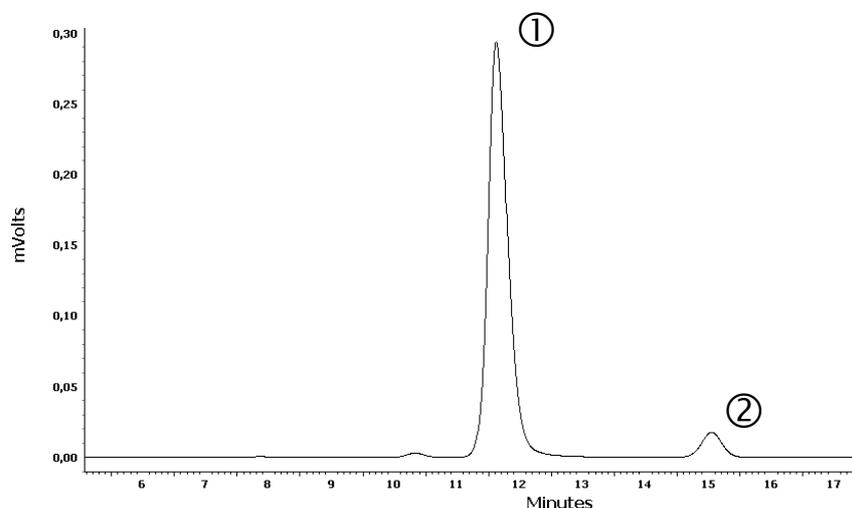


Abb. 4.19: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm: Dargestellt ist die Trennung eines Stoffgemisches aus 1 mM HAP (①) und 50 μ M Adenin (②).

Wie aus Abb. 4.20 A hervorgeht, ist im Zellassay eine Verzögerungszeit von 90 min zu beobachten. Erst ab dieser Inkubationszeit ist eine konstante Umsetzungsgeschwindigkeit zu messen. Die reduktive Umsetzung folgt einer Michealis-Menten-Kinetik und das System ist ab einer Substratkonzentration von ca. 2 mM gesättigt (Abb. 4.20 B).

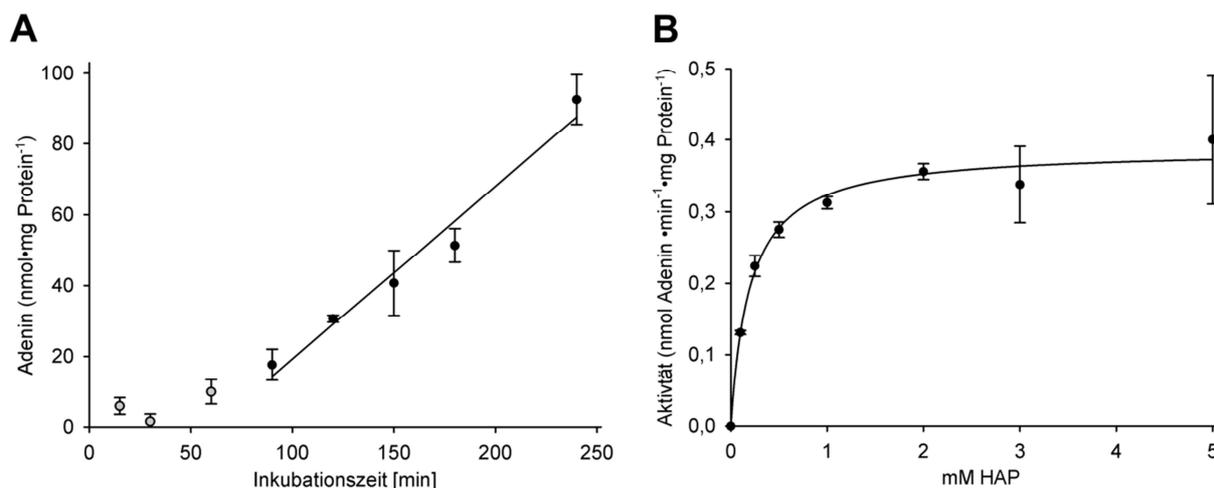


Abb. 4.20: Charakterisierung der HAP-Reduktion zu Adenin in HEK-293. Die Inkubationen erfolgten wie unter 3.1.7 beschrieben. Inkubationszeiten und HAP-Konzentrationen wurden variiert. Die DMSO Konzentration im Inkubationsmedium betrug stets 0,5 %. (n=3). **(A)** Die Untersuchung der zeitabhängigen Umsetzung wurde mit 2 mM HAP durchgeführt. **(B)** Bei der Substratabhängigkeit betrug die Inkubationszeit 180 min.

Um zu bestätigen, dass die HAP-Reduktion in HEK-293 mARC-katalysiert abläuft, wurde die Umsetzung zu Adenin nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung von mARC1 gemessen. Auf die Transfektion von mARC2 siRNA wurde verzichtet, da in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, dass mARC2 in HEK-293 keinen signifikanten Einfluss auf die *N*-Reduktion besitzt (vgl. Abb. 4.6). Wie in Abb. 4.21 zu sehen ist, nimmt die HAP-Reduktion nach mARC1-Knockdown drastisch ab. Im Vergleich zur non-targeting Kontrolle fällt die Umsetzungsrate auf 15 %.

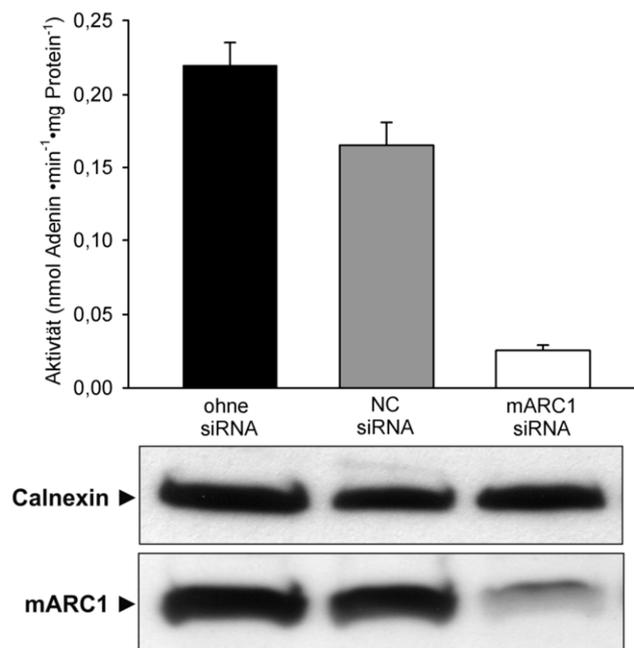


Abb. 4.21: HAP-Reduktion in HEK-293 nach mARC1-Knockdown. Mittels reverser Transfektion wurden die Zellen mit 10 nM mARC1 oder non-targeting siRNA (NC) transfiziert. Die Inkubation erfolgte wie unter 3.1.7 beschrieben an Tag 3 nach Transfektion. Das Inkubationsmedium enthielt 3 mM HAP und die Inkubationszeit betrug 180 min. Die Herunterregulierung von mARC1 wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-mARC1 und anti-Calnexin (Ladekontrolle) Antikörper verifiziert.

4.6.1.2 HAP-induzierte Apoptose nach mARC-Knockdown in HeLa

Um den Einfluss des mARC-Knockdowns auf die Sensibilität von HeLa Zellen gegenüber HAP zu untersuchen, wurden dem jeweiligen Kulturmedium von Zellen mit und ohne mARC-Knockdown steigende Konzentrationen an HAP hinzugefügt (vgl. 3.1.9). Die Herunterregulation der mARC-Proteine wurde mittels Western Blot bestätigt (Abb. 4.22).

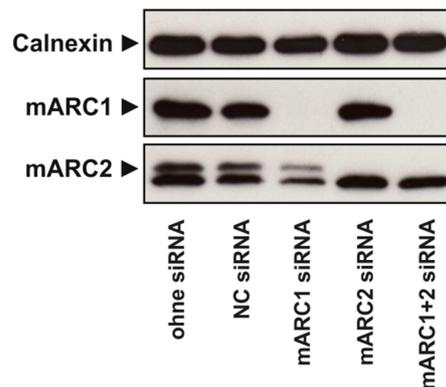


Abb. 4.22 Verifizierung des mARC-Knockdowns in HeLa für die Untersuchung der HAP-Sensibilität. Mittels reverser Transfektion wurden 10 nM non-targeting siRNA, mARC1 oder mARC2 siRNA transfiziert bzw. je 5 nM für den mARC-Doppelknockdown. Am Tag 3 nach Transfektion wurden die Zellen für die Untersuchung gesplittet und neu ausplattiert. Aus dem Überschuss an Zellsuspensionen wurden Zellysate gewonnen, mit denen zur Verifizierung des Knockdowns Western Blot Analysen unter Verwendung von anti-mARC1, anti-mARC2 oder anti-Calnexin Antikörper (Ladekontrolle) durchgeführt wurden.

Nach 24 h und 48 h Inkubation wurden die Zellen hinsichtlich der apoptotischen Populationen verglichen. Zur Detektion der Apoptose wurden mit der Annexin V-PE/7-AAD-Durchflusszytometrie Analyse und der PARP-Spaltungs-Detektion zwei voneinander unabhängige Apoptose-Assays etabliert. Zudem wurde zum Nachweis apoptotischer Merkmale eine Hoechst-Färbung durchgeführt.

Die mikroskopische Untersuchung nach 24 h Kultivierung in Gegenwart von HAP ergab keine offensichtlichen Veränderungen im Vergleich zu der Kultivierung in Abwesenheit von HAP (Aufnahmen nicht gezeigt). Nach 48 h Kultivierung hingegen konnten morphologische Veränderungen sowie Unterschiede in der Konfluenz beobachtet werden. In Abb. 4.23 sind repräsentativ die Aufnahmen der Kultivierungen der mit non-targeting siRNA transfizierten Zellen und der Zellen mit einem mARC-Doppelknockdown dargestellt. In Abwesenheit von HAP war jeweils ein dichter gleichmäßiger Zellrasen mit einem engen Zellverbund zu beobachten. Erfolgt die Kultivierung in Anwesenheit von HAP, schienen die Zellen eine eher gestrecktere Gestalt anzunehmen. Auffällig ist, dass bei einer Kultivierung mit 0,1 mM HAP in allen Ansätzen vermehrt kugelförmige, tote Zellen zu beobachten waren. Zellen mit mARC2-Knockdown und mit mARC-

Doppelknockdown zeigten in Gegenwart von HAP nach 48 h eine leicht verminderte Konfluenz im Vergleich zu den Negativkontroll-Zellen und Zellen mit mARC1-Knockdown. Zum Vergleich sind in Abb. 4.24 Aufnahmen der zur Positivkontrolle mit Etoposid behandelten Zellen abgebildet.

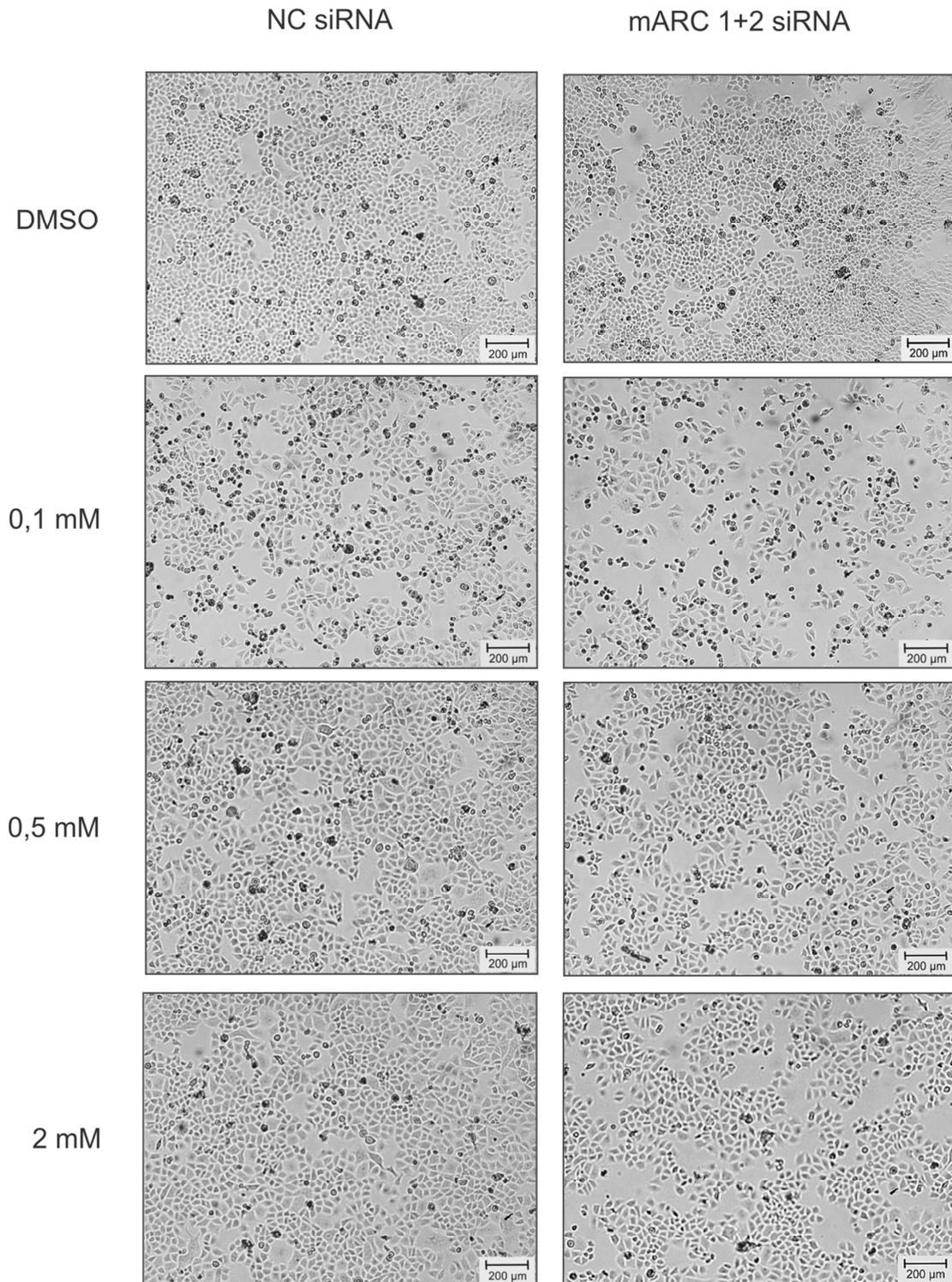


Abb. 4.23: Mikroskopische Aufnahmen von HeLa Zellen nach 48 h HAP-Behandlung. HeLa Zellen wurden wie in 3.1.9 beschrieben mit ansteigenden Konzentrationen an HAP-haltigem Kulturmedium versetzt. Nach 48 h erfolgte die mikroskopische Betrachtung (10-fache Vergrößerung). Dargestellt sind beispielhaft die Zellen, die mit non-targeting siRNA (NC siRNA) oder mit mARC1 und mARC2 siRNA transfiziert worden sind.

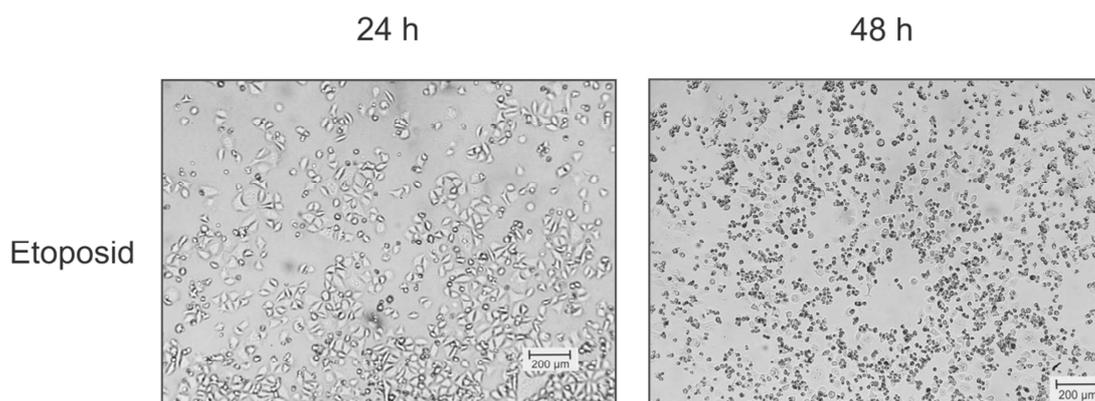


Abb. 4.24: Mikroskopische Aufnahmen von HeLa Zellen nach Etoposid Behandlung. HeLa Zellen wurden zur Positivkontrolle in Gegenwart von 100 µM Etoposid kultiviert. Nach 24 h und 48 h erfolgte die mikroskopische Betrachtung (10-fache Vergrößerung).

4.6.1.2.1 Hoechst-Färbung

Ein charakteristisches Merkmal des apoptotischen Zelltods ist die Kondensation des nukleären Chromatins.⁽¹³³⁾ Dabei geht das Chromatin von einem heterogenen, genetisch aktiven Netzwerk in eine hochkondensierte Form über, die schließlich zur Fragmentierung und zur Ausbildung kleiner kugelförmiger, kernrandständiger Aggregate führt. Dabei lassen sich die morphologischen Veränderungen der Chromatinkondensation in drei Phasen einteilen. Zunächst kommt es zu einer ringförmigen Kondensation, die in eine perlenkettenartige Kondensation und Schrumpfen des Zellkerns übergeht und schließlich in der dritten Phase zum Kollaps des Nukleus führt.⁽¹³⁴⁾ Der membranpermeable Bisbenzimid Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 bindet an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und kann so spezifisch Zellkerne anfärben.⁽¹³⁵⁾ Kondensiertes Chromatin wird heller angefärbt und kann mit Hilfe der Hoechst-Färbung als Merkmal für ablaufende Apoptose sichtbar gemacht werden.

Nach 48 h Kultivierung in Gegenwart von 2 mM HAP waren nach Anfärbung der Nuklei mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst insbesondere für Zellen mit mARC2- und mARC-Doppelknockdown für Apoptose typische morphologische Veränderungen durch Chromatinkondensation zu erkennen (Abb. 4.25).

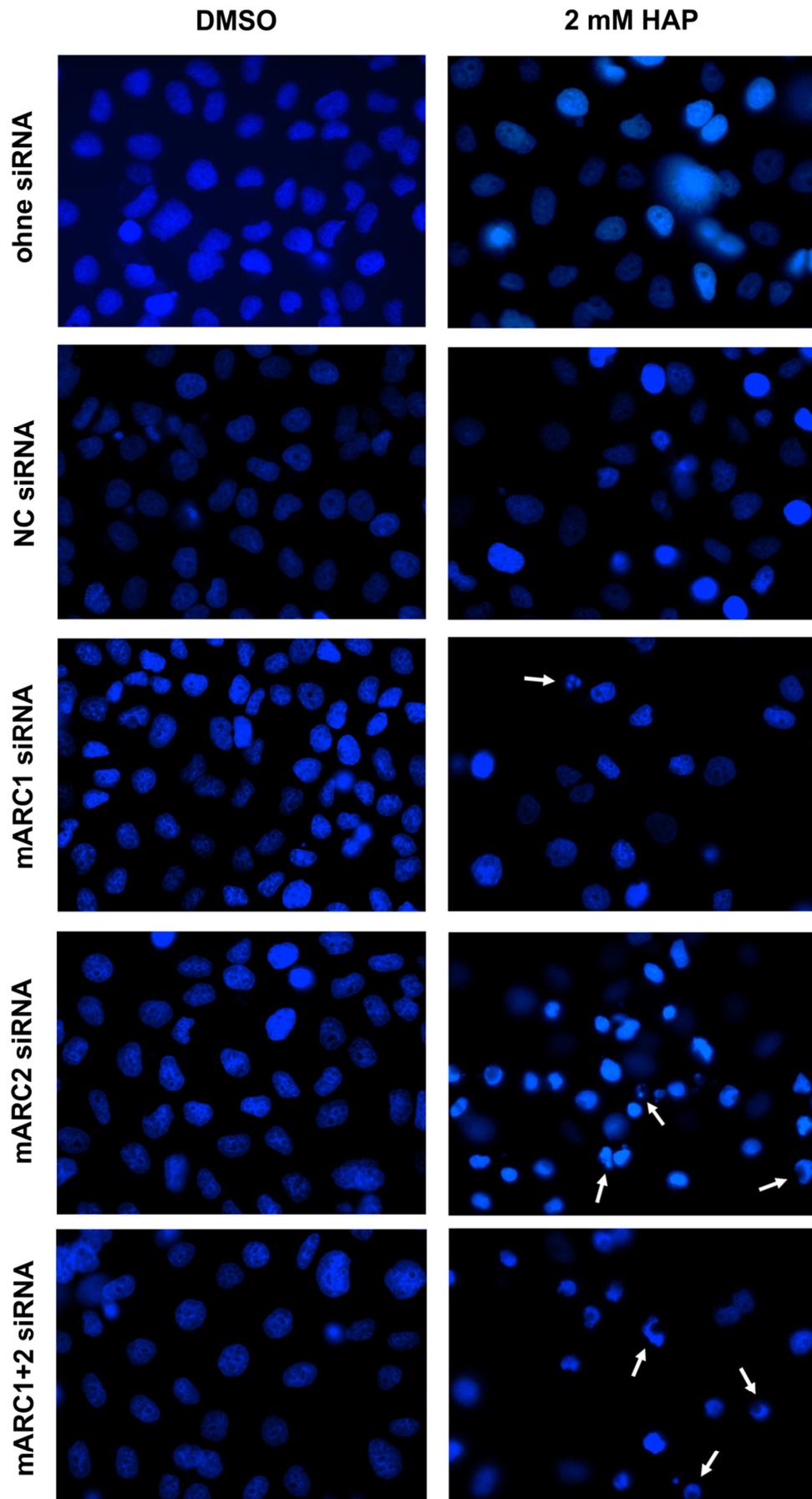


Abb. 4.25: Hoechst-Färbung der Zellkerne. Die Färbung und Detektion erfolgte wie in 3.1.10.3 beschrieben. Dargestellt sind Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung. Beispielhaft sind einige Zellkerne mit deutlicher Chromatinkondensation mit weißen Pfeilen markiert

4.6.1.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der Annexin V-PE/7-AAD-Färbung

Nach 24 h und 48 h erfolgte die Anfärbung der Zellen mit dem Apoptose-Fluoreszenzfarbstoff Annexin V-PE und dem Avital-Farbstoff 7-AAD und anschließend die durchflusszytometrische Analyse.

Die Durchflusszytometrie beruht auf einer simultanen hydrodynamischen Fokussierung einzelner Partikel (z.B. Zellen) in einem Flüssigkeitsstrahl, der mit Hilfe einer schmalen Düse erzeugt wird. Gemessen werden die optischen Signale wenn der Flüssigkeitsstrahl einen Laserstrahl passiert. Das optische System erlaubt es dann entstehendes Streulicht oder Fluoreszenzlicht mit Hilfe von geeigneten optischen Filtern und Detektoren zu quantifizieren. So können in einer sehr kurzen Zeit von einer großen Anzahl von Zellen Informationen über die Größe (Vorwärtsstreulicht (FS)) und Granularität (Seitwärtsstreulicht (SS)) gewonnen werden oder mittels Markierung oder Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen beliebige zelluläre Funktionen untersucht werden.

Bei der Annexin V Färbung wird sich zunutze gemacht, dass früh-apoptotische Zellen ihre Plasmamembran-Asymmetrie verlieren. Dabei wird das Membranlipid Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran in die Außenseite transloziert, so dass dieses nun der extrazellulären Umgebung exponiert ist. Makrophagen erkennen die apoptotische Zelle über das Phosphatidylserin an der Membranoberfläche und beseitigen diese gezielt, ohne das umliegende Gewebe in Mitleidenschaft zu ziehen.⁽¹³⁶⁾ Annexin V hat die Fähigkeit Ca^{2+} -abhängig mit hoher Affinität an Phosphatidylserin zu binden. Wird Annexin V mit einem Fluorochrom wie z.B. PE markiert, besteht die Möglichkeit früh-apoptotische Zellen zu detektieren. Der DNA-interkalierende Avitalfarbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) kann in diesem frühen Stadium der Apoptose die Plasmamembran nicht überwinden. Schreitet der Apoptoseprozess aber voran, und wird die Zelle nicht von Makrophagen beseitigt, führt das im späteren Stadium zum Verlust der Membranintegrität. 7-AAD kann in die Zelle permeieren und diese anfärben. Durch eine Doppelfärbung der Zellen und Analyse mittels Durchflusszytometrie kann also zwischen vitalen, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden und die Zellpopulationen quantifiziert werden (s. Abb. 4.26).

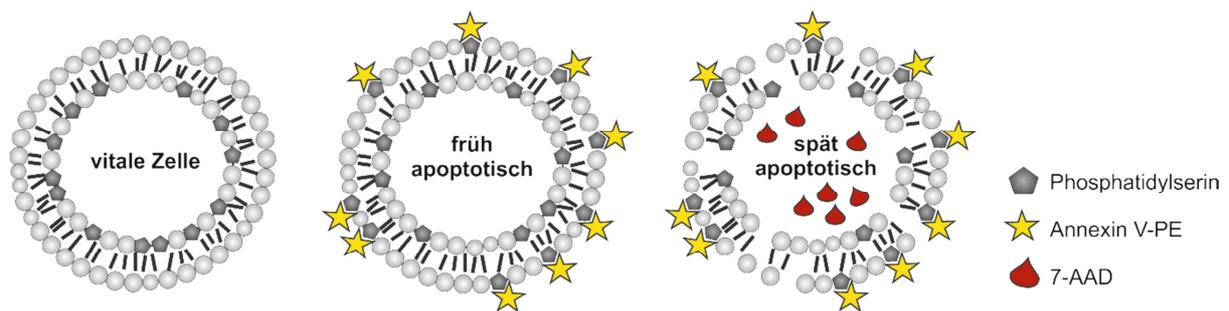


Abb. 4.26: Markierung der unterschiedlichen Zellpopulationen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Annexin V-PE und 7-AAD. In der früh-apoptotischen Phase verliert die Zellmembran ihre Asymmetrie, so dass Phosphatidylserin extrazellulär exponiert vorliegt und Annexin V an die Zelle binden kann. Spät-apoptotische und nekrotische Zellen werden aufgrund des Verlustes der Membranintegrität durchlässig für 7-AAD, so dass dieser Farbstoff im Nucleus an die DNA binden kann.

Repräsentativ sind in Abb. 4.27 die Dotplots der Analysen von Zellen, die mit non-targeting siRNA und mARC2 siRNA transfiziert und 48 h in Gegenwart von 2 mM HAP oder 1 % DMSO kultiviert worden sind, dargestellt. Zum Vergleich ist die Analyse der Zellen gezeigt, die 24 h bzw. 48 h mit Etoposid als Positivkontrolle behandelt worden sind. Dotplots aller anderen Analysen sind dem Anhang zu entnehmen (Anhang Abb. I und Abb. III). Zur Ermittlung des apoptotischen Anteils der Zellen wurden Annexin V-PE positive Zellen (früh-apoptotische und spät-apoptotische Zellen) quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.28 A (24 h HAP-Behandlung) und Abb. 4.28 B (48 h HAP-Behandlung) zusammengefasst. Nach 24 h Kultivierung in Gegenwart von HAP konnte insgesamt nur ein sehr geringer Effekt auf die Zellviabilität beobachtet werden. Nach 48 h unter HAP Einfluss wurden allerdings wesentliche Unterschiede sichtbar. Von HeLa Zellen mit mARC2- oder mARC-Doppelknockdown, die 2 mM HAP ausgesetzt waren, waren nach 24 h 21 % (vs. 18 % in der DMSO-Kontrolle) bzw. 20 % (vs. 14 % in der DMSO-Kontrolle) apoptotisch. Nach 48 h war der apoptotische Anteil dieser Zellen enorm gesteigert. 53 % (DMSO-Kontrolle 19 %) bzw. 47 % (15 % DMSO-Kontrolle) waren einem apoptotischen Zelltod unterlaufen. In HeLa Zellen, die untransfiziert waren, mit non-targeting siRNA transfiziert wurden und in Zellen mit mARC1-Knockdown wurden deutlich geringere Effekte durch 2 mM HAP ausgelöst. Nach 24 h waren 9 % (DMSO-Kontrolle 6 %), 14 % (DMSO-Kontrolle 12 %) bzw. 9 % (DMSO-Kontrolle 8 %) in Apoptose gegangen. Auch nach 48 h konnte mit 19 % (DMSO-Kontrolle 15 %), 19 % (DMSO-Kontrolle 11 %) bzw. 22 % (DMSO-Kontrolle 13 %) nur eine leichte Steigerung des apoptotischen Anteils festgestellt werden. Der Anteil an apoptotischen

Zellen nach mARC2- oder mARC-Doppelknockdown ist demzufolge nach 48 h unter 2 mM HAP Einfluss signifikant um mehr als das zweifache gegenüber den Negativkontrollzellen gesteigert. Der mARC2-Knockdown bzw. der mARC-Doppelknockdown, aber nicht der alleinige mARC1-Knockdown, führten zu einer gesteigerten Sensibilität der HeLa Zellen gegenüber HAP. Dabei entspricht der Apoptosegrad der Zellen mit mARC2 bzw. mit mARC-Doppelknockdown nach 48 h HAP-Behandlung in etwa dem der Zellen die zur Positivkontrolle 24 h mit Etoposid behandelt worden sind. Auch die Plots der durchflusszytometrischen Analyse ähneln sich stark. Die HAP bzw. Etoposid induzierte Apoptose ist deutlich im Fluoreszenz-Dotplot durch eine Zunahme der Events mit einer hohen Annexin V-PE Fluoreszenz zu verfolgen. Auch im Streulicht-Dotplot wird die ablaufende Apoptose sichtbar. Während in der DMSO-Kontrolle eine einheitlich gleichmäßige Population zu sehen ist, erscheint nach HAP- und Etoposid-Behandlung im Plot eine weitere Population mit verringertem Vorwärtsstreulicht (FS) und erhöhtem Seitwärtsstreulicht (SS) (Abb. 4.27 und Anhang Abb. II und Abb. IV). Diese Veränderungen des Streulichtes bei der durchflusszytometrischen Vermessung werden typischer Weise durch Apoptose verursacht, bedingt durch das damit einhergehende Zellschrumpfen und der Bildung von apoptotischen Vesikeln in der Zelle.⁽¹³⁷⁾ Die Unterschiede im apoptotischen Anteil zwischen den Zellen mit mARC2 und mARC-Doppelknockdown und den Kontrollzellen lassen sich dosisabhängig steigern. Auffällig war allerdings, dass wie bereits auf den mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen, alle Zellen, die 0,1 mM HAP ausgesetzt waren, grundsätzlich eine erniedrigte Zellviabilität aufwiesen.

Quantitative Auswertungen der viablen Populationen und die Anteile der früh-apoptotischen sowie spät-apoptotischen Zellen entsprechen den beschriebenen Beobachtungen und sind zur genaueren Betrachtung dem Anhang zu entnehmen (Anhang Abb. V-X). Alle durchflusszytometrisch erhobenen Daten sind in Tab. I und Tab. II im Anhang zusammengefasst.

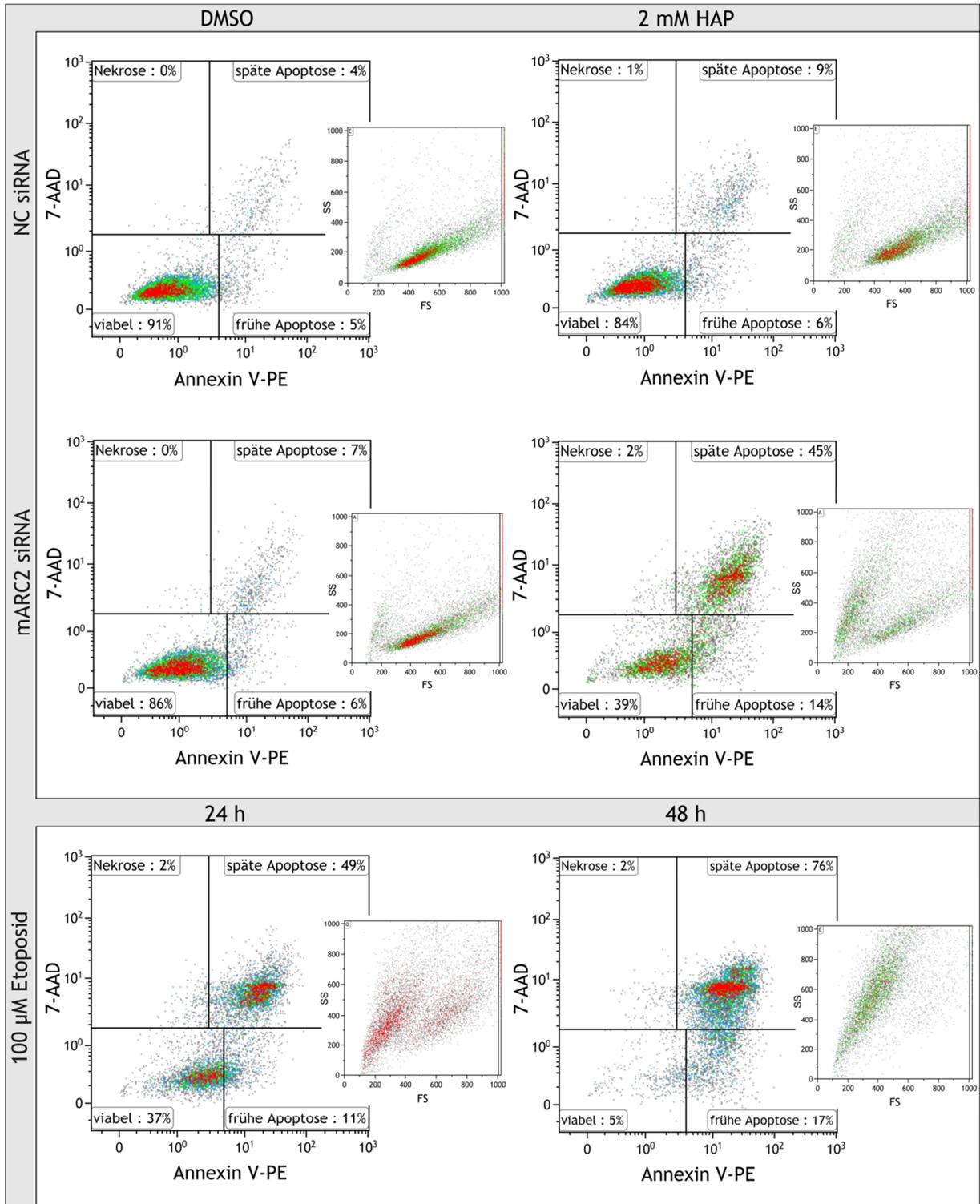


Abb. 4.27: Durchflusszytometrische Analyse nach Annexin V-PE/7-AAD-Färbung. HeLa Zellen wurden wie in 3.1.9 beschrieben mit HAP-haltigem Kulturmedium behandelt und mit der in 3.1.10.1 beschriebenen Methode nach Annexin V-PE/7-AAD-Färbung mittels Durchflusszytometrie vermessen. Repräsentativ dargestellt ist jeweils der Dotplot der Annexin V-PE vs. 7-AAD Fluoreszenz und der Dotplot des Vorwärts- (FS) vs. Seitwärtsstreulichts (SS) von Zellen, die mit non-targeting siRNA (NC siRNA) und mARC2 siRNA transfiziert und 48 h mit 2 mM HAP oder 1 % DMSO behandelt worden sind. Zum Vergleich ist die Analyse der Zellen gezeigt, die 24 h bzw. 48 h mit 100 μ M Etoposid als Positivkontrolle behandelt worden sind. Viable Zellen: Annexin V-PE/7-AAD negativ; früh-apoptotische Zellen: Annexin V-PE positiv/7-AAD negativ; spät-apoptotische Zellen: Annexin V-PE/7-AAD positiv, primär nekrotische Zellen: Annexin V-PE negativ/7-AAD positiv.

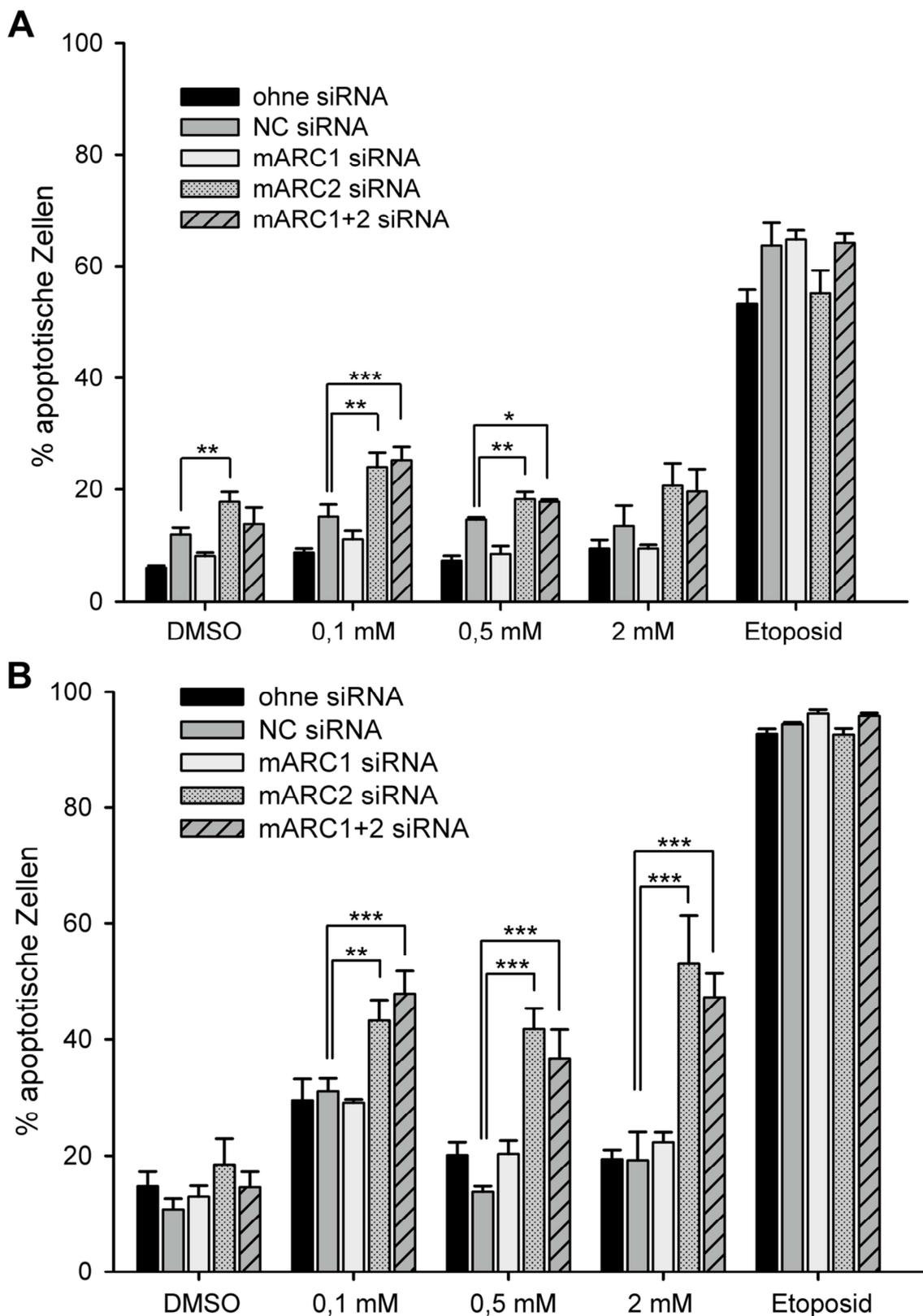


Abb. 4.28: HAP-induzierte Apoptose in HeLa. HeLa Zellen wurden wie in 3.1.9 beschrieben mit HAP-haltigem Kulturmedium versetzt und die induzierte Apoptose nach 24 h oder 48 h mittels Annexin V-PE/7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. HAP-Konzentrationen im Medium betragen 0,1 mM, 0,5 mM oder 2 mM. Zur Positivkontrolle wurden die Zellen 24 h oder 48 h mit 100 μ M Etoposid behandelt. Die Zellen zur Negativkontrolle wurden mit DMSO-haltigem Medium (1 %) ohne HAP versetzt. Zur Quantifizierung des apoptotischen Anteils wurden früh-apoptotische und spät-apoptotische Zellen (Zellen mit hoher Annexin V-PE-Färbung) zusammengefasst. (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. **(A)** 24 h Kultivierung **(B)** 48 h Kultivierung

4.6.1.2.3 Detektion von PARP-Spaltprodukten

Als weiteren Nachweis der HAP-induzierten Apoptose wurde die Caspase-vermittelte PARP-Spaltung analysiert.

PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerasen) katalysieren die posttranslationale Poly-ADP-Ribosylierungen von Proteinen und können so Proteinfunktionen modifizieren. Dabei werden ADP-Ribose Einheiten von NAD^+ auf die Zielproteine übertragen und zu langen ADP-Ribose-Polymeren verbunden.⁽¹³⁸⁾ PARP-1 ist über diese Reaktion an der DNA-Reparatur beteiligt. Ausgelöst durch DNA-Strangbrüche katalysiert es die Poly-ADP-Ribosylierung von Chromatinproteinen wie z.B. verschiedenen Histonen. Dies führt zum einen zur Relaxation der Chromatinstruktur, so dass der Zugang zur DNA erleichtert wird, zum anderen vermittelt die Poly-ADP-Ribosylierung direkt die Interaktion mit DNA-Reparaturenzymen.^(139, 140) Primäre Aufgabe von PARP-1 ist es also DNA-Schäden zu entdecken und zu beseitigen. Extrem ausgedehnte DNA-Schäden einer Zelle und darauffolgende PARP-1 Hyperaktivierung führen allerdings zu übermäßigem NAD^+ -Verbrauch. Schnell ist der ATP-Pool der Zelle erschöpft, was zwangsläufig zu einem nekrotischen Zelltod führt. Um diesen Vorgang zu verhindern, spalten Caspasen (vor allem Caspase 3) während der Apoptose PARP-1 in zwei spezifische Fragmente. Dadurch wird das Enzym in seiner Fähigkeit inaktiviert DNA-Strangbrüche zu erkennen.⁽¹³⁸⁾ Das Auftreten des spezifischen 89 kDa PARP-Fragments in der Zelle gilt daher als charakteristisches Merkmal für Apoptose.

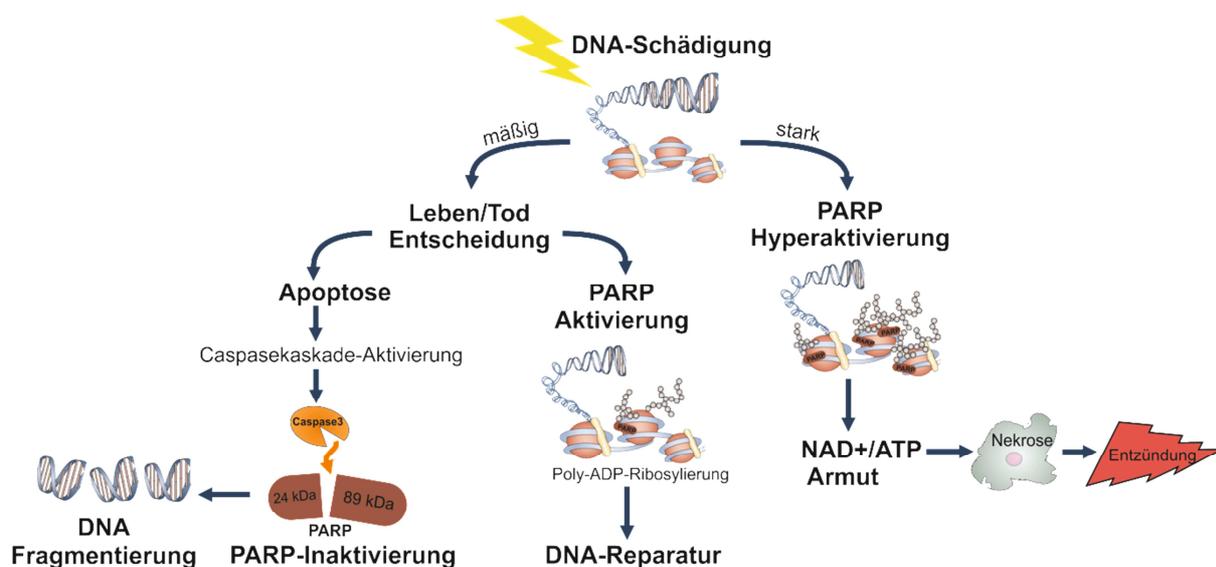


Abb. 4.29: PARP-1 in der DNA-Reparatur. Die Intensität der DNA-Schäden bestimmt das zelluläre Schicksal: Zellüberleben mit der PARP-vermittelten DNA-Reparatur, Apoptose mit Caspase-vermittelter PARP-Spaltung oder Nekrose ausgelöst durch PARP-Hyperaktivierung und die daraus resultierende Erschöpfung des NAD^+ /ATP-Pools.

Für die Untersuchung wurden die in Gegenwart von HAP kultivierten Zellen nach 24 h und 48 h lysiert und Western Blot Analysen zur Detektion des Spaltproduktes durchgeführt (vgl. 3.1.10.2). Nach 24 h konnten deutliche PARP-Spaltprodukte in den mit Etoposid als Positivkontrolle behandelten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.30). Im Vergleich dazu wurde in den Negativkontrollzellen und den mit HAP behandelten Zellen nur sehr wenig Spaltprodukt detektiert und es ließen sich keine Unterschiede erkennen. Nach 48 h war in der Positivkontrolle aufgrund des schon sehr weit vorangeschrittenen Zelltods nur noch gespaltenes und kaum full-length PARP detektierbar. Auch das Kontroll-Protein GAPDH war nur noch schwer nachweisbar. Untransfizierte und Zellen, die mit non-targeting oder mARC1 siRNA transfiziert wurden, und 48 h in Gegenwart von HAP kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ab einer Konzentration von 2 mM PARP-Spaltung. Bei niedrigeren HAP-Konzentrationen konnte in diesen Zellen keine erhöhte PARP-Spaltung detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit mARC2-Knockdown und besonders die Zellen mit einem mARC-Doppelknockdown schon ab Konzentrationen von 0,1 mM HAP im Kulturmedium deutliche erhöhte Level an PARP-Spaltprodukt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse unterstützend, zeigt ebenso die Caspase-vermittelte PARP-Spaltung, dass HeLa Zellen mit mARC2 bzw. mARC-Doppelknockdown, aber nicht mit alleinigem mARC1-Knockdown, eine erhöhte HAP-Sensibilität aufweisen.

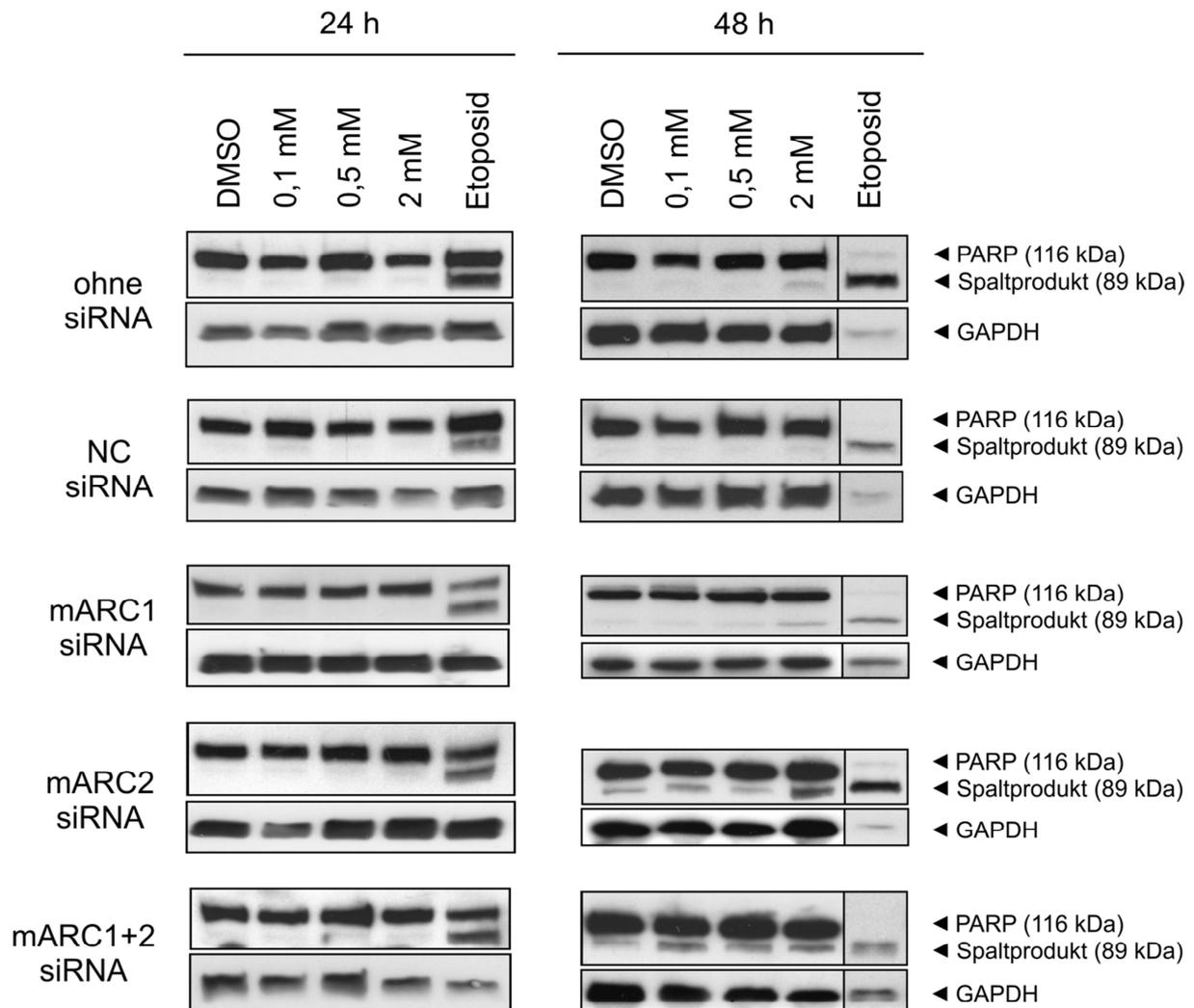


Abb. 4.30: Detektion von PARP-Spaltprodukten nach Kultivierung von HeLa in Gegenwart von HAP. HeLa Zellen wurden wie in 3.1.9 beschrieben mit HAP-haltigem Kulturmedium versetzt und die induzierte Apoptose nach 24 h und 48 h mittels Detektion von PARP-Spaltprodukten ermittelt. HAP-Konzentrationen im Medium betragen 0,1 mM, 0,5 mM oder 2 mM. Zur Positivkontrolle wurden die Zellen mit 100 μ M Etoposid behandelt. Die Zellen zur Negativkontrolle wurden mit DMSO-haltigem Medium (1 %) ohne HAP versetzt. Zellysate wurden nach 24 h bzw. 48 h gewonnen und mittels Western Blot Analyse unter Verwendung von anti-PARP und anti-GAPDH (Ladekontrolle) Antikörper untersucht.

4.6.2 Detoxifizierung von 6-*N*-Hydroxyadenosin

Die reduktive Umsetzung von HAPR zu Adenosin konnte durch das *in vitro* rekonstituierte rekombinante *N*-reduktive Enzymsystem in vorherigen Studien belegt werden.⁽⁷⁰⁾ Ebenso sollte nun die *N*-Reduktion von HAPR im HEK-293 Zellmetabolismus untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen wie in 3.1.8 beschrieben mit substrathaltigem Medium unter Variation der Zeit und Substratkonzentration inkubiert. Im Gegensatz zum rekombinanten System konnte überraschender Weise im Zellkultursystem keine Umsetzung zu Adenosin gemessen werden. Bei der Analyse des Zellkulturüberstandes per HPLC konnte allerdings die Entstehung eines anderen Produktes beobachtet werden (Abb. 4.31). Nach massenspektroskopischer Untersuchung der Überstände und Abgleich mit Reinsubstanz mittels HPLC-UV konnte das entstandene Produkt als Inosin identifiziert werden. Wie der Abb. 4.32 zu entnehmen ist, wird HAPR sehr effektiv und im hohen Maße zu Inosin umgesetzt. Über den betrachteten Zeitraum steigt die Inosinkonzentration linear an und die Umsetzung folgt einer Michealis-Menten-Kinetik. Das System ist ab ca. 2 mM Substrat gesättigt.

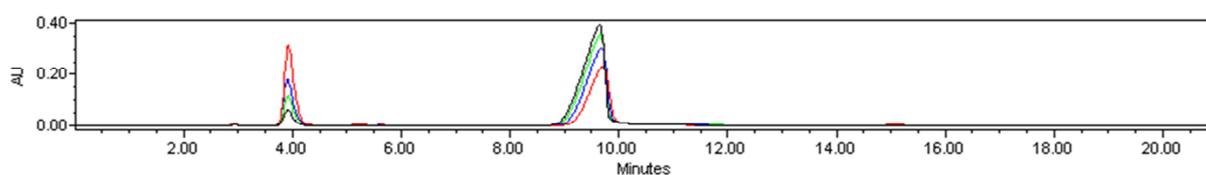


Abb. 4.31: Overlay der HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen *N*-Hydroxyadenosin (HAPR) Umsetzung durch HEK-293. Anders als erwartet entsteht nicht das Reduktionsprodukt Adenosin (17,2 min) sondern große Mengen an Inosin (4 min). Schwarzes Chromatogramm = 15 min Inkubation, grün = 60 min, blau = 120 min, rot = 240 min.

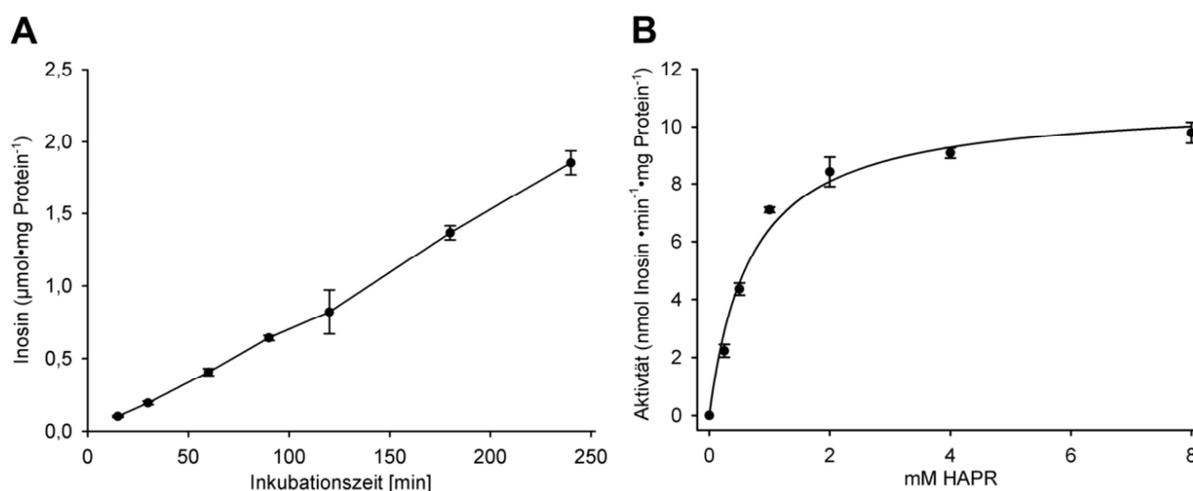


Abb. 4.32: Charakterisierung der *N*-Hydroxyadenosin (HAPR) Deshydroxylaminierung zu Inosin in HEK-293. Die Inkubationen erfolgten wie unter 3.1.8 beschrieben. Inkubationszeiten und HAPR-Konzentrationen wurden variiert ($n=3$). **(A)** Die Zeitabhängigkeit wurde mit 4 mM HAPR durchgeführt. **(B)** Bei der Substratabhängigkeit betrug die Inkubationszeit 180 min.

Literaturrecherche ergab, dass Adenosin im Organismus eine sehr kurze Halbwertszeit hat und zügig von der Adenosindesaminase (ADA) zu Inosin umgesetzt wird.⁽¹⁴¹⁾ Daher wurde untersucht, ob im Zellmetabolismus zunächst eine mARC-abhängige *N*-Reduktion von HAPR und eine anschließende Desaminierung zu Inosin durch ADA stattfindet. In Folge dessen wäre Adenosin als Intermediat möglicherweise nicht analysierbar. Allerdings wird HAPR in der Literatur auch als direktes Substrat von ADA diskutiert.^(142, 143) Um die Frage zu klären, inwieweit die Detoxifizierung von HAPR im Zellmetabolismus mARC-abhängig verläuft, wurden verschiedene Untersuchungen zu den einzelnen möglichen Umsetzungsrouten durchgeführt (vgl. Abb. 4.33). Ob die Deshydroxylaminierung über die mARC-abhängige *N*-Reduktion verläuft, wurde über einen Knockdown in HEK-293 untersucht. Des Weiteren wurde eine Beteiligung von ADA über die Inhibition des Enzyms in HEK-293 mittels Dipyridamol getestet. Untersuchungen mit humaner rekombinanter ADA sollten Aufschluss darüber liefern, ob HAPR ein direktes Substrat darstellen kann.

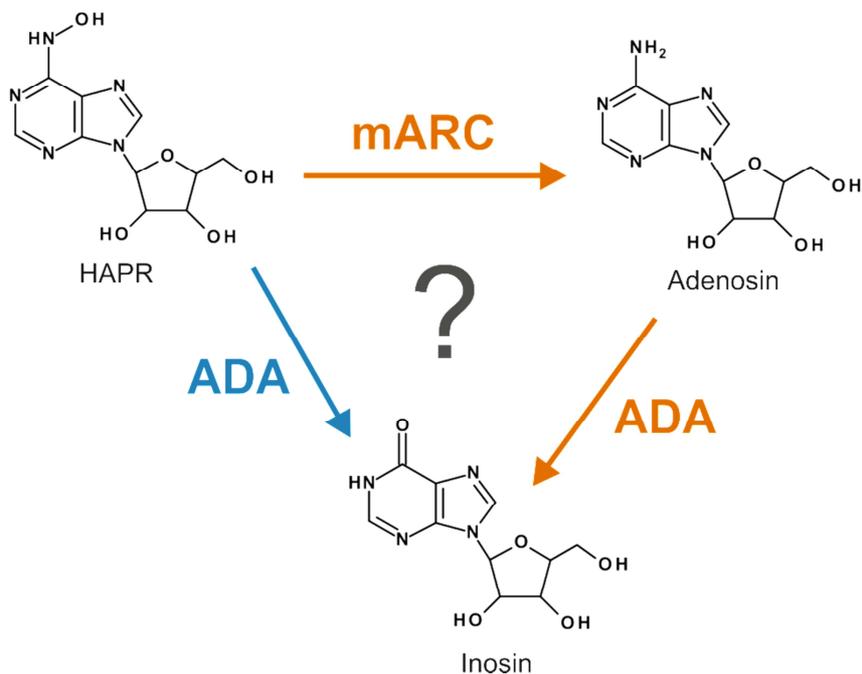


Abb. 4.33: Mögliche Metabolisierungswege von *N*-Hydroxyadenosin (HAPR) zu Inosin im Zellstoffwechsel. Denkbar ist eine direkt über Adenosindesaminase (ADA) katalysierte Deshydroxylaminierung von HAPR (blau) oder eine vorherige *N*-Reduktion durch das mARC-Enzymsystem und anschließende Desaminierung durch ADA (orange).

Die HAPR Umsetzung zu Inosin durch HEK-293 nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung von mARC1 ist in Abb. 4.34 dargestellt. Auf die Transfektion von mARC2 siRNA wurde verzichtet, da in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, dass mARC2 in HEK-293 keinen signifikanten Einfluss auf die *N*-Reduktion besitzt (vgl. Abb. 4.6). Die Umsetzungsrate zu Inosin sank nach dem Knockdown von mARC1 auf ca. 65 % im Vergleich zur non-targeting Kontrolle.

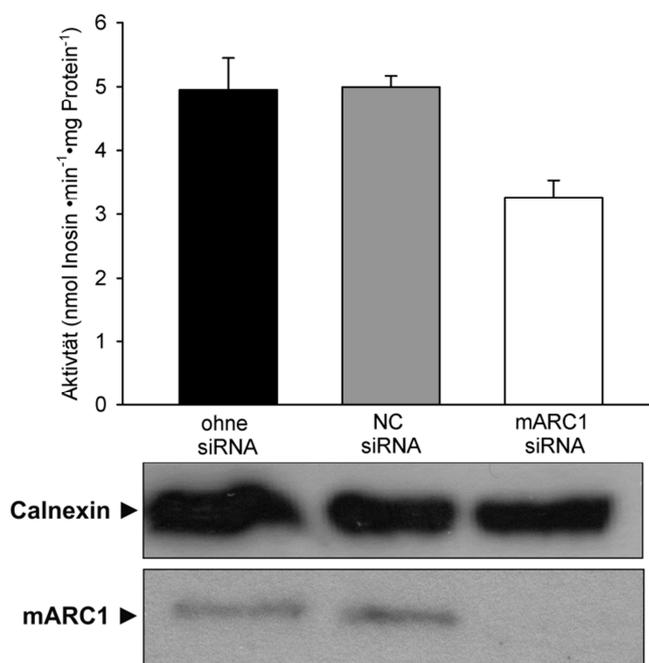


Abb. 4.34: *N*-Hydroxyadenosin (HAPR) Deshydroxylaminierung nach mARC1-Knockdown in HEK-293. Mittels reverser Transfektion wurden die Zellen mit 10 nM mARC1 oder non-targeting siRNA (NC) transfiziert. Die Inkubation erfolgte wie unter 3.1.8 beschrieben an Tag 4 nach Transfektion. Eingesetzt wurde 4 mM HAPR-haltiges Inkubationsmedium und inkubiert wurde über 120 min. Die Herunterregulierung von mARC1 wurde mittels Western Blot unter Verwendung von anti-mARC1 und anti-Calnexin (Ladekontrolle) Antikörper verifiziert.

In Abb. 4.35 A ist die Bildung von Inosin aus HAPR oder aus Adenosin durch HEK-293 Zellen nach Inhibition der Adenosindesaminase mittels Dipyridamol dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Substrat Adenosin generell besser zu Inosin umgesetzt wird als HAPR. Ohne Zusatz des Hemmstoffes Dipyridamol beträgt die Umsetzungsrate von Adenosin zu Inosin $4,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ während sie bei HAPR als Substrat bei nur $2,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ liegt. Bei gleichzeitiger Zugabe von Dipyridamol sinken die Umsetzungsraten beider Substrate enorm um 90-95 %. Parallel wurde bei der Inkubation mit HAPR die Adenosinentstehung beobachtet. Wie aus Abb. 4.35 B hervorgeht, findet bei gleichzeitiger Hemmung der Adenosindesaminase mit Dipyridamol eine Metabolisierung zu Adenosin statt, die sich simultan mit der Dipyridamolkonzentration steigern lässt. Die Auswirkung der Dipyridamolzugabe auf das *N*-reduktiven System wurde anhand der Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim überprüft. Wie in Abb. 4.35 C zu sehen ist, wird die *N*-reduktive Aktivität nicht beeinflusst.

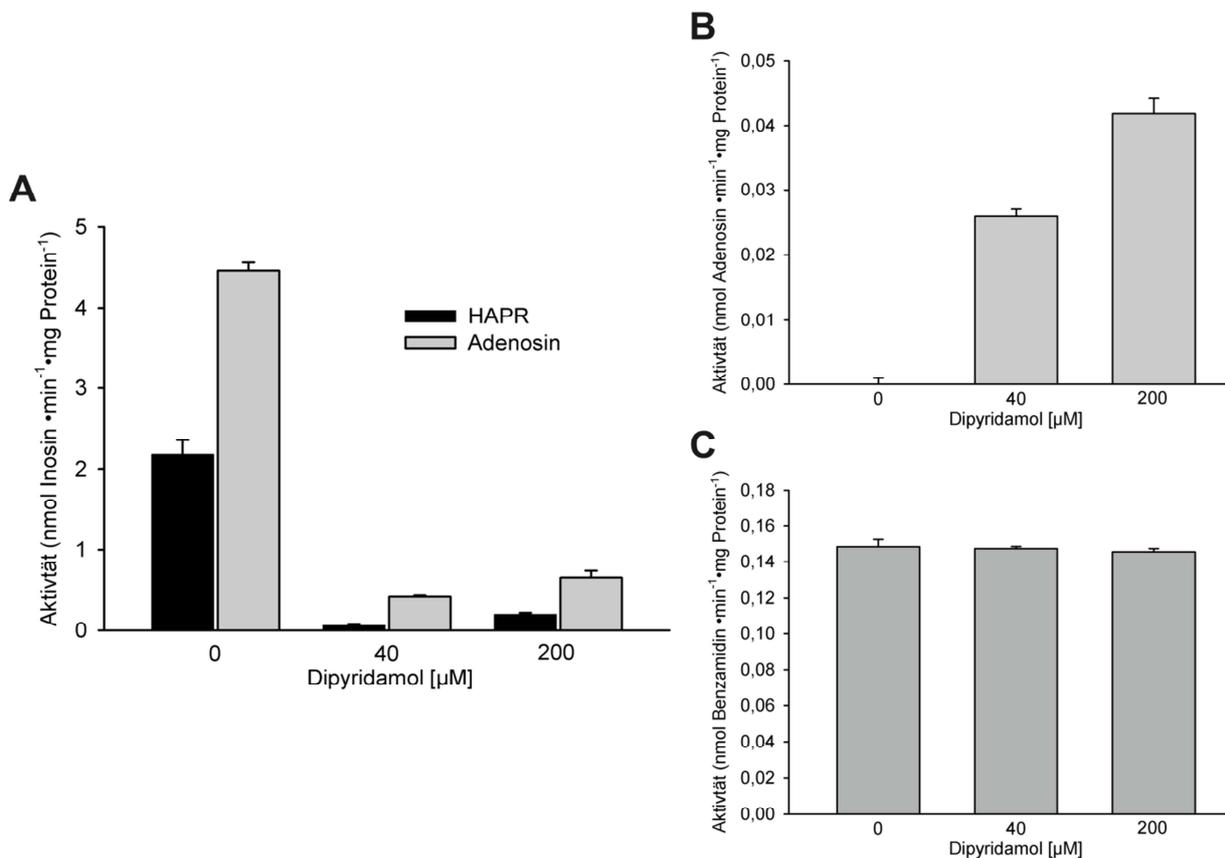


Abb. 4.35: *N*-Hydroxyadenosin (HAPR) Deshydroxylaminierung und Adenosin Desaminierung durch HEK-293 nach Hemmung der Adenosindesaminase mit Dipyridamol. Die Inkubation von HEK-293 Zellen erfolgte nach der in 3.1.8.2 beschriebenen Methode. **(A)** Metabolisierung des Substrats Adenosin (2 mM) oder HAPR (2 mM) zu Inosin bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Hemmstoff Dipyridamol. **(B)** Bildung von Adenosin bei Inkubation mit 2 mM HAPR als Substrat und Dipyridamol als Inhibitor. **(C)** Reduktion des Modells substrats Benzamidoxim (2 mM) zu Benzamidin bei gleichzeitiger Inkubation mit Dipyridamol.

In vitro kann rekombinante Adenosindesaminase die Umsetzung von Adenosin als bekanntes Substrat, aber auch die Deshydroxylaminierung von HAPR katalysieren (Abb. 4.36). Ähnlich wie in HEK-293 Zellen ist die Umsetzung von HAPR erheblich geringer als die von Adenosin. Des Weiteren wurde getestet ob die Zugabe des mARC-haltigen Enzymsystems zur rekombinanten Adenosindesaminase die Inosin-Entstehung aus HAPR über eine vorherige Reduktion zu Adenosin begünstigen kann. Eine signifikante Steigerung der Umsetzung konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen allerdings nicht gemessen werden (Abb. 4.36).

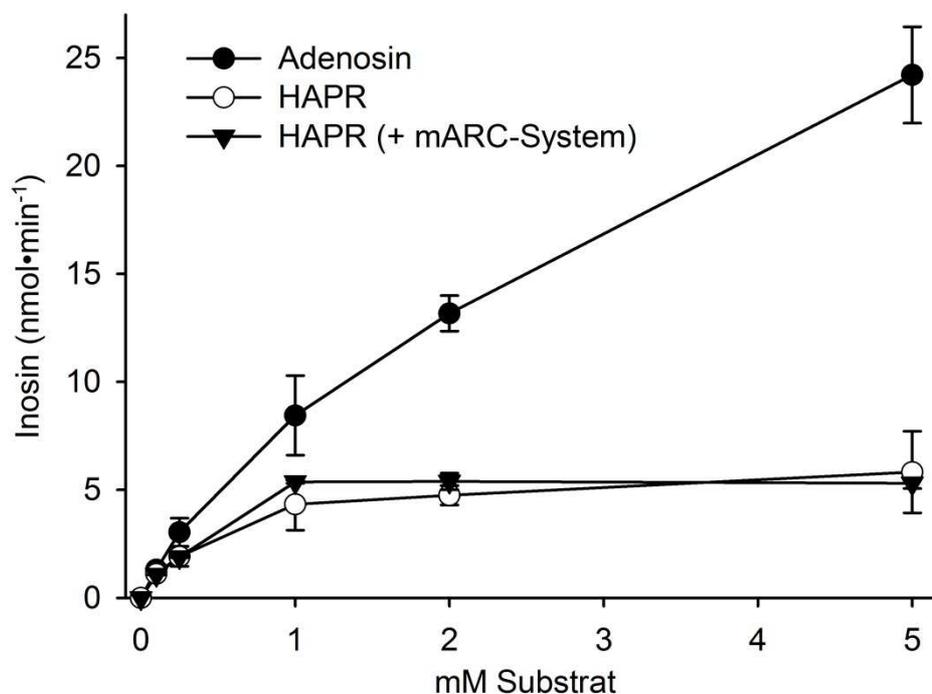


Abb. 4.36: Adenosin und *N*-Hydroxyadenosin (HAPR) Umsetzung humaner rekombinanter Adenosindesaminase. Rekombinante Adenosindesaminase wurde nach der in 3.3.3 beschriebenen Methode mit verschiedenen Konzentrationen an Adenosin oder HAPR als Substrat inkubiert und die Umsetzung zu Inosin analysiert. ● Adenosin wurde als Substrat eingesetzt. ○ HAPR wurde als Substrat eingesetzt. ▼ HAPR wurde als Substrat eingesetzt. Neben der ADA wurde auch das rekombinante mARC-Enzymsystem dem Inkubationsansatz zugefügt (75 pmol mARC1, 75 pmol CYB5B und 7,5 pmol CYB5R).

5 Diskussion

5.1 Beteiligung von mARC1/mARC2, mitochondrialem Cytochrom b₅, sowie der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase 3 am *N*-reduktiven Metabolismus humaner Zellen

5.1.1 Beteiligung von mARC1 und mARC2

Das mARC-haltige Drei-Komponenten-Enzymsystem ist für die Reduktion etlicher *N*-hydroxylierter Verbindungen verantwortlich und spielt daher im *N*-reduktiven Arzneistoffmetabolismus eine wichtige Rolle.⁽⁷⁶⁾ In vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass beide rekombinanten humanen mARC-Proteine die Fähigkeit besitzen *N*-hydroxylierte Substrate zu reduzieren, wenn sie mit den Elektronentransportproteinen CYB5 und CYB5R rekonstituiert werden. Das Weglassen einer Komponente im Inkubationsmix führt zu einem nahezu kompletten Verlust der Aktivität.^(29, 56, 71) *In vitro* interagieren beide mARC-Proteine mit den gleichen *N*-hydroxylierten Substraten.⁽⁷⁶⁾ Für alle Substrate, mit Ausnahme von *N*-Oxiden, können nur geringe Unterschiede in der spezifischen Aktivität beobachtet werden. Die Tatsache, dass alle bis jetzt analysierten Säugetier-Genome zwei *mARC*-Gene besitzen, deutet auf eine evolutionäre Notwendigkeit für jedes einzelne Protein hin. Die physiologischen Funktionen sind allerdings noch weitestgehend unbekannt und es bleibt zu zeigen, welche Unterschiede zwischen mARC1 und mARC2 *in vivo* existieren, beispielsweise im Hinblick auf gewebe-spezifische Lokalisation, subzelluläre Lokalisation oder Substratspezifität. Neben der mitochondrialen Lokalisation wurde eine peroxisomale Co-Lokalisation für mARC2 gefunden.^(80, 81) Des Weiteren beschreiben Klein *et al.* in Mitochondrien einen mittels BN-PAGE detektierbaren mARC-haltigen oligomeren Komplex, dessen Molekulargewicht weit größer ist als das des *N*-reduktiven Systems.⁽⁷⁴⁾ Daher ist es durchaus denkbar, dass mARC auch Funktionen außerhalb des beschriebenen mitochondrialen *N*-reduktiven Systems haben könnte.

Um zu untersuchen, ob beide oder nur ein mARC-Protein *in vivo* am *N*-reduktiven Stoffwechsel beteiligt ist, wurden in dieser Arbeit RNAi Studien mit humanen Zelllinien

durchgeführt. Die Untersuchungen lassen erkennen, dass in HEK-293 kaum mARC2-Protein detektiert werden kann, während die mARC1 Proteinexpression beachtlich hoch ist. Diese gefundene Tatsache unterstützend, weisen Datenbank-Recherchen darauf hin, dass sich dieser Trend auf mRNA-Ebene in der Mehrzahl der humanen Zelllinien und Geweben, die in der BioGPS-Datenbank gelistet sind, widerspiegelt (Expressionsdaten s. Anhang Abb. XI-XIV). In Übereinstimmung mit den beobachteten Expressionsleveln der jeweiligen mARC-Proteine, wird die *N*-reduktive Aktivität durch den siRNA-vermittelten mARC1-Knockdown in HEK-293 enorm vermindert, während sie vom mARC2-Knockdown unbeeinflusst bleibt (Abb. 4.5, Abb. 4.6, Abb. 4.7). Der mARC-Doppelknockdown führt zwar zu einer zusätzlich leichten aber nicht signifikanten Verminderung der Aktivität gegenüber dem alleinigen mARC1-Knockdown. Ein substratspezifischer Effekt ist unwahrscheinlich, da die Umsetzung von SMX-HA nach mARC-Knockdown ein ähnliches Resultat wie mit dem Modells substrat Benzamidoxim ergibt (Abb. 4.8). Im Gegensatz zu HEK-293 Zellen, sind die mARC1 und mARC2 Expressionslevel in ZR-75-1 nahezu gleich. Tatsächlich wird in dieser humanen Zelllinie die *N*-reduktive Aktivität durch beide, den mARC1- und den mARC2-Knockdown, vermindert, wobei der stärkste Verlust an Aktivität beobachtet werden kann, wenn beide Proteine simultan herunterreguliert werden (Abb. 4.9). Diese Knockdown Untersuchungen beweisen, dass mARC zweifellos eine essentielle Komponente des zellulären *N*-reduktiven Systems darstellt und unterstützen damit die *in vitro* im rekonstituierten System gefundenen Resultate. Ein für den Zellmetabolismus relevantes mikrosomales Zwei-Komponenten-System ohne mARC, wie es von einigen Autoren postuliert wird⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾, ist daher auszuschließen. Des Weiteren belegen diese Ergebnisse erstmals, dass mARC1 und mARC2 nicht nur *in vitro* sondern auch im Zellmetabolismus beide die Fähigkeit haben *N*-hydroxylierte Substrate zu reduzieren. Das Ausmaß der Beteiligung an der *N*-Reduktion ist dabei in hohem Maße vom Expressionslevel des jeweiligen mARC-Proteins abhängig.

Im Unterschied zu den Studien dieser Arbeit, konnten andere siRNA-vermittelte Knockdown Studien in murinen Zellen nur die Beteiligung von mARC2 an der *N*-Reduktion nachweisen.⁽⁷⁵⁾ Die widersprüchlichen Ergebnisse sind höchstwahrscheinlich der Ungleichheit der untersuchten Spezies zuzuschreiben. Im Gegensatz zu humanen Zellen und Geweben sind in der BioGPS-Datenbank für fast alle murinen Zelllinien, inklusive der von Neve *et al.*⁽⁷⁵⁾ untersuchten Zelllinie, hohe Genexpressionslevel für mARC2 und extrem niedrige Expressionslevel für mARC1 beschrieben (Expressionsdaten s. Anhang

Abb. XV und Abb. XVI). Daher ist der fehlende Einfluss von mARC1 auf die *N*-reduktive Aktivität in murinen Zellen vermutlich auf die geringe mARC1 Proteinexpression im Vergleich zur mARC2 Expression zurückzuführen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass abhängig von der Spezies für gewöhnlich eine Isoform, entweder mARC1 oder mARC2, vorrangig exprimiert wird. Somit variiert ebenso das mARC-Protein, welches vorrangig für die *N*-reduktive Metabolisierung verantwortlich ist, von Spezies zu Spezies. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass unabhängig von der untersuchten Spezies die *N*-reduktive Aktivität durchweg in der OMM angereichert ist ^(17, 22, 71, 75), aber bisher nur entweder mARC1- oder mARC2-Protein, aber nie beide Proteine der OMM zugeordnet werden konnten. So konnte etwa im Schwein und in der Ratte mARC2, aber kein mARC1 in der OMM gefunden werden ^(22, 75). Von humaner OMM wurde gezeigt, dass sie mARC1 enthält, während von mARC2 nicht berichtet wird ⁽⁷⁴⁾. Ungeklärt ist bis zum heutigen Zeitpunkt, ob die Zuordnung der Begriffe „mARC1“ und „mARC2“ in verschiedenen Spezies eindeutig korrekt ist. Die Klassifizierung erfolgt auf Basis von Sequenzalignments zum humanen Protein. Die tatsächliche Phylogenie und Orthologie müsste allerdings durch ausführliche Studien abgesichert werden. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Variation des dominanten mARC-Proteins durch eine fehlerhafte Bezeichnung der Proteine zustande kommt, oder dass eine speziesübergreifende Benennung in mARC1 und mARC2 überhaupt nicht möglich ist.

Das physiologische Motiv für die Existenz von zwei mARC-Proteinen und warum ein mARC-Protein dem anderen untergeordnet zu sein scheint, bleibt zu zeigen. Allerdings wurde berichtet, dass mARC2 in humanem Kolonkarzinom herunterreguliert ⁽⁸²⁾ und durch Glukose Behandlung in humanen Zellen hochreguliert wird ⁽⁸³⁾. Darüber hinaus stellt die humane Brustkrebszelllinie ZR-75-1 ein besonderes Beispiel für eine Zelllinie mit gleichmäßiger mARC1 und mARC2 Proteinexpression dar. Daher wäre es durchaus denkbar, dass die Expression des untergeordneten mARC-Proteins durch spezielle Umstände reguliert wird, während die Expression der jeweiligen anderen Isoform konstant bleibt, um beispielsweise Houskeeping-Funktionen zu erfüllen. Interessanter Weise stellt die Leber offensichtlich ein Organ dar, in dem diese eben beschriebene untergeordnete Expression eines mARC-Proteins laut Datenbank nicht existiert (vgl. Anhang Abb. XIII und Abb. XIV). Hier sind die Expressionslevel annähernd gleich. Möglicherweise erfüllt das ansonsten mengenmäßig untergeordnete mARC generell eine Funktion, an der in der Leber ein besonders hoher Bedarf besteht und das Protein deshalb vermehrt exprimiert wird.

5.1.2 Beteiligung von mitochondrialem Cytochrom b₅

Durch diverse Enzymreinigungstudien und Rekonstitutionsassays ist bekannt, dass das Häm-Protein CYB5 Teil des *N*-reduktiven Metabolismus ist.^(12, 21, 22, 56, 108) Es existieren zwei membrangebundene CYB5-Isoformen: Die mikrosomale (CYB5A) und die mitochondriale (CYB5B) Isoform, die von zwei verschiedenen Genen abstammen.^(87, 88) Widersprüchliche Auffassungen gibt es darüber, welche CYB5-Isoformen *in vivo* an der *N*-Reduktion beteiligt sind. Da mARC sowie auch die *N*-reduktive Aktivität in der OMM angereichert sind^(15, 17, 22, 71, 74), läge es nahe, wenn auch die mitochondriale CYB5-Isoform, also CYB5B, die physiologische Komponente des *N*-reduktiven Systems wäre. Auf der anderen Seite wird ein *N*-reduktives System in Mikrosomen postuliert, welches sich ausschließlich aus den zwei Komponenten CYB5R und dem mikrosomalen CYB5, also CYB5A, zusammensetzt.⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾ Im Rahmen dieser Arbeit wurde ermittelt, dass *in vitro* beide rekombinanten Proteine dazu in der Lage sind, das rekonstituierte Drei-Komponenten-Enzymsystem zu vervollständigen (Abb. 4.10). Da CYB5A und CYB5B hohe sequentielle und strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen^(87, 144), ist es allerdings nicht überraschend, dass die beiden *in vitro* ähnliche Interaktionen eingehen können. Um zu untersuchen, welche Isoform, oder ob evtl. beide Isoformen *in vivo* an der *N*-Reduktion beteiligt sind, wurden RNAi Experimente mit der jeweiligen Isoform durchgeführt. Die siRNA-vermittelten Knockdown Studien in humanen Zellen haben gezeigt, dass im Zellmetabolismus nur die mitochondriale Isoform Teil des *N*-reduktiven Systems ist, da der Knockdown des mitochondrialen CYB5 die Aktivität drastisch vermindert, wohingegen der Knockdown der mikrosomalen Isoform die *N*-Reduktion nicht beeinflusst (Abb. 4.11, Abb. 4.12). Die gefundenen CYB5-Knockdown Ergebnisse in humanen Zellen stimmen mit den von Neve *et al.* in murinen Zellen durchgeführten RNAi Studien überein.⁽⁷⁵⁾ Im Einklang mit den CYB5A-Knockdown Resultaten, ist auch zwischen den Wildtyp-Fraktionen und den Knockout-Fraktionen von CYB5A-Knockout-Mauslebern kein signifikanter Unterschied in der *N*-reduktiven Umsetzung zu beobachten (Abb. 4.13). Diese Ergebnisse belegen zweifellos, dass die mitochondriale, aber nicht die mikrosomale CYB5-Isoform für die *N*-Reduktion im Zellmetabolismus essentiell ist. Demzufolge stellt das mitochondriale CYB5 den physiologischen Part des mARC-haltigen Enzymsystems dar. Da CYB5B ausschließlich mit der OMM assoziiert ist^(75, 90), und das *N*-reduktive System in diesem Kompartiment angereichert ist^(15, 17, 22, 71, 74), ist die

Existenz eines für den Metabolismus relevanten mikrosomalen *N*-reduktiven Zwei-Komponenten-Systems höchst unwahrscheinlich.

Frühere *in vitro* Rekonstitutionsstudien mit humanem Apo-mARC haben bewiesen, dass die *N*-reduktive Katalyse eindeutig auf den Moco angewiesen ist.⁽⁵⁶⁾ Gleichmaßen wurde in dieser Arbeit überprüft, ob das CYB5-Häm unerlässlich für die *N*-reduktive Aktivität des Enzymsystems ist. Es wird davon ausgegangen, dass CYB5 als Elektronentransportprotein im *N*-reduktiven Enzymsystem fungiert und Elektronen von der CYB5R akzeptiert und über das Häm auf den Moco von mARC transferiert.⁽⁷⁶⁾ Allerdings konnte mittels Steady-State-Kinetik zwischen CYB5 und mARC bisher kein Elektronenfluss gemessen werden.⁽¹¹²⁾ Einige CYP450 katalysierte Reaktionen sind beschrieben, die durch Apo-CYB5 stimuliert werden können, wobei vermutet wird, dass CYB5 hierbei nicht als Elektronendonator dient, sondern Häm-unabhängige allosterische Effekte ausübt, die den produktiven Elektronentransfer zwischen CYP450-Reduktase und CYP450 erleichtern.⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾ Um zu überprüfen, ob ähnliches auch für das mARC-haltige Enzymsystem denkbar wäre, wurde die reduktive Umsetzung des humanen Enzymsystems untersucht, welches mit entweder CYB5B oder Apo-CYB5B rekonstituiert wurde (Abb. 4.15). Die Entfernung des Häms mit der 2-Butanon Methode führte zu einem nahezu kompletten Verlust der *N*-reduktiven Aktivität. Um die Funktionalität des Apo-CYB5 nach der Butanon-Behandlung nachzuweisen, wurde das Protein anschließend mittels Häm-Reinkorporation rekonstituiert. Mit dem Wiedereinfügen des Häms war das zurückgewonnene Holo-CYB5B in der Lage die *N*-reduktive Aktivität des mARC-haltigen Enzymsystems wiederherzustellen. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass parallel zum Häm-Sättigungsgrad des CYB5-Proteins auch die Fähigkeit des mARC-haltigen Systems zur *N*-Reduktion steigt (Abb. 4.16). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass CYB5B-gebundenes Häm für die Katalyse essentiell ist, und dass das CYB5B-Häm daher höchstwahrscheinlich am Elektronentransfer innerhalb des *N*-reduktiven Systems beteiligt ist.

5.1.3 Beteiligung der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase 3

Ebenso wie das CYB5 wurde dessen Reduktase, das Flavinprotein CYB5R, mittels Enzymreinigung und Studien im rekombinanten System als Teil des *N*-reduktiven Enzymsystems identifiziert.^(12, 21, 22, 56, 108)

Vier Gene (*CYB5R1*, *CYB5R2*, 3 und 4) codieren für CYB5R. CYB5R1 und CYB5R2 sind Membranproteine, deren subzellulären Lokalisationen bislang wenig beschrieben sind. CYB5R1 wurde bisher in Mitochondrien gefunden.⁽¹⁰²⁾ CYB5R4 ist ein lösliches Protein mit einer Häm-bindenden und einer FAD-bindenden Domäne, welches im Lumen des ER lokalisiert ist.⁽¹⁰³⁾ CYB5R3 ist von diesen vier Proteinen mit Abstand am besten charakterisiert und Expressionsanalysen zeigen, dass es mengenmäßig den anderen Reduktasen in humanen Geweben stark überlegen ist (Expressionsdaten s. Anhang Abb. XVII, Abb. XVIII, Abb. XIX). Aus dem *CYB5R3*-Gen entstammen zwei Isoformen. Isoform 1 ist membrangebunden und kommt in der OMM und im ER vor. Isoform 2 ist löslich und ist in den Erythrozyten lokalisiert.⁽⁸⁸⁾ CYB5R3 wurde für die früheren Untersuchungen als Komponente für das rekombinante *N*-reduktive System ausgewählt, da sie ebenso wie mARC in der OMM zu finden ist.⁽⁵⁶⁾ Um zu untersuchen, ob CYB5R3 im Zellmetabolismus die physiologisch relevante Reduktase ist, wurden Knockdown Studien in HEK-293 durchgeführt.

Bei ausreichend hoher Knockdown-Effizienz (< 15 %) war die *N*-reduktive Aktivität um etwa 50 % vermindert. Lag hingegen eine geringere Knockdown-Effizienz vor, konnte abhängig von der verbliebenen Restproteinmenge nur eine schwache bis hin zu gar keiner Reduktion der Aktivität beobachtet werden (Abb. 4.17). Demnach ist die CYB5R3 eine essentielle Komponente des *N*-reduktiven Enzymsystems im Zellmetabolismus, wobei allerdings schon geringe Proteinlevel für die Katalyse auszureichen scheinen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den *in vitro* Stöchiometrie-Untersuchungen im rekombinanten System. Hier wurde gezeigt, dass ein Zehntel bis ein Hundertstel an rekombinanter CYB5R im Verhältnis zu mARC und CYB5 zur Rekonstitution des *N*-reduktiven Systems für eine effektive Aktivität ausreichend ist.⁽¹⁴⁵⁾ Neve *et al.* konnten in murinen Zellen durch einen CYB5R3-Knockdown eine leichte aber keine signifikante Verminderung der *N*-reduktiven Aktivität feststellen und schlussfolgerten daraus, dass diese nicht an der *N*-Reduktion beteiligt ist.⁽⁷⁵⁾ Durch den Einsatz eines siRNA-Pools aus 4 Oligonukleotiden konnte dort allerdings nur ein Knockdown auf 25 % erzielt werden. Ein Vergleich unter den siRNA-Oligonukleotiden ist aufgrund der Verwendung des Pools

leider nicht möglich. Vermutlich ist aber auch hier der fehlende Einfluss auf die *N*-reduktive Umsetzung auf die nur mäßige Knockdown-Effizienz zurückzuführen, so dass möglicherweise die verbliebene CYB5R3-Proteinmenge für die Katalyse noch ausreichend war. Untersucht wurden von Neve *et al.* außerdem die Herunterregulierungen von CYB5R1 und CYB5R2. Trotz sehr guter Knockdown-Effizienzen (< 20 % für CYB5R1 und unter der Detektionsgrenze für CYB5R2), war kein Einfluss auf die *N*-reduktive Aktivität zu beobachten.⁽⁷⁵⁾ Eine Beteiligung dieser Proteine an der *N*-Reduktion ist nicht auszuschließen, dennoch weisen die Untersuchungen von Neve *et al.* darauf hin, dass sie keine essentiellen Komponenten des murinen Systems darstellen. Vor dem Hintergrund, dass ein effizienter CYB5R3-Knockdown in humanen Zellen, die Aktivität enorm senken kann (Abb. 4.17), obwohl eine sehr geringe Menge an Reduktase für die Katalyse ausreichend wäre, ist ebenso davon auszugehen, dass CYB5R1 und 2 in humanen Zellen keine relevanten Rollen im *N*-reduktiven Metabolismus spielen.

5.2 mARC-Enzymsystem als Detoxifizierungssystem mutagener *N*-hydroxylierter Basenanaloga in humanen Zellen

Umfassende Untersuchungen haben gezeigt, dass modifizierte Nucleobasen über die Umwandlung in die entsprechenden Nucleosidtriphosphate und anschließende Inkorporierung in die DNA mutagen wirken können.^(33, 35, 46) Nicht-kanonischen Nucleobasen können beispielsweise durch oxidativen Stress, über chemische oder physikalische Einflüsse, einer disregulierten Purinbiosynthese oder durch den zellulären Metabolismus anfallen und so die Nucleotid-Pools kontaminieren.^(36, 37, 39, 45, 146, 147) Für die fehlerfreie Replikation ist es deshalb von großer Bedeutung, dass der Organismus über wirkungsvolle Reparatur Systeme verfügt, die vor dem Einbau endogener oder exogener Basenanaloga schützen.

Auch *N*-hydroxylierte Nucleobasen wie HAP oder Nucleoside wie HAPR haben sich in Bakterien, Hefen und Säugetierzellen als toxisch und mutagen erwiesen ^(43, 49, 116, 117, 148). Die Entgiftung von HAP in *E. coli* wurde bereits ausführlich untersucht, wobei drei Mechanismen im Nucleinsäure Metabolismus gefunden wurden, die den Einbau in die DNA verhindern. Der Nucleotid-Precursor-Pool wird in *E. coli* von den Molybdoenzymen Ycbx und geringfügig von auch von Yiim über die detoxifizierende Reduktion von HAP

zu Adenin dekontaminiert.⁽⁴⁷⁾ Gelingt die Detoxifizierung nicht, kann HAP über den Salvage Pathway in den Nukleotid-Pool gelangen. Als Nukleosidtriphosphat kann HAPTP allerdings an dieser Stelle wieder in das entsprechende Monophosphat gespalten werden, bevor es in die DNA eingebaut wird. Falls HAPTP dennoch in die DNA inkorporiert werden sollte, erkennt und schneidet die Endonuklease V an dieser Stelle und initiiert so die Reparatur der Läsion.⁽⁴⁵⁾

Das HAP-Entgiftungssystem im humanen Organismus wurde bisher nur wenig untersucht. Beschrieben ist, dass die ITPase mit der Spaltung von HAPTP zu seinem Monophosphat an der Entgiftung in verschiedenen humanen Zelllinien beteiligt ist. Da HAP in humanen Zelllinien DNA-Strangbrüche induziert, wird auch die Beteiligung einer Endonuklease angenommen, die HAP durch Schneiden der DNA entfernt.^(49, 50)

Als *N*-hydroxylierte Verbindung ist HAP ein mögliches Substrat für mARC, und in der Tat wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass das *in vitro* rekonstituierte rekombinante Enzymsystem dazu in der Lage ist, alle bisher getesteten *N*-hydroxylierten Nukleobasen und Nukleoside zu reduzieren.⁽¹²³⁾ Da in *E. coli* mit Ycbx ein Molybdoenzym der MOSC-Familie beschrieben ist, das an der Detoxifizierung von HAP beteiligt ist bevor es in den Nukleotid-Pool gelangt, ist es denkbar, dass analog im humanen System das mARC-haltige Enzymsystem an dieser Stelle als Detoxifizierungssystem fungieren könnte. In früheren Studien wurde allerdings auch eine Reduktion von HAP durch die cytosolische Xanthindehydrogenase beschrieben.⁽¹⁴⁹⁾ Da jedoch in neueren Untersuchungen eine deutliche Anreicherung der HAP-Reduktion in den Mitochondrien gezeigt werden konnte⁽⁷⁰⁾, und in *E. coli* die Xanthindehydrogenase nicht an der Detoxifizierung beteiligt ist^(45, 150), ist die mARC-abhängige Reduktion als mutmaßlicher Entgiftungsweg anzunehmen.

Mit Hilfe des nun etablierten siRNA-vermittelten mARC-Knockdowns (vgl. Kap. 4.3), wurde in dieser Arbeit am Beispiel von HAP und HAPR untersucht, ob die im rekombinanten System beobachtete Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Nukleobasen und Nukleosiden im Zellsystem einen relevanten Entgiftungsweg darstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass exogen zugeführtes HAP im Zellmetabolismus zu Adenin reduziert wird (Abb. 4.20). Dabei ist eine Lag-Zeit von 90 min zu beobachten. Der Transport über die Zellmembran und der Metabolismus unterliegen komplexen Mechanismen. Eine mögliche Ursache könnte daher der für Nukleobasen im Vergleich zu Nukleosiden relativ langsame und damit limitierende Transport über Nukleobasentransporter und die Erfordernis des Anflutens in der Zelle sein. Die sich der Reduktion

anschließende Metabolisierung von Adenin könnte eine weitere Verzögerung verursachen.⁽¹⁵¹⁻¹⁵⁴⁾ Da die Adenin Entstehung nach einem mARC1-Knockdown in HEK-293 Zellen drastisch abfällt, ist von einer mARC-abhängigen Reduktion auszugehen. Auf die Transfektion von mARC2 siRNA wurde verzichtet, da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass mARC2 in HEK-293 keinen signifikanten Einfluss auf die N-Reduktion besitzt (vgl. Abb. 4.21). Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Sensibilität von Zellen gegenüber HAP nach einem mARC-Knockdown erhöht. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass HEK-293 und ZR-75-1 unter den getesteten Bedingungen keine Sensibilität gegenüber HAP aufweisen. Auch Waisenstreiger *et al.* konnten schon eine Zelllinien spezifische Reaktion auf HAP feststellen, wobei man vermutet, dass HAP seine apoptotische Wirkung nur unter bestimmten zellulären Bedingungen zeigt.⁽⁴⁹⁾ Angenommen wird, dass die Variation der Größe des Nukleotid-Pools und die Unterschiede in der Zellteilungsrate in verschiedenen Zelllinien bzw. Zellarten ein Grund für das unterschiedliche Ansprechen auf Basenanaloga ist.⁽¹⁴⁶⁾ Aus diesem Grund wurden die HAP-Toxizitätsuntersuchungen nach mARC-Knockdown mit HeLa Zellen durchgeführt, für die eine HAP-induzierte Mutagenese bereits beschrieben ist.⁽⁵⁰⁾ HeLa Zellen weisen im Vergleich zu anderen humanen Zelllinien eine sehr starke mARC1 und mARC2 mRNA-Expression auf, wobei die mARC1 Expression der mARC2 Expression überlegen ist (s. Anhang Abb. XI und Abb. XII). Diese aus der Datenbank erhobenen Daten konnten mittels Western Blot auf Proteinebene nachvollzogen werden (Daten nicht gezeigt). Für die Kultivierung der HeLa Zellen in Gegenwart von 0,1 mM - 2 mM HAP wurde eine DMSO Konzentration von 1 % gewählt, da dies die von den Zellen maximale tolerierbare Konzentration bei gleichzeitig akzeptabler Löslichkeit von HAP im Kulturmedium war. Nach 24 h und 48 h Inkubation unter Einfluss von HAP wurde mittels Detektion von PARP-Spaltprodukten und durchflusszytometrischer Analyse der Zellen nach Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung die induzierte Apoptose gemessen. Ebenso wie bei Menezes *et al.*⁽⁵⁰⁾ konnten nach 24 h Kultivierung keine bedeutend induzierten Effekte beobachtet werden. Die durchflusszytometrische Analyse und der PARP-Assay ließen keine signifikant vermehrten apoptotischen Vorgänge erkennen (Abb. 4.28 A, Abb. 4.30). Nach 48 h Wachstum unter Einfluss von HAP konnte allerdings in Zellen mit und auch ohne mARC-Knockdown Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 4.27, Abb. 4.28 B, Abb. 4.30). Dieser Anstieg an früh- und spät-apoptotischen Zellen war in den Kontroll-Zellen ohne mARC-Knockdown und Zellen mit mARC1-Knockdown allerdings sehr gering (< 10 %). PARP-Spaltung konnte bei 2 mM HAP

detektiert werden. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Sensibilität von Zellen mit mARC2- bzw. mARC-Doppelknockdown gegenüber HAP enorm. 30 % mehr Zellen zeigten apoptotische Merkmale, verglichen mit einer Kultivierung in Medium ohne HAP. PARP-Spaltprodukte konnten hier schon in Zellen detektiert werden, die unter Einfluss von 0,1 mM HAP kultiviert wurden. Interessanterweise zeigten alle Zellen bei mikroskopischer Betrachtung und der durchflusszytometrischen Vermessung in Gegenwart von 0,1 mM HAP eine erniedrigte Zellvitalität. Eine genauere Untersuchung dieses Phänomens steht bisher aus. Dennoch ist es denkbar, dass bei höheren HAP Konzentrationen in mARC-haltigen Zellen durch die *N*-Reduktion größere Mengen an Adenin gebildet werden. Adenin könnte wiederum die Toxizität von HAP durch Konkurrenzreaktion an der APRT senken. Es ist beschrieben, dass Adenin über eine solche Konkurrenzreaktion beispielsweise die Toxizität von 6-Thiopurinen in HL-60 Zellen in geringen Konzentrationen von 10-50 μM verhindern kann.⁽¹⁵⁵⁾ Auch die HAP-Toxizität in Ehrlich Aszites Karzinom Zellen konnte teilweise durch Adenin-Gabe aufgehoben werden.⁽¹⁵⁶⁾ Für diese These spricht außerdem, dass dieses Phänomen besonders ausgeprägt in Zellen ist, die keinen mARC2-Knockdown aufweisen und daher in diesen Zellen möglicherweise im Vergleich eine größere Menge an Adenin über die *N*-Reduktion anfallen könnte. Da beschrieben wurde, dass Adenin eine über 40-fach höhere Bindungsaffinität zur APRT als HAP hat⁽⁴¹⁾, ist eine relevante Konkurrenz durchaus möglich.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass HAP nach 48 h in HeLa Zellen Apoptose induziert. Gemäß des in der Literatur beschriebenen Mechanismus der Mutagenese über die Wirkung als Basenalogon^(44, 46, 50) scheint dementsprechend Zellteilung und damit DNA-Replikation notwendig zu sein, damit HAP seine toxischen Effekte ausüben kann. Im Gegensatz zu Menezes' Studien in HeLa Zellen⁽⁵⁰⁾ sind die in dieser Arbeit beobachteten HAP-induzierten Effekte verhältnismäßig gering. Dort werden nach 48 h Kultivierung in 2 mM HAP 42 % apoptotische Zellen beschrieben (ggü. 19 % in eigenen Untersuchungen). Durch den mARC2-Knockdown in HeLa Zellen kann die Cytotoxizität von HAP allerdings enorm gesteigert werden. So weisen diese Zellen schon bei geringen Konzentrationen von 0,1 mM eine wesentlich höhere Sensibilität gegenüber HAP auf. Der mARC1-Knockdown in HeLa Zellen führte interessanter Weise nicht zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber HAP und auch ein simultaner Knockdown beider mARC-Proteine führt nicht zu einer Steigerung der apoptotischen Merkmale gegenüber dem alleinigen mARC2-Knockdown. Da HeLa Zellen durchaus eine beachtliche mARC1 Expression aufweisen und in Knockdown Studien gezeigt wurde, dass beide mARC-

Proteine in der Lage sind *N*-hydroxylierte Substrate zu reduzieren, ist dieses Ergebnis überraschend. Die Beteiligung der beiden mARC-Proteine an der *N*-Reduktion in HeLa Zellen konnte aufgrund der geringen aus dem Zellkulturüberstand messbaren Aktivität nicht hinreichend überprüft werden. Die Diskrepanz zwischen gefundener Beteiligung von mARC1 an der *N*-Reduktion in HEK-293 und ZR-75-1 Zellen und fehlendem Einfluss auf die HAP-Sensibilität in HeLa Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden, sollte aber Gegenstand weiterer Studien sein. Möglicherweise spielen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen der mARC-Proteine eine Rolle. So wäre ein Vorkommen im Nukleus für Funktionen, die die DNA-Synthese betreffen, sicherlich entscheidender als die bisher nachgewiesene Mitochondrien-Lokalisation. Denkbar wäre auch eine unterschiedliche Regulation der Proteine. Eine Interaktion mit Ubiquitin wird für beide mARC-Proteine über Affinity Capture-MS vorausgesagt.⁽¹⁵⁷⁾ Über posttranslationale Ubiquitylierungen werden vielfältige zelluläre Prozesse reguliert, wie beispielsweise Proteindegradierung, DNA-Reparatur oder Zellzyklus-Regulationen. Shahni hat im Rahmen ihrer Dissertation in HEK-Zellen überexprimiertes mARC2 mittels Immunofluoreszenz im Cytosol und Nukleus nachweisen können, in HMCL-Zellen dagegen in Mitochondrien. Die mitochondriale Lokalisation konnte allerdings durch Kultivierung in Hochglukose-Medium aufgehoben werden.⁽¹⁵⁸⁾ All diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass für mARC komplexere Regulationsmechanismen existieren, die möglicherweise die Lokalisation regulieren. So ließe sich die unterschiedliche Funktion bei der Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basen begründen. Weiterhin könnte eine unterschiedliche Substratspezifität von mARC1 und mARC2 für HAP als Triphosphat oder gar HAP im DNA-Polymer zu Unterschieden in der Effektivität der Entgiftung führen. Diese Verbindungen wurden als Substrate noch nicht getestet, so dass Unterschiede nicht ausgeschlossen werden können, obwohl es aufgrund der bisher gefundenen geringen Abweichungen in Substratspezifitäten eher unwahrscheinlich erscheint.

Zur Klärung sollten außerdem weitere humane Zelllinien untersucht werden, um zu überprüfen ob bei einem anderen mARC-Expressionsprofil mit einem mARC-Knockdown möglicherweise andere Empfindlichkeiten gegenüber HAP erzielt werden können.

Zusammenfassend konnte für HeLa Zellen gezeigt werden, dass mARC2 eine entscheidende Rolle in der Detoxifizierung von HAP im humanen Zellmetabolismus spielt und die mARC2-abhängige Reduktion der Kontamination des Nukleotid-Pools und dem

anschließenden Einbau in die DNA vorbeugen kann. Anders als die Entfernung von HAPTP aus dem Nukleotid-Pool über die ITPase mittels Spaltung zum Monophosphat, kann die mARC-abhängige Reduktion das Basenanalogen komplett aus dem Nukleotid-Kreislauf entfernen und die natürliche Base dem Nukleinsäuremetabolismus zur Verfügung stellen. Ein Model zur Veranschaulichung des möglichen detoxifizierenden Metabolismus ist in Abb. 5.1 dargestellt.

Das Resultat lässt vermuten, dass eine ähnliche Relevanz für die Detoxifizierung anderer *N*-hydroxylierter Basenanaloga existiert.

Für das Nukleosidanalogen HAPR sind cytotoxische Wirkungen beschrieben. Aufgrund starker antileukämischer Effekte in Mäusen galt HAPR als vielversprechende Verbindung in der Chemotherapie.⁽¹⁴²⁾ Schnell zeigte sich in klinischen Studien jedoch eine akute Toxizität, ausgelöst durch schwere Hämolyse. Über den Metabolismus von HAPR ist jedoch wenig bekannt. Es wird angenommen, dass die Aktivierung anders als bei HAP über die Adenosinkinase erfolgt.⁽⁴³⁾

Als *N*-hydroxylierte Verbindung kann HAPR *in vitro* im rekombinanten System durch das mARC-haltige Enzymsystem reduziert werden.⁽⁷⁰⁾ Daher wurde ebenso wie für das Basenanalogen HAP anhand von HAPR überprüft, ob die mARC-vermittelte reduktive Detoxifizierung im Zellmetabolismus einen relevanten Entgiftungsweg *N*-hydroxylierter Nukleosidanaloga darstellt. Im Zellsystem konnte jedoch keine reduktive Umsetzung von exogen zugeführtem HAPR zu Adenosin beobachtet werden. Anstatt dessen wurde eine sehr effektive Umsetzung zu Inosin gemessen. In Übereinstimmung mit den beobachteten Ergebnissen ist es literaturbeschrieben, dass Adenosin aber auch HAPR im Organismus extrem schnell zu Inosin umgesetzt werden.^(141, 159) Von Adenosin ist bekannt, dass diese Desaminierung über die ADA verläuft.⁽¹⁴³⁾ Denkbar wäre, dass im Zellmetabolismus zunächst eine mARC-abhängige *N*-Reduktion von HAPR und eine anschließende Desaminierung zu Inosin durch ADA stattfinden, aber auch dass HAPR, wie von Rockwell und Maguire beschrieben, ein direktes Substrat von ADA darstellt.⁽¹⁴³⁾ (vgl. Abb. 4.33) Letztere These wird durch die in den klinischen Studien beobachteten hämolytischen Effekte von HAPR unterstützt. Diese gleichen den Effekten von Hydroxylamin, welches bei einer direkten Deshydroxylaminierung freigesetzt werden könnte.⁽¹⁴²⁾ Es konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von HAPR in gewissem Maße mARC-abhängig verläuft, da die Umsetzung zu Inosin durch Herunterregulierung von mARC1 in HEK-293 auf 65 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert war (Abb. 4.34). Des Weiteren konnte durch den Einsatz von Dipyridamol, ein Hemmstoff der ADA⁽¹⁶⁰⁾,

gezeigt werden, dass durch die Inhibition die Inosinentstehung drastisch um 90-95 % gesenkt wird (Abb. 4.35 A). Da Dipyridamol keine Auswirkung auf die *N*-reduktive Aktivität hat (Abb. 4.35 C), ist eine Beeinflussung des *N*-reduktiven Systems ausgeschlossen. Parallel zur Hemmung der ADA konnte ein Anstieg der Metabolisierung zu Adenosin beobachtet werden, so dass die durch den Knockdown festgestellte Beteiligung des mARC-haltigen Enzymsystems an der Metabolisierung durch diese Beobachtung unterstützt wird (Abb. 4.35 B). Darüber hinaus konnte allerdings auch gezeigt werden, dass rekombinante ADA dazu in der Lage ist, direkt die Umsetzung von HAPR zu Inosin zu katalysieren, wobei Adenosin im Vergleich das deutlich bessere Substrat darstellt. Durch den Zusatz des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems ließ sich die Umsetzung von HAPR unter den gegebenen Bedingungen nicht steigern (Abb. 4.36).

Es ist daher anzunehmen, dass HAPR im Zellsystem durchaus zunächst mARC-abhängig zu Adenosin reduziert wird und anschließend eine Desaminierung zu Inosin durch ADA stattfindet. Allerdings spielt die *N*-reduktive Detoxifizierung bei der Entgiftung von HAPR wohl eher eine untergeordnete Rolle. Der weitaus effektivere und wahrscheinlich primäre Entgiftungsweg scheint die direkte Deshydroxylaminierung über die ADA darzustellen (vgl. Abb. 5.1).

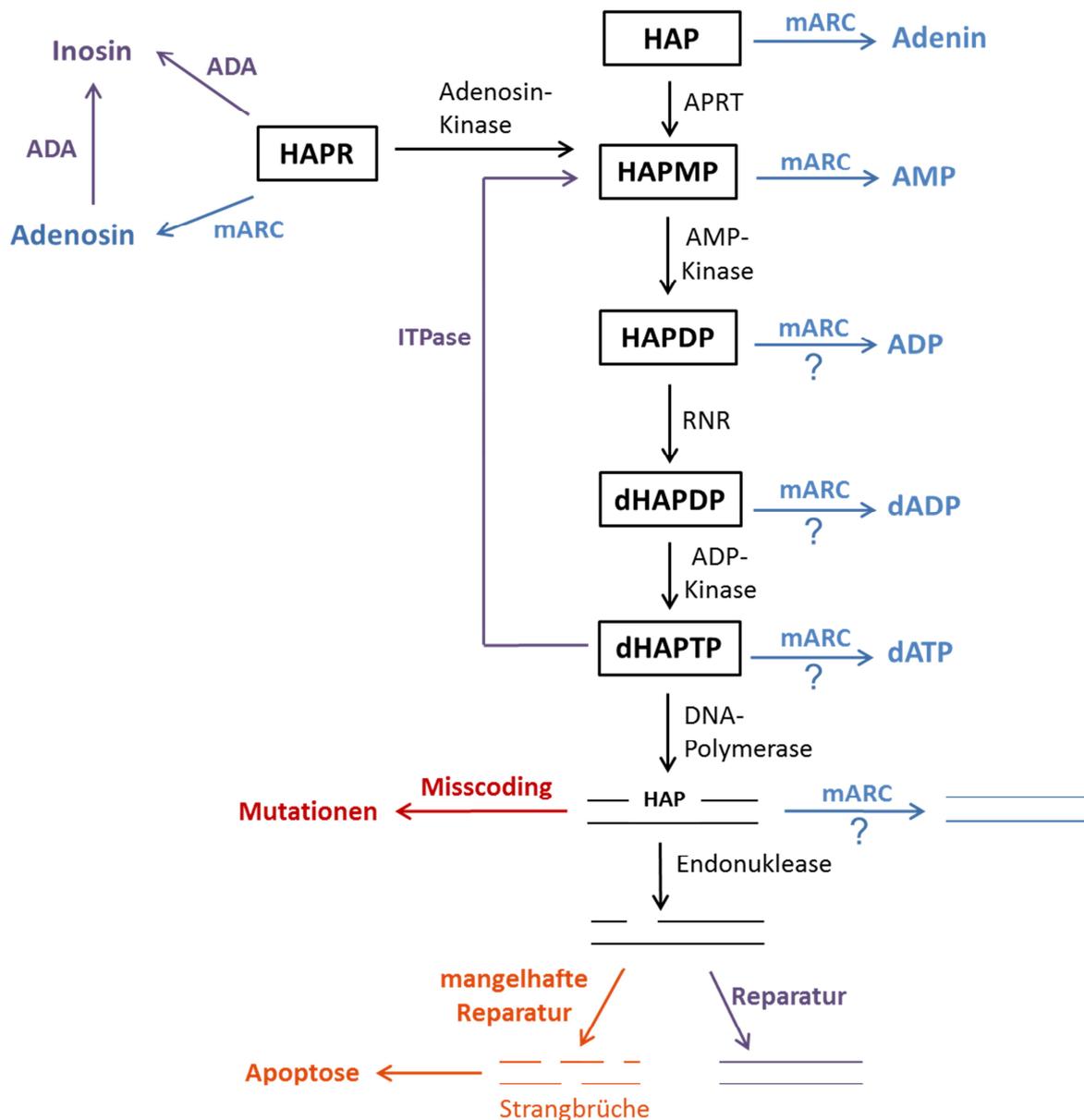


Abb. 5.1: Model für den detoxifizierenden Metabolismus der 6-N-hydroxylierten Basenanaloga des Adenins (modifiziert nach Burgis *et al.* (45) und Menezes *et al.* (50)). Postuliert wird, dass HAP über den Salvage Pathway mittels Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) und HAPR über die Adenosinkinase zum Monophosphat umgewandelt werden. Von HAPMP aus erfolgt über Nucleotidkinasen und Ribonucleotidreduktase (RNR) die Phosphorylierung und Reduktion zum Desoxytriphosphat (dHAPTP). Anschließend kann der Einbau in die DNA stattfinden. Die N-reduktive Detoxifizierung über das mARC-Enzymsystem ist an allen Stellen des Nucleinsäuremetabolismus denkbar. Die mARC-abhängigen Detoxifizierungen, die noch nicht im rekombinanten System oder im Zellsystem überprüft worden sind, sind mit einem Fragezeichen versehen. Andere Entgiftungswege stellen die Adenosindesaminase, die HAPR sehr effizient deshydroxylaminieren kann, und die ITPase dar, die HAPTP und dHAPTP zum entsprechenden Monophosphat spalten kann. Wird dHAPTP in die DNA inkorporiert, kann die Reparatur der Nucleinsäure über die Spaltung durch eine Endonuklease initiiert werden. Kommt es hierbei zu exzessiven Strangbrüchen, wird Apoptose eingeleitet. Wird HAP in der Nucleinsäure nicht erkannt und entfernt, kann die ambivalente Basenpaarung zu Mutationen führen.

6 Zusammenfassung

Das mitochondriale *N*-reduktive Enzymsystem besteht aus den Elektronentransportproteinen CYB5 und CYB5R und aus dem erst kürzlich entdeckten Molybdoenzym mARC.⁽²²⁾ *In vitro* ist das aus den rekombinanten oder nativ isolierten Enzymen rekonstituierte System dazu in der Lage zahlreiche verschiedenartige *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren. Daher ist allgemein anerkannt, dass das mARC-haltige Enzymsystem eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von *N*-hydroxylierten Amidin- und Guanidin-Prodrugs und der Entgiftung toxischer Hydroxylamine spielt. Dennoch wird teilweise in der Literatur der *N*-reduktive Metabolismus einem mikrosomalen Zwei-Komponenten-System aus CYB5 und CYB5R zugeschrieben.^(21, 111)

Mittels siRNA-vermittelter Knockdown Studien in humanen Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass das mitochondriale mARC-haltige Enzymsystem nicht nur im rekonstituierten System sondern auch im vollständigen humanen Zellmetabolismus für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen verantwortlich ist. So ließen sich mARC1 und/oder mARC2, mitochondriales CYB5B und CYB5R3 als essentielle Komponenten des *N*-reduktiven Systems in humanen Zellen bestätigen.

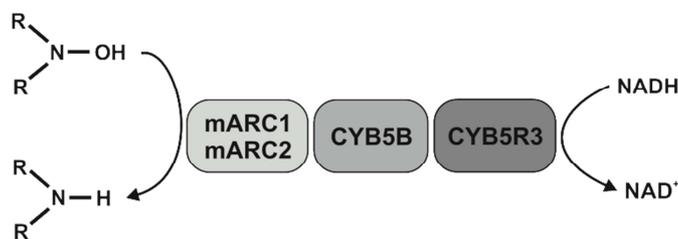


Abb. 6.1: Komponenten des *N*-reduktiven Systems in humanen Zellen.

Jedes Säugetier-Genom codiert für zwei verschiedene mARC-Proteine. Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass beide mARC-Proteine, mARC1 und mARC2, im Zellmetabolismus die Fähigkeit haben die *N*-Reduktion zu katalysieren. Der Grad der Beteiligung am *N*-reduktiven Zellmetabolismus hängt allerdings stark vom Expressionslevel des jeweiligen Molybdoproteins ab. Western Blot- und Genexpressionsanalysen weisen darauf hin, dass in Zellen und Geweben meist ein mARC-Protein erheblich stärker exprimiert wird als das andere. In humanen Zellen und Geweben liegt mARC1 dominant vor, in anderen Spezies wie Maus und Ratte scheint mARC2 die vorherrschende Form zu sein. Die Existenz von zwei mARC-Proteinen in allen Säugetier-Organismen

weist auf die spezielle evolutionäre Notwendigkeit jedes einzelnen Proteins hin. Welche spezielle Funktion dies ist, und warum ein mARC-Protein dem anderen mengenmäßig untergeordnet zu sein scheint, bleibt zu zeigen.

Die mikrosomale und die mitochondriale CYB5-Isoformen werden von zwei unterschiedlichen Genen codiert. Die Knockdown Studien konnten zeigen, dass ausschließlich das mitochondriale CYB5B und nicht das mikrosomale CYB5A Teil des *N*-reduktiven Systems im Zellmetabolismus ist. Zusätzlich unterstützen Untersuchungen mit CYB5A-Knockout-Mauslebern das Ergebnis, dass CYB5A nicht an der *N*-Reduktion beteiligt ist. Ein für den Zellmetabolismus relevantes mikrosomales *N*-reduktives System kann daher ausgeschlossen werden. Um den Mechanismus zu untersuchen, über den CYB5 an der *N*-reduktiven Katalyse teilnimmt, wurden in dieser Arbeit Studien mit Apo-CYB5B durchgeführt und dabei gezeigt, dass die *N*-Reduktion strikt vom CYB5-Häm abhängig ist. Obwohl in bisherigen Steady-State-Kinetik-Untersuchungen kein Elektronenfluss zwischen mARC und CYB5 gemessen werden konnte⁽¹¹²⁾, kann aufgrund der Notwendigkeit des Häms für die Katalyse eine Funktion von CYB5 als Elektronentransportprotein angenommen werden.

Es existieren vier Gene, die für CYB5R codieren. In dieser Arbeit wurde mittels RNAi nachgewiesen, dass das Isoenzym CYB5R3 eine essentielle Komponente des zellulären *N*-reduktiven Systems darstellt. Ein Einfluss des Knockdowns auf die *N*-reduktive Aktivität kann allerdings erst ab sehr hohen Knockdown-Effizienzen erreicht werden. Dementsprechend sind anscheinend sehr geringe Proteinlevel für eine Katalyse ausreichend. Diese Beobachtung entspricht den im rekonstituierten System gefundenen Resultaten. Auch im rekonstituierten System ist lediglich bis zu einem Hundertstel im Verhältnis zu den anderen Komponenten für eine effektive Katalyse ausreichend. Die Beteiligung von CYB5R1 und/oder 2 kann nicht ausgeschlossen werden, eine im Zellmetabolismus relevante Beteiligung ist aber aufgrund der gefundenen Notwendigkeit von CYB5R3 und der im Verhältnis sehr viel geringeren Expression eher nicht anzunehmen.

Über die endogenen Substrate und damit über die physiologischen Funktionen des mARC-Enzymsystems ist bisher wenig bekannt. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das rekonstituierte mARC-Enzymsystem toxische und mutagene *N*-hydroxylierte Nukleobasen und Nukleoside zu den korrespondierenden natürlichen Basen reduzieren kann.⁽⁷⁰⁾ Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des nun etablierten

mARC-Knockdown Assays untersucht, ob eine mARC-vermittelte *N*-Reduktion im Zellsystem eine physiologisch relevante Entgiftungsreaktion darstellt. Im Zellsystem konnte eine mARC-abhängige *N*-reduktive Metabolisierung der *N*-hydroxylierten Nukleobase HAP zur natürlichen Base Adenin nachgewiesen werden. Das *N*-hydroxylierte Nucleosid HAPR wurde allerdings sehr effektiv zu Inosin und nicht wie zunächst erwartet zu Adenosin metabolisiert. Über mARC-Knockdown und ADA-Inhibitionsuntersuchungen sowie Analysen mit rekombinanter ADA ließ sich zeigen, dass Inosin primär mittels ADA durch direkte Deshydroxylaminierung entsteht, aber auch dass zu einem geringeren Anteil mARC an der Metabolisierung über eine *N*-Reduktion zu Adenosin beteiligt ist. Adenosin wird als Substrat der ADA anschließend sofort zu Inosin desaminiert.

Der Einfluss des mARC-Knockdowns auf die Sensibilität humaner Zellen gegenüber HAP wurde untersucht. Zur Detektion der HAP-induzierten Apoptose wurden in dieser Arbeit mit der durchflusszytometrischen Vermessung nach Annexin V-PE/7-AAD-Färbung und mit der PARP-Spaltprodukt-Detektion zwei Apoptosedetektions-Assays etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Empfindlichkeit gegenüber HAP in HeLa Zellen mit mARC2-Knockdown nach 48 h um bis zu 30 % erhöht war. Im Gegensatz dazu hatte der mARC1-Knockdown interessanterweise keinen Einfluss auf die HAP-induzierte Apoptose. mARC2 spielt daher bei der reduktiven Detoxifizierung von HAP in HeLa Zellen eine entscheidende Rolle und kann die Zelle vor den apoptotischen Effekten des Basenanalogs schützen, mARC1 allerdings nicht. Da mARC1 nachweislich an der *N*-Reduktion in HEK-293 und ZR-75-1 beteiligt ist, ist der fehlende Einfluss auf die HAP-Sensibilität unerwartet und deutet auf Unterschiede in der Regulation oder Lokalisation der mARC-Proteine hin. Gegenstand fortführender Arbeiten sollte daher die Aufklärung dieses Phänomens sein. In Hinblick hierauf sollten insbesondere mögliche Regulationsmechanismen von mARC untersucht werden, über die eventuell eine unterschiedliche Funktion bei der Detoxifizierung *N*-hydroxylierter Basenanaloga begründet werden könnte. Zudem sollte eine potentielle Lokalisation von mARC im Nucleus überprüft werden.

Da mARC durchweg in Eukaryoten evolutionär konserviert ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen und Detoxifizierung von Hydroxylaminen die einzige Funktion des Proteins darstellt. Es existieren Hinweise, dass mARC möglicherweise Funktionen außerhalb des *N*-reduktiven Systems hat. Die

Anwendung des in dieser Arbeit etablierten Knockdown-Tools bietet eine gute Möglichkeit zur Aufklärung weiterer physiologischer Funktionen von mARC im oder auch außerhalb des *N*-reduktiven Systems.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P. und Schäfer-Korting, M. (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl., *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*. 24-39
- (2) Guengerich, F. P. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 611–650
- (3) Ueda, O.; Sugihara, K.; Ohta, S. und Kitamura, S. (2005) Involvement of molybdenum hydroxylases in reductive metabolism of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian skin. *Drug Metab. Dispos.* 33, 1312-1318
- (4) Dick, R. A.; Kanne, D. B. und Casida, J. E. (2005) Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 317–323
- (5) Clement, B.; Jung, F. und Pfunder, H. (1993) *N*-hydroxylation of benzamidine to benzamidoxime by a reconstituted cytochrome P-450 oxidase system from rabbit liver: involvement of cytochrome P-450 IIC3. *Mol. Pharmacol.* 43, 335-342
- (6) Clement, B.; Schultze-Mosgau, M. H. und Wohlers, H. (1993) Cytochrome P450 dependent *N*-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the *N*-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 46, 2249–2267
- (7) Fan, L.; Schut, H. A. und Snyderwine, E. G. (1995) Cytotoxicity, DNA adduct formation and DNA repair induced by 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis.* 16, 775–779
- (8) King, R. S.; Teitel, C. H.; Shaddock, J. G.; Casciano, D. A. und Kadlubar, F. F. (1999) Detoxification of carcinogenic aromatic and heterocyclic amines by enzymatic reduction of the *N*-hydroxy derivative. *Cancer Lett.* 143, 167–171
- (9) Clement, B. (2002) Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab. Rev.* 34, 565–579
- (10) Bernheim, M. L. und Hochstein, P. (1968) Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 436–442
- (11) Bernheim, M. L. (1969) The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 408–413

- (12) Kadlubar, F. F. und Ziegler, D. M. (1974) Properties of a NADH-dependent *N*-hydroxyamine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 83–92
- (13) Clement, B.; Demesmaeker, M. und Linne, S. (1996) Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 682–688
- (14) Clement, B.; Schmitt, S. und Zimmermann, M. (1988) Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch. Pharm.* 321, 955–956
- (15) Clement, B.; Mau, S.; Deters, S. und Havemeyer, A. (2005) Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab. Dispos.* 33, 1740–1747
- (16) Hauptmann, J.; Paintz, M.; Kaiser, B. und Richter, M. (1988) Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine *in vivo* and *in vitro*. *Pharmazie.* 43, 559–560
- (17) Andersson, S.; Hofmann, Y.; Nordling, A.; Li, X.-q.; Nivelius, S.; Andersson, T. B.; Ingelman-Sundberg, M. und Johansson, I. (2005) Characterization and partial purification of the rat and human enzyme systems active in the reduction of *N*-hydroxymelagatran and benzamidoxime. *Drug Metab. Dispos.* 33, 570–578
- (18) Clement, B. und Lopian, K. (2003) Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab. Dispos.* 31, 645–651
- (19) Clement, B.; Lomb, R. und Möller, W. (1997) Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 19615–19620
- (20) Sacco, J. C. und Trepanier, L. A. (2010) Cytochrome b₅ and NADH cytochrome b₅ reductase: genotype-phenotype correlations for hydroxylamine reduction. *Pharmacogenet. Genomics.* 20, 26–37
- (21) Kurian, J. R.; Bajad, S. U.; Miller, J. L.; Chin, N. A. und Trepanier, L. A. (2004) NADH cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 1171–1178
- (22) Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R. R.; Kunze, T. und Clement, B. (2006) Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 34796–34802

- (23) Peterlin-Masic, L.; Cesar, J. und Zega, A. (2006) Metabolism-directed optimisation of antithrombotics: the prodrug principle. *Curr. Pharm. Des.* 12, 73–91
- (24) Clement, B. und Raether, W. (1985) Amidoximes of pentamidine: synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittelforschung.* 35, 1009-1014
- (25) Clement, B. (1996) Pharmazeutische Zubereitungen mit einem Wirkstoff, der modifizierte Amidgruppen enthält. *Patentschrift* EP0708640 A1.
- (26) Hall, J. E.; Kerrigan, J. E.; Ramachandran, K.; Bender, B. C.; Stanko, J. P.; Jones, S. K.; Patrick, D. A. und Tidwell, R. R. (1998) Anti-Pneumocystis activities of aromatic diamidoxime prodrugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 666–674
- (27) Gustafsson, D.; Nyström, J.; Carlsson, S.; Bredberg, U.; Eriksson, U.; Gyzander, E.; Elg, M.; Antonsson, T.; Hoffmann, K.; Ungell, A.; Sörensen, H.; Någård, S.; Abrahamsson, A. und Bylund, R. (2001) The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb. Res.* 101, 171–181
- (28) Weller, T.; Alig, L.; Beresini, M.; Blackburn, B.; Bunting, S.; Hadváry, P.; Müller, M. H.; Knopp, D.; Levet-Trafit, B.; Lipari, M. T.; Modi, N. B.; Müller, M.; Refino, C. J.; Schmitt, M.; Schönholzer, P.; Weiss, S. und Steiner, B. (1996) Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J. Med. Chem.* 39, 3139–3147
- (29) Froriep, D.; Clement, B.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Reichmann, D.; Schmalix, W. und Havemeyer, A. (2013) Activation of the anti-cancer agent upamostat by the mARC enzyme system. *Xenobiotica.* 43, 780–784
- (30) Reichert, D. (1981) Giftung körperfremder Stoffe durch Konjugationsreaktionen. *Angewandte Chemie.* 93, 135–220
- (31) Cribb, A. E.; Spielberg, S. P. und Griffin, G. P. (1995) *N*⁴-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P450 2C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 23, 406–414
- (32) Riley, R. J.; Roberts, P.; Coleman, M. D.; Kitteringham, N. R. und Park, B. K. (1990) Bioactivation of dapsone to a cytotoxic metabolite: *in vitro* use of a novel two compartment system which contains human tissues. *Br J Clin Pharmacol.* 30, 417–426
- (33) Freese, E. (1959) The specific mutagenic effect of base analogues on Phage T4. *Journal of Molecular Biology.* 1, 87–105
- (34) Khromov-Borisov, N. N. (1997) Naming the mutagenic nucleic acid base analogs: the Galatea syndrome. *Mutat. Res.* 379, 95–103

- (35) Negishi, K.; Bessho, T. und Hayatsu, H. (1994) Nucleoside and nucleobase analog mutagens. *Mutat. Res.* 318, 227–238
- (36) Clement, B. und Kunze, T. (1990) Hepatic microsomal *N*-hydroxylation of adenine to 6-*N*-hydroxylaminopurine. *Biochem. Pharmacol.* 39, 925–933
- (37) Lieberman, I. (1956) Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphate from inosine-5'-phosphate. *J. Biol. Chem.* 223, 327–339
- (38) Budowsky, E. I.; Sverdlov, E. D. und Monastyrskaya, G. S. (1971) Mechanism of the mutagenic action of hydroxylamine. IV. Reaction of hydroxylamine and *O*-methylhydroxylamine with the adenine nucleus. *Biochim. Biophys. Acta.* 246, 320–328
- (39) Simandan, T.; Sun, J. und Dix, T. A. (1998) Oxidation of DNA bases, deoxyribonucleosides and homopolymers by peroxy radicals. *Biochem. J.* 335 (Pt 2), 233–240
- (40) Freese, E. (1968) The mutagenic effect of hydroxyaminopurine derivatives on phage T4. *Mutat. Res.* 5, 299–301
- (41) Krenitsky, T. A.; Neil, S. M.; Elion, G. B. und Hitchings, G. H. (1969) Adenine phosphoribosyltransferase from monkey liver. Specificity and properties. *J. Biol. Chem.* 244, 4779–4784
- (42) Stepchenkova, E. I.; Kozmin, S. G.; Alenin, V. V. und Pavlov, Y. I. (2005) Genome-wide screening for genes whose deletions confer sensitivity to mutagenic purine base analogs in yeast. *BMC Genet.* 6, 31
- (43) Burchenal, J. H.; Dollinger, M.; Butterbaugh, J.; Stoll, D. und Giner-Sorolla, A. (1967) Studies of 6-*N*-hydroxylamino-9-β-D-ribofuranosylpurine in mouse leukemia. *Biochem. Pharmacol.* 16, 423–428
- (44) Abdul-Masih, M. T. und Bessman, M. J. (1986) Biochemical studies on the mutagen, 6-*N*-hydroxylaminopurine. Synthesis of the deoxynucleoside triphosphate and its incorporation into DNA *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 261, 2020–2026
- (45) Burgis, N. E.; Brucker, J. J. und Cunningham, R. P. (2003) Repair system for noncanonical purines in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 3101–3110
- (46) Pavlov, Y. I.; Suslov, V. V.; Shcherbakova, P. V.; Kunkel, T. A.; Ono, A.; Matsuda, A. und Schaaper, R. M. (1996) Base analog *N*⁶-hydroxylaminopurine mutagenesis in *Escherichia coli*: genetic control and molecular specificity. *Mutat. Res.* 357, 1–15
- (47) Kozmin, S. G.; Leroy, P.; Pavlov, Y. I. und Schaaper, R. M. (2008) YcbX and yiiM, two novel determinants for resistance of *Escherichia coli* to *N*-hydroxylated base analogues. *Mol. Microbiol.* 68, 51–65

- (48) Chamizo-Ampudia, A.; Galvan, A.; Fernandez, E. und Llamas, A. (2011) The *Chlamydomonas reinhardtii* molybdenum cofactor enzyme crARC has a Zn-dependent activity and protein partners similar to those of its human homologue. *Eukaryotic Cell*. 10, 1270–1282
- (49) Waisertreiger, I. S.-R.; Menezes, M. R.; Randazzo, J. und Pavlov, Y. I. (2010) Elevated levels of DNA strand breaks induced by a base analog in the human cell line with the P32T ITPA variant. *J Nucleic Acids*. 2010
- (50) Menezes, M. R.; Waisertreiger, I. S.-R.; Lopez-Bertoni, H.; Luo, X. und Pavlov, Y. I. (2012) Pivotal role of inosine triphosphate pyrophosphatase in maintaining genome stability and the prevention of apoptosis in human cells. *PLoS ONE*. 7, e32313
- (51) Hille, R.; Nishino, T. und Bittner, F. (2011) Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord Chem Rev*. 255, 1179–1205
- (52) Mendel, R. R. und Kruse, T. (2012) Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim. Biophys. Acta*. 1823, 1568–1579
- (53) Kisker, C.; Schindelin, H.; Pacheco, A.; Wehbi, W. A.; Garrett, R. M.; Rajagopalan, K. V.; Enemark, J. H. und Rees, D. C. (1997) Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*. 91, 973–983
- (54) Hille, R. und Nishino, T. (1995) Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J*. 9, 995–1003
- (55) Rodríguez-Trelles, F.; Tarrío, R. und Ayala, F. J. (2003) Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13413–13417
- (56) Wahl, B.; Reichmann, D.; Niks, D.; Krompholz, N.; Havemeyer, A.; Clement, B.; Messerschmidt, T.; Rothkegel, M.; Biester, H.; Hille, R.; Mendel, R. R. und Bittner, F. (2010) Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J. Biol. Chem*. 285, 37847–37859
- (57) Romão, M. J.; Archer, M.; Moura, I.; Moura, J. J.; LeGall, J.; Engh, R.; Schneider, M.; Hof, P. und Huber, R. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*. *Science*. 270, 1170–1176
- (58) Reiss, J. (2000) Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum. Genet*. 106, 157–163
- (59) Teschner, J.; Lachmann, N.; Schulze, J.; Geisler, M.; Selbach, K.; Santamaria-Araujo, J.; Balk, J.; Mendel, R. R. und Bittner, F. (2010) A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell*. 22, 468–480

- (60) Mendel, R. R. und Bittner, F. (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763, 621–635
- (61) Kuper, J.; Llamas, A.; Hecht, H.-J.; Mendel, R. R. und Schwarz, G. (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature.* 430, 803–806
- (62) Llamas, A.; Otte, T.; Multhaupt, G.; Mendel, R. R. und Schwarz, G. (2006) The Mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin. A novel route toward metal cofactor assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 18343-18350
- (63) Rajagopalan, K. V. und Johnson, J. L. (1992) The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* 267, 10199–10202
- (64) Aguilar, M.; Kalakoutskii, K.; Cárdenas, J. und Fernández, E. (1992) Direct transfer of molybdopterin cofactor to aponitrate reductase from a carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 307, 162–163
- (65) Schwarz, G.; Mendel, R. R. und Ribbe, M. W. (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature.* 460, 839–847
- (66) Veldman, A.; Santamaria-Araujo, J. A.; Sollazzo, S.; Pitt, J.; Gianello, R.; Yaplito-Lee, J.; Wong, F.; Ramsden, C. A.; Reiss, J.; Cook, I.; Fairweather, J. und Schwarz, G. (2010) Successful treatment of molybdenum cofactor deficiency type A with cPMP. *Pediatrics.* 125, e1249-54
- (67) Grünewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Schwering, U.; Mendel, R. R. und 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
- (68) Havemeyer, A.; Grünewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Erdélyi, P.; Fischer, J. und Clement, B. (2010) Reduction of *N*-hydroxy-sulfonamides, including *N*-hydroxy-valdecocix, by the molybdenum-containing enzyme mARC. *Drug Metab. Dispos.* 38, 1917–1921
- (69) Jakobs, H.; Froriep, D.; Havemeyer, A.; Mendel, R. R.; Bittner, F. und Clement, B. (2014) The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC): involvement in metabolic reduction of *N*-Oxides, Oximes and *N*-hydroxy-amidinohdrazones. *Chem. Med. Chem.* Epub ahead of print 10.1002/cmdc.201402127
- (70) Krompholz, N.; Krischkowski, C.; Reichmann, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Clement, B. und Havemeyer, A. (2012) The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is involved in detoxification of *N*-hydroxylated base analogues. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2443–2450
- (71) Kotthaus, J.; Wahl, B.; Havemeyer, A.; Kotthaus, J.; Schade, D.; Garbe-Schönberg, D.; Mendel, R. R.; Bittner, F. und Clement, B. (2011) Reduction of *N*^ω-hydroxy-L-

- arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem. J.* 433, 383–391
- (72) Stuehr, D. J.; Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Griffith, O. W.; Feldman, P. L. und Wiseman, J. (1991) *N*^ω-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* 266, 6259–6263
- (73) Moncada, S.; Palmer, R. M. und Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142
- (74) Klein, J. M.; Busch, J. D.; Potting, C.; Baker, M. J.; Langer, T. und Schwarz, G. (2012) The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 287, 42795–42803
- (75) Neve, E. P.; Nordling, A.; Andersson, T. B.; Hellman, U.; Diczfalusy, U.; Johansson, I. und Ingelman-Sundberg, M. (2012) Amidoxime reductase system containing cytochrome b₅ type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *J. Biol. Chem.* 287, 6307–6317
- (76) Havemeyer, A.; Lang, J. und Clement, B. (2011) The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab. Rev.* 43, 524–539
- (77) Anantharaman, V. und Aravind, L. (2002) MOSC domains: ancient, predicted sulfur-carrier domains, present in diverse metal-sulfur cluster biosynthesis proteins including Molybdenum cofactor sulfurases. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 55–61
- (78) Bittner, F. (2013) Molybdenum-enzymes, MOSC family. In: Kretsinger, Robert H., Uversky, Vladimir N., Permyakov, Eugene A (Hrsg): *Encyclopedia of metalloproteins*. Springer New York, 1451–1456
- (79) Da Cruz, S.; Xenarios, I.; Langridge, J.; Vilbois, F.; Parone, P. A. und Martinou, J.-C. (2003) Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 41566–41571
- (80) Islinger, M.; Lüers, G. H.; Li, K. W.; Loos, M. und Völkl, A. (2007) Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 282, 23055–23069
- (81) Wiese, S.; Gronemeyer, T.; Ofman, R.; Kunze, M.; Grou, C. P.; Almeida, J. A.; Eisenacher, M.; Stephan, C.; Hayen, H.; Schollenberger, L.; Korosec, T.; Waterham, H. R.; Schliebs, W.; Erdmann, R.; Berger, J.; Meyer, H. E.; Just, W.; Azevedo, J. E.; Wanders, R. J. A. und Warscheid, B. (2007) Proteomics characterization of mouse kidney peroxisomes by tandem mass spectrometry and protein correlation profiling. *Mol. Cell Proteomics.* 6, 2045–2057
- (82) Mikula, M.; Rubel, T.; Karczmarski, J.; Goryca, K.; Dadlez, M. und Ostrowski, J. (2011) Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for

- search of new biomarkers of colon tumors. *Funct. Integr. Genomics*. 11, 215-224
- (83) Malik, A. N.; Rossios, C.; Al-Kafaji, G.; Shah, A. und Page, R. A. (2007) Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 237–244
- (84) Teslovich, T. M.; Musunuru, K.; Smith, A. V.; Edmondson, A. C.; Stylianou, I. M.; Koseki, M.; Pirruccello, J. P.; Ripatti, S.; Chasman, D. I.; Willer, C. J.; Johansen, C. T.; Fouchier, S. W.; Isaacs, A.; Peloso, G. M.; Barbalic, M.; Ricketts, S. L.; Bis, J. C.; Aulchenko, Y. S.; Thorleifsson, G.; Feitosa, M. F.; Chambers, J.; Orho-Melander, M.; Melander, O.; Johnson, T.; Li, X.; Guo, X.; Li, M.; Shin Cho, Y.; Jin Go, M.; Jin Kim, Y.; Lee, J.-Y.; Park, T.; Kim, K.; Sim, X.; Twee-Hee Ong, R.; Croteau-Chonka, D. C.; Lange, L. A.; Smith, J. D.; Song, K.; Hua Zhao, J.; Yuan, X.; Luan, J.; Lamina, C.; Ziegler, A.; Zhang, W.; Zee, R. Y. L.; Wright, A. F.; Witteman, J. C. M.; Wilson, J. F.; Willemsen, G.; Wichmann, H.-E.; Whitfield, J. B.; Waterworth, D. M.; Wareham, N. J.; Waeber, G.; Vollenweider, P.; Voight, B. F.; Vitart, V.; Uitterlinden, A. G.; Uda, M.; Tuomilehto, J.; Thompson, J. R.; Tanaka, T.; Surakka, I.; Stringham, H. M.; Spector, T. D.; Soranzo, N.; Smit, J. H.; Sinisalo, J.; Silander, K.; Sijbrands, E. J. G.; Scuteri, A.; Scott, J.; Schlessinger, D.; Sanna, S.; Salomaa, V.; Saharinen, J.; Sabatti, C.; Ruukonen, A.; Rudan, I.; Rose, L. M.; Roberts, R.; Rieder, M.; Psaty, B. M.; Pramstaller, P. P.; Pichler, I.; Perola, M.; Penninx, B. W. J. H.; Pedersen, N. L.; Pattaro, C.; Parker, A. N.; Pare, G.; Oostra, B. A.; O'Donnell, C. J.; Nieminen, M. S.; Nickerson, D. A.; Montgomery, G. W.; Meitinger, T.; McPherson, R.; McCarthy, M. I.; McArdle, W.; Masson, D.; Martin, N. G.; Marroni, F.; Mangino, M.; Magnusson, P. K. E.; Lucas, G.; Luben, R.; Loos, R. J. F.; Lokki, M.-L.; Lettre, G.; Langenberg, C.; Launer, L. J.; Lakatta, E. G.; Laaksonen, R.; Kyvik, K. O.; Kronenberg, F.; König, I. R.; Khaw, K.-T.; Kaprio, J.; Kaplan, L. M.; Johansson, A.; Jarvelin, M.-R.; Janssens, A. C. J. W.; Ingelsson, E.; Igl, W.; Kees Hovingh, G.; Hottenga, J.-J.; Hofman, A.; Hicks, A. A.; Hengstenberg, C.; Heid, I. M.; Hayward, C.; Havulinna, A. S.; Hastie, N. D.; Harris, T. B.; Haritunians, T.; Hall, A. S.; Gyllensten, U.; Guiducci, C.; Groop, L. C.; Gonzalez, E.; Gieger, C.; Freimer, N. B.; Ferrucci, L.; Erdmann, J.; Elliott, P.; Ejebe, K. G.; Döring, A.; Dominiczak, A. F.; Demissie, S.; Deloukas, P.; Geus, E. J. C. de; Faire, U. de; Crawford, G.; Collins, F. S.; Chen, Y.-D. I.; Caulfield, M. J.; Campbell, H.; Burt, N. P.; Bonnycastle, L. L.; Boomsma, D. I.; Boekholdt, S. M.; Bergman, R. N.; Barroso, I.; Bandinelli, S.; Ballantyne, C. M.; Assimes, T. L.; Quertermous, T.; Altshuler, D.; Seielstad, M.; Wong, T. Y.; Tai, E.-S.; Feranil, A. B.; Kuzawa, C. W.; Adair, L. S.; Taylor, H. A.; Borecki, I. B.; Gabriel, S. B.; Wilson, J. G.; Holm, H.; Thorsteinsdottir, U.; Gudnason, V.; Krauss, R. M.; Mohlke, K. L.; Ordovas, J. M.; Munroe, P. B.; Kooner, J. S.; Tall, A. R.; Hegele, R. A.; Kastelein, J. J. P.; Schadt, E. E.; Rotter, J. I.; Boerwinkle, E.; Strachan, D. P.; Mooser, V.; Stefansson, K.; Reilly, M. P.; Samani, N. J.; Schunkert, H.; Cupples, L. A.; Sandhu, M. S.; Ridker, P. M.; Rader, D. J.; van Duijn, C. M.; Peltonen, L.; Abecasis, G. R.; Boehnke, M. und Kathiresan, S. (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 466, 707–713
- (85) Spatz, L. und Strittmatter, P. (1971) A form of cytochrome b₅ that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1042–1046

- (86) Parthasarathy, S.; Altuve, A.; Terzyan, S.; Zhang, X.; Kuczera, K.; Rivera, M. und Benson, D. R. (2011) Accommodating a nonconservative internal mutation by water-mediated hydrogen bonding between β -sheet strands: a comparison of human and rat type B (mitochondrial) cytochrome b_5 . *Biochemistry* 50, 5544-5554
- (87) Altuve, A.; Silchenko, S.; Lee, K. H.; Kuczera, K.; Terzyan, S.; Zhang, X.; Benson, D. R. und Rivera, M. (2001) Probing the differences between rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome b_5 and microsomal cytochromes b_5 . *Biochemistry*. 40, 9469-9483
- (88) Borgese, N.; D'Arrigo, A.; Silvestris, M. de und Pietrini, G. (1993) NADH-cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 325, 70-75
- (89) Giordano, S. J. und Steggles, A. W. (1991) The human liver and reticulocyte cytochrome b_5 mRNAs are products from a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 38-44
- (90) D'Arrigo, A.; Manera, E.; Longhi, R. und Borgese, N. (1993) The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b_5 suggests novel targeting pathways. *J. Biol. Chem.* 268, 2802-2808
- (91) Lederer, F.; Ghir, R.; Guiard, B.; Cortial, S. und Ito, A. (1983) Two homologous cytochromes b_5 in a single cell. *Eur. J. Biochem.* 132, 95-102
- (92) Okada, Y.; Frey, A. B.; Guenther, T. M.; Oesch, F.; Sabatini, D. D. und Kreibich, G. (1982) Studies on the biosynthesis of microsomal membrane proteins. Site of synthesis and mode of insertion of cytochrome b_5 , cytochrome b_5 reductase, cytochrome P-450 reductase and epoxide hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 122, 393-402
- (93) Vergères, G. und Waskell, L. (1995) Cytochrome b_5 , its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* 77, 604-620
- (94) Schenkman, J. B. und Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b_5 . *Pharmacol. Ther.* 97, 139-152
- (95) Hultquist, D. E. und Passon, P. G. (1971) Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b_5 and cytochrome b_5 reductase. *Nature New Biol.* 229, 252-254
- (96) Silvestris, M. de; D'Arrigo, A. und Borgese, N. (1995) The targeting information of the mitochondrial outer membrane isoform of cytochrome b_5 is contained within the carboxyl-terminal region. *FEBS Lett.* 370, 69-74
- (97) Bernardi, P. und Azzone, G. F. (1981) Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 256, 7187-7192

- (98) Ogishima, T.; Kinoshita, J.-Y.; Mitani, F.; Suematsu, M. und Ito, A. (2003) Identification of outer mitochondrial membrane cytochrome b₅ as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 278, 21204-21211
- (99) Ito, A.; Hayashi, S. und Yoshida, T. (1981) Participation of a cytochrome b₅-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane (OM cytochrome b) in NADH-semidehydroascorbic acid reductase activity of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 591-598
- (100) Spatz, L. und Strittmatter, P. (1973) A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b₅ reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment. *J. Biol. Chem.* 248, 793-799
- (101) Kimura, S.; Kawamura, M. und Iyanagi, T. (2003) Role of Thr(66) in porcine NADH-cytochrome b₅ reductase in catalysis and control of the rate-limiting step in electron transfer. *J. Biol. Chem.* 278, 3580-3589
- (102) Zhao, X.; León, I. R.; Bak, S.; Mogensen, M.; Wrzesinski, K.; Højlund, K. und Jensen, O. N. (2011) Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol. Cell Proteomics.* 10, M110.000299
- (103) Zhu, H.; Larade, K.; Jackson, T. A.; Xie, J.; Ladoux, A.; Acker, H.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Fandrey, J.; Cross, A. R.; Lukat-Rodgers, G. S.; Rodgers, K. R. und Bunn, H. F. (2004) NCB50R is a novel soluble NAD(P)H reductase localized in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279, 30316-30325
- (104) Wu, C.; Orozco, C.; Boyer, J.; Leglise, M.; Goodale, J.; Batalov, S.; Hodge, C. L.; Haase, J.; Janes, J.; Huss, J. W. und Su, A. I. (2009) BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 10, R130
- (105) Ozols, J.; Carr, S. A. und Strittmatter, P. (1984) Identification of the NH₂-terminal blocking group of NADH-cytochrome b₅ reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane-binding domain. *J. Biol. Chem.* 259, 13349-13354
- (106) Borgese, N. und Pietrini, G. (1986) Distribution of the integral membrane protein NADH-cytochrome b₅ reductase in rat liver cells, studied with a quantitative radioimmunoblotting assay. *Biochem. J.* 239, 393-403
- (107) Borgese, N.; Aggujaro, D.; Carrera, P.; Pietrini, G. und Bassetti, M. (1996) A role for *N*-myristoylation in protein targeting: NADH-cytochrome b₅ reductase requires myristic acid for association with outer mitochondrial but not ER membranes. *J. Cell Biol.* 135, 1501-1513

- (108) Bernheim, M. L. (1972) The reduction of hydroxylamine and some aryl hydroxamates by liver mitochondria from mammals and birds. *Enzymologia*. 43, 167–176
- (109) Kurian, J. R.; Longlais, B. J. und Trepanier, L. A. (2007) Discovery and characterization of a cytochrome b₅ variant in humans with impaired hydroxylamine reduction capacity. *Pharmacogenet. Genomics*. 17, 597–603
- (110) Rhoads, K.; Sacco, J. C.; Drescher, N.; Wong, A. und Trepanier, L. A. (2011) Individual variability in the detoxification of carcinogenic arylhydroxylamines in human breast. *Toxicol. Sci.* 121, 245–256
- (111) Sacco, J. C.; Abouraya, M.; Motsinger-Reif, A.; Yale, S. H.; McCarty, C. A. und Trepanier, L. A. (2012) Evaluation of polymorphisms in the sulfonamide detoxification genes NAT2, CYB5A, and CYB5R3 in patients with sulfonamide hypersensitivity. *Pharmacogenet. Genomics*. 22, 733–740
- (112) Wahl, B. (2010) Grundlegende Charakterisierung des neuen Molybdo-Enzyms 'Mitochondrial Amidoxime Reducing Component' mARC in *Homo sapiens* und *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation*. TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- (113) Auchus, R. J.; Lee, T. C. und Miller, W. L. (1998) Cytochrome b₅ augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J. Biol. Chem.* 273, 3158–3165
- (114) Kotrbová, V.; Aimová, D.; Ingr, M.; Borek-Dohalská, L.; Martínek, V. und Stiborová, M. (2009) Preparation of a biologically active apo-cytochrome b₅ via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 66, 203–209
- (115) Yamazaki, H.; Shimada, T.; Martin, M. V. und Guengerich, F. P. (2001) Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b₅: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b₅ or heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* 276, 30885–30891
- (116) Barrett, J. C. (1981) Induction of gene mutation in and cell transformation of mammalian cells by modified purines: 2-aminopurine and 6-*N*-hydroxylaminopurine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5685–5689
- (117) Kozmin, S. G.; Schaaper, R. M.; Shcherbakova, P. V.; Kulikov, V. N.; Noskov, V. N.; Guetsova, M. L.; Alenin, V. V.; Rogozin, I. B.; Makarova, K. S. und Pavlov, Y. I. (1998) Multiple antimutagenesis mechanisms affect mutagenic activity and specificity of the base analog 6-*N*-hydroxylaminopurine in bacteria and yeast. *Mutat. Res.* 402, 41–50
- (118) Krüger, P. (1885) Ueber Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 18, 1053–1060
- (119) Schwering, U. (2010) Transport- und Biotransformationsstudien mit Amidinprodrugs. *Dissertation*. CAU zu Kiel

- (120) Nixon, M. C. und Lamb, A. B. (1945) Resazurin test for grading raw milk. *Can J Comp Med Vet Sci.* 9, 18–23
- (121) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T. und Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426
- (122) Ott, G. (2013) Untersuchungen zu genetischen Variationen im mARC-haltigen N-reduktiven Enzymsystem. *Dissertation.* CAU zu Kiel
- (123) Krompholz, N. (2013) Reduktion von aliphatischen Amidoximen und N-hydroxylierten Basenanaloga durch neue molybdänhaltige Enzymsysteme. *Dissertation.* CAU zu Kiel
- (124) Too, K.; Brown, D. M.; Loakes, D.; Bongard, E. und Vivas, L. (2007) *In vitro* anti-malarial activity of N⁶-modified purine analogs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 26, 579–583
- (125) Giner-Sorolla, A.; O'Bryant, S.; Burchenal, J. H. und Bendich, A. (1966) The synthesis and properties of substituted 6-hydroxylaminopurines. *Biochemistry.* 5, 3057–3061
- (126) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85
- (127) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685
- (128) McLaughlin, L. A.; Ronseaux, S.; Finn, R. D.; Henderson, C. J. und Roland Wolf, C. (2010) Deletion of microsomal cytochrome b₅ profoundly affects hepatic and extrahepatic drug metabolism. *Mol. Pharmacol.* 78, 269–278
- (129) Whitby, L. G. (1953) A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* 54, 437–442
- (130) Estabrook, R. W. und Werringloer, J. (1978) The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Meth. Enzymol.* 52, 212–220
- (131) Teale, F. W. (1959) Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. *Biochim. Biophys. Acta.* 35, 543
- (132) Mulrooney, S. B. und Waskell, L. (2000) High-level expression in *Escherichia coli* and purification of the membrane-bound form of cytochrome b₅. *Protein Expr. Purif.* 19, 173–178

- (133) Wyllie, A. H.; Morris, R. G.; Smith, A. L. und Dunlop, D. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67–77
- (134) Toné, S.; Sugimoto, K.; Tanda, K.; Suda, T.; Uehira, K.; Kanouchi, H.; Samejima, K.; Minatogawa, Y. und Earnshaw, W. C. (2007) Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp. Cell Res.* 313, 3635–3644
- (135) Ormerod, M. G.; Sun, X. M.; Brown, D.; Snowden, R. T. und Cohen, G. M. (1993) Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol.* 32, 417–424
- (136) Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L. und Henson, P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216
- (137) Dive, C.; Gregory, C. D.; Phipps, D. J.; Evans, D. L.; Milner, A. E. und Wyllie, A. H. (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta.* 1133, 275–285
- (138) Soldani, C. und Scovassi, A. I. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 7, 321–328
- (139) Chaitanya, G. V.; Steven, A. J. und Babu, P. P. (2010) PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal.* 8, 31
- (140) D'Amours, D.; Desnoyers, S.; D'Silva, I. und Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342, 249–268
- (141) Feng, J. D. und Yeung, P. K. (2000) A simple high-performance liquid chromatography assay for simultaneous measurement of adenosine, guanosine, and the oxypurine metabolites in plasma. *Ther Drug Monit.* 22, 177–183
- (142) Dollinger, M. R. und Krakoff, I. H. (1975) Hemolysis induced by 6-*N*-hydroxylaminopurine riboside, an adenosine analogue. *Clin. Pharmacol. Ther.* 17, 57–65
- (143) Rockwell, M. und Maguire, M. H. (1966) Studies on adenosine deaminase. I. Purification and properties of ox heart adenosine deaminase. *Mol. Pharmacol.* 2, 574–584
- (144) Rodriguez-Maranon, M. J.; Qiu, F.; Stark, R. E.; White, S. P.; Zhang, X.; Foundling, S. I.; Rodriguez, V.; Schilling, C. L. 3.; Bunce, R. A. und Rivera, M. (1996) ¹³C NMR

spectroscopic and X-ray crystallographic study of the role played by mitochondrial cytochrome b₅ heme propionates in the electrostatic binding to cytochrome c. *Biochemistry*. 35, 16378–16390

- (145) Plitzko, B. (2010) Optimierung der in-vitro Rekonstitution des rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystems. *Diplomarbeit*. CAU zu Kiel
- (146) Haghdoost, S.; Sjölander, L.; Czene, S. und Harms-Ringdahl, M. (2006) The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 620–626
- (147) Ohshima, H.; Sawa, T. und Akaike, T. (2006) 8-nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence, and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1033–1045
- (148) McCartney, M.; McCoy, E. C.; Rosenkranz, H. S. und Giner-Sorolla, A. (1985) Carcinogenic *N*-hydroxylaminopurine derivatives do not act as base analog mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 144, 231–237
- (149) Clement, B. und Kunze, T. (1992) The reduction of 6-*N*-hydroxylaminopurine to adenine by xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol* 44, 1501–1509
- (150) Kozmin, S. G. und Schaaper, R. M. (2007) Molybdenum cofactor-dependent resistance to *N*-hydroxylated base analogs in *Escherichia coli* is independent of MobA function. *Mutat. Res.* 619, 9–15
- (151) Kozmin, S. G.; Stepchenkova, E. I.; Chow, S. C. und Schaaper, R. M. (2013) A critical role for the putative NCS2 nucleobase permease YjcD in the sensitivity of *Escherichia coli* to cytotoxic and mutagenic purine analogs. *Mbio.* 4, e00661-13
- (152) Kong, W.; Engel, K. und Wang, J. (2004) Mammalian nucleoside transporters. *Curr. Drug Metab.* 5, 63–84
- (153) Yao, Sylvia Y M; Ng, Amy M L; Cass, C. E.; Baldwin, S. A. und Young, J. D. (2011) Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J. Biol. Chem.* 286, 32552–32562
- (154) Salati, L. M.; Gross, C. J.; Henderson, L. M. und Savaiano, D. A. (1984) Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-monophosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine. *J. Nutr.* 114, 753–760
- (155) Hashimoto, H.; Kubota, M.; Shimizu, T.; Takimoto, T.; Kitoh, T.; Akiyama, Y. und Mikawa, H. (1990) Biochemical basis of the prevention of 6-thiopurine toxicity by the nucleobases, hypoxanthine and adenine. *Leuk. Res.* 14, 1061-1066

- (156) Sartorelli, A. C.; Bieber, A. L.; Chang, P. K. und Fischer, G. A. (1964) Some inhibitory properties of 6-*N*-hydroxylaminopurine: an analog of adenine and hypoxanthine. *Biochem. Pharmacol.* 13, 507–515
- (157) Wagner, S. A.; Beli, P.; Weinert, B. T.; Nielsen, M. L.; Cox, J.; Mann, M. und Choudhary, C. (2011) A proteome-wide, quantitative survey of *in vivo* ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol. Cell Proteomics.* 10, M111.013284
- (158) Shahni, R. (2011) The role of two novel genes, NSA2 and CDK7, in diabetic nephropathy. *Dissertation.* School of Medicine, King's College London
- (159) Cristalli, G.; Vittori, S.; Eleuteri, A.; Grifantini, M.; Volpini, R.; Lupidi, G.; Capolongo, L. und Pesenti, E. (1991) Purine and 1-deazapurine ribonucleosides and deoxyribonucleosides: synthesis and biological activity. *J. Med. Chem.* 34, 2226–2230
- (160) Pflieger, K.; Niederau, D. und Volkmer, I. (1969) Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus von Dipyridamol: Hemmung der Adenosinaufnahme in Erythrocyten durch Dipyridamol. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 265, 118–130
- (161) Su, A. I.; Wiltshire, T.; Batalov, S.; Lapp, H.; Ching, K. A.; Block, D.; Zhang, J.; Soden, R.; Hayakawa, M.; Kreiman, G.; Cooke, M. P.; Walker, J. R. und Hogenesch, J. B. (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6062–6067
- (162) Lattin, J. E.; Schroder, K.; Su, A. I.; Walker, J. R.; Zhang, J.; Wiltshire, T.; Saijo, K.; Glass, C. K.; Hume, D. A.; Kellie, S. und Sweet, M. J. (2008) Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome Res.* 4, 5

Anhang

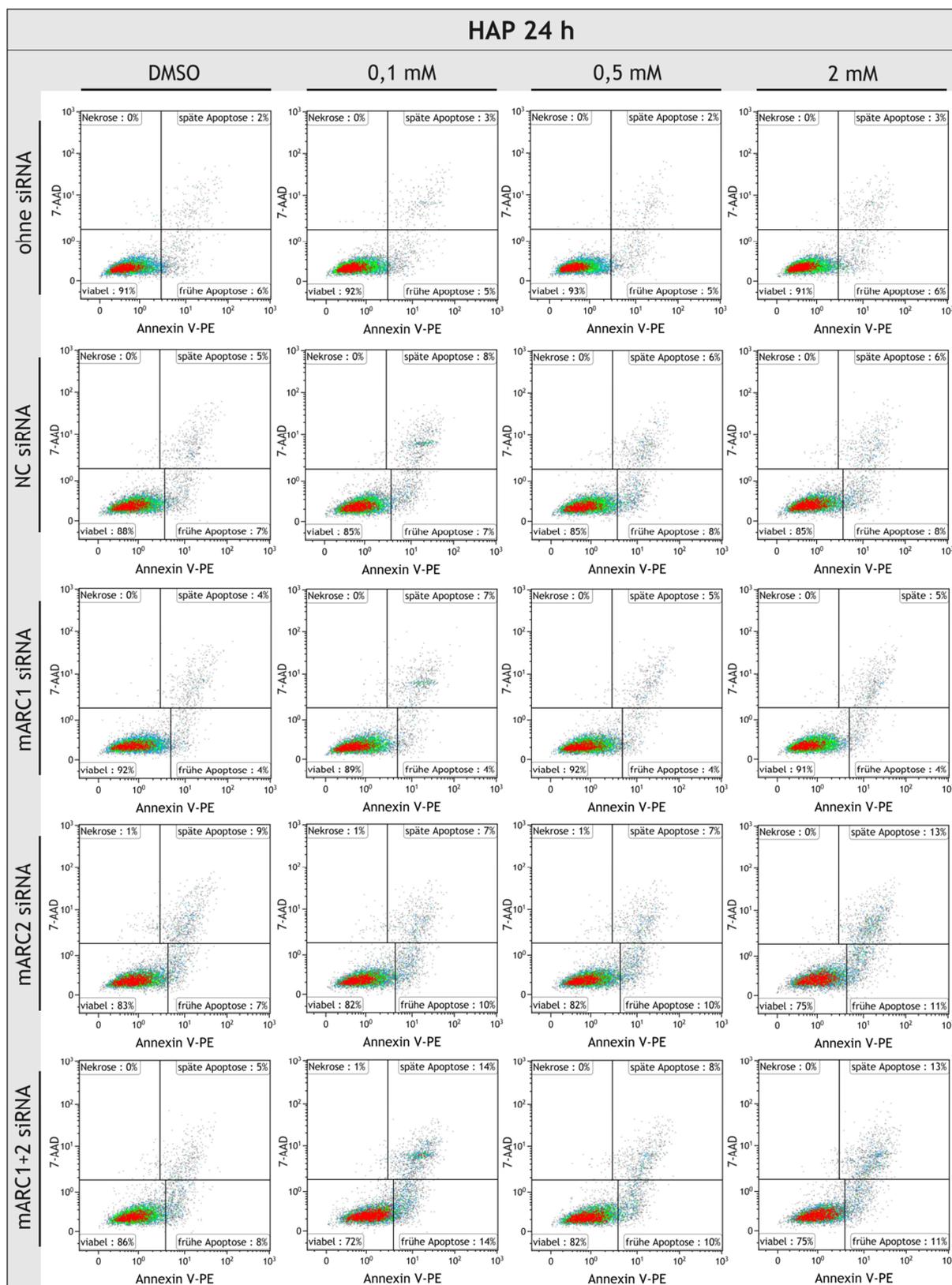


Abb. I: Fluoreszenz-Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse nach 24 h Kultivierung unter HAP-Einfluss und anschließender Annexin V-PE/7-AAD-Färbung.

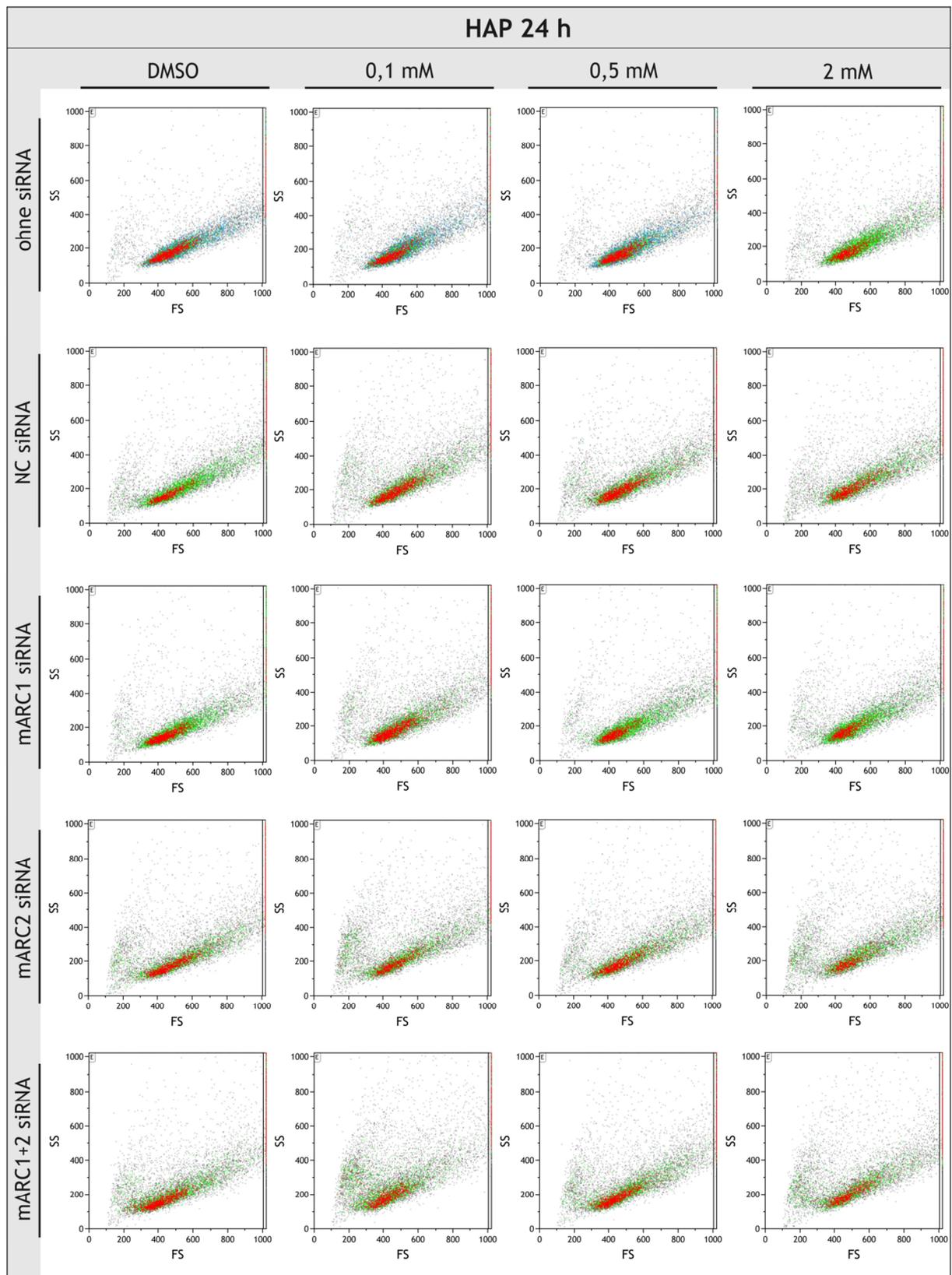


Abb. II: Streulicht-Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse nach 24 h Kultivierung unter HAP-Einfluss.

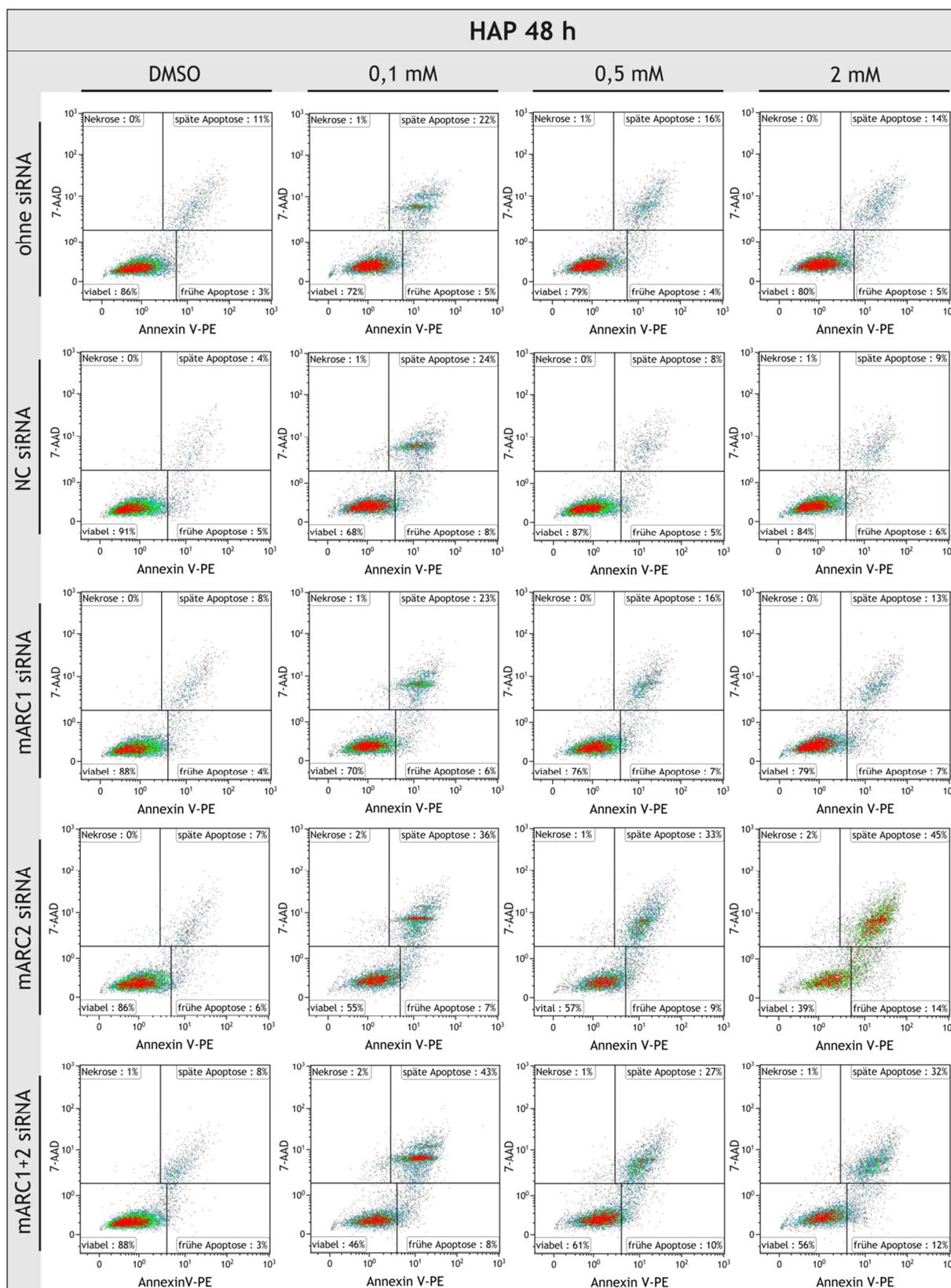


Abb. III: Fluoreszenz-Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse nach 48 h Kultivierung unter HAP-Einfluss und anschließender Annexin V-PE/7-AAD-Färbung.

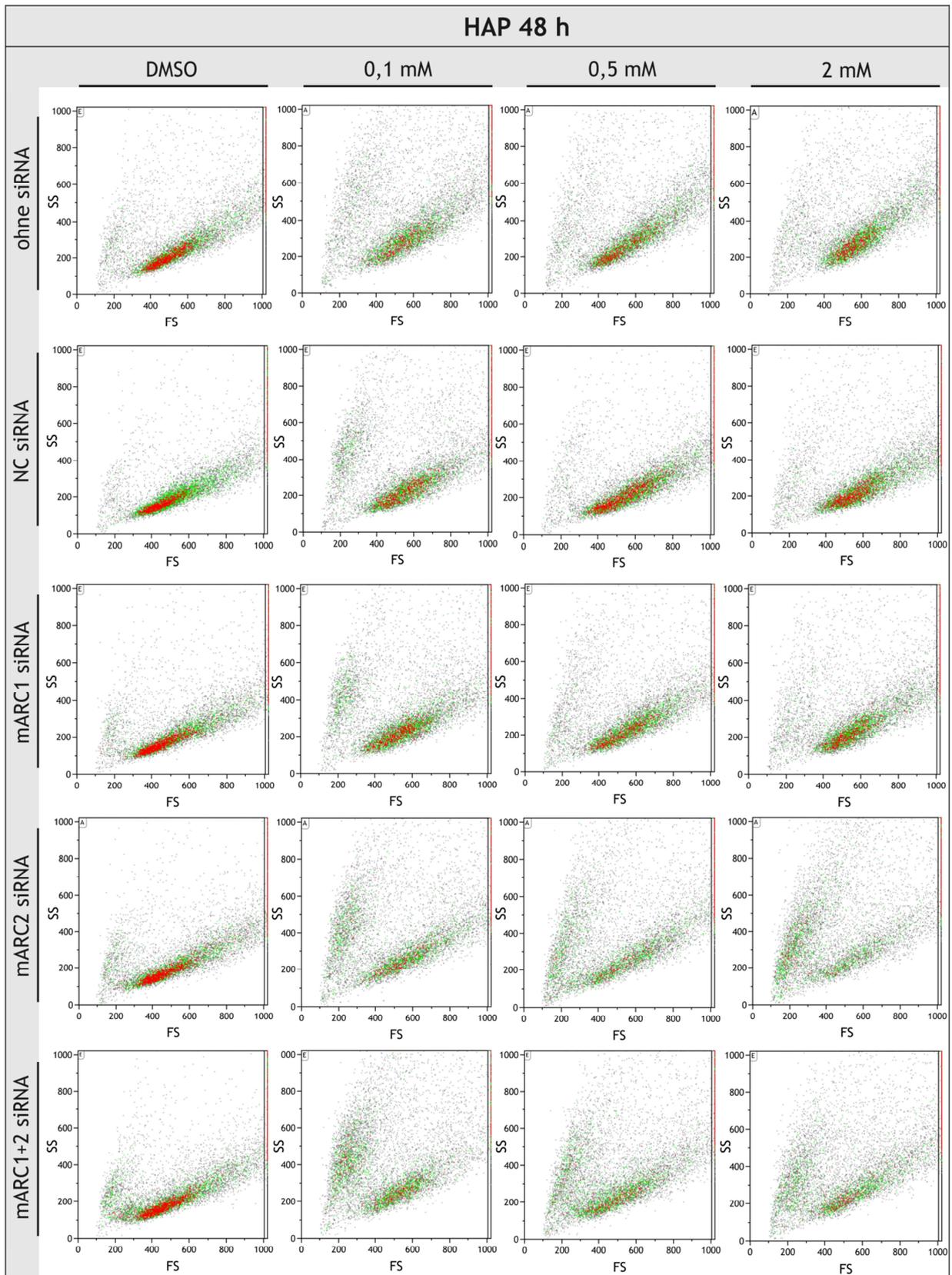


Abb. IV: Streulicht-Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse nach 48 h Kultivierung unter HAP-Einfluss.

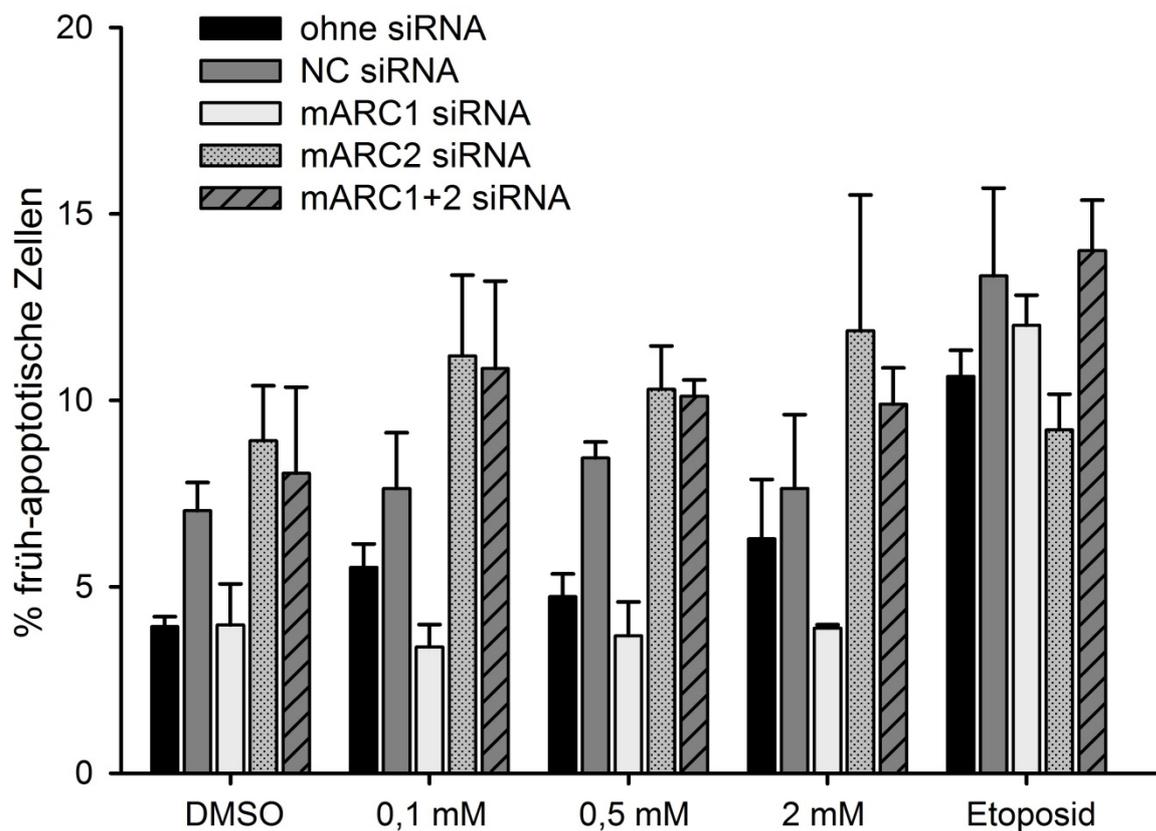


Abb. V: Anteil der früh-apoptotischen Zellen nach 24 h Kultivierung in Gegenwart von HAP.

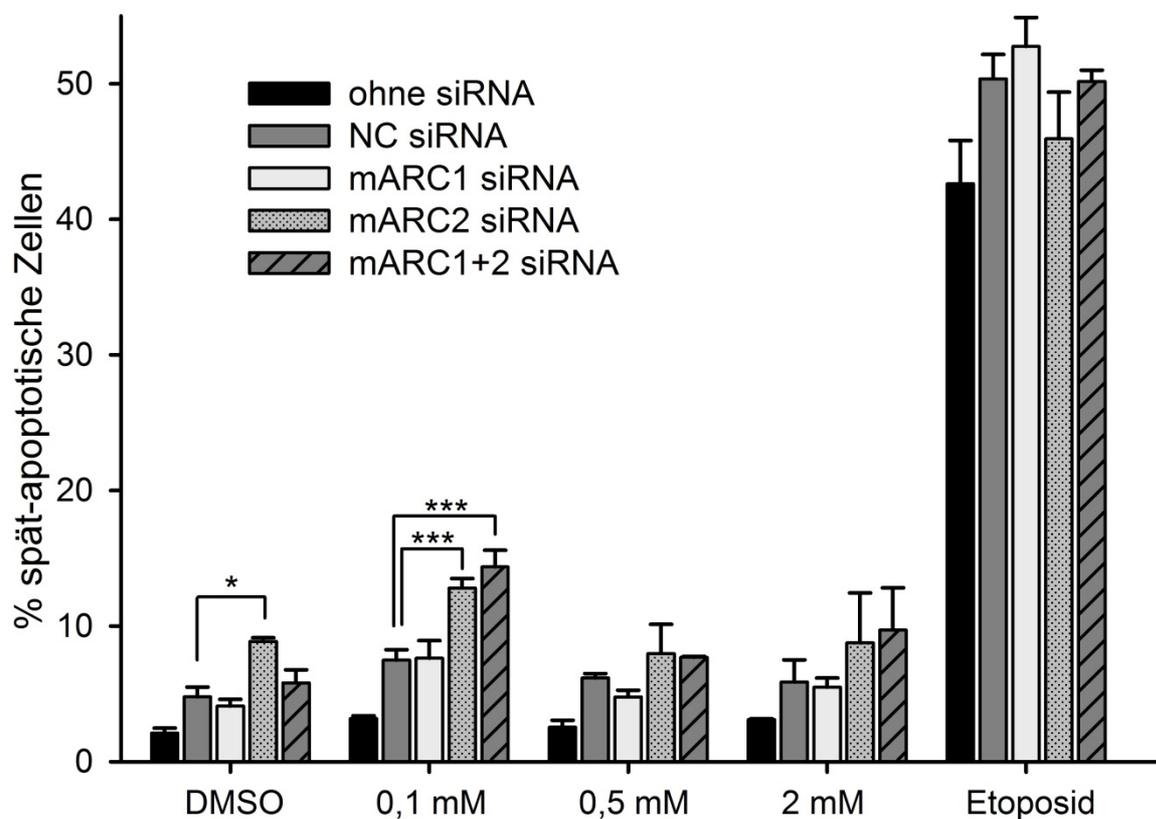


Abb. VI: Anteil der spät-apoptotischen Zellen nach 24 h Kultivierung in Gegenwart von HAP.

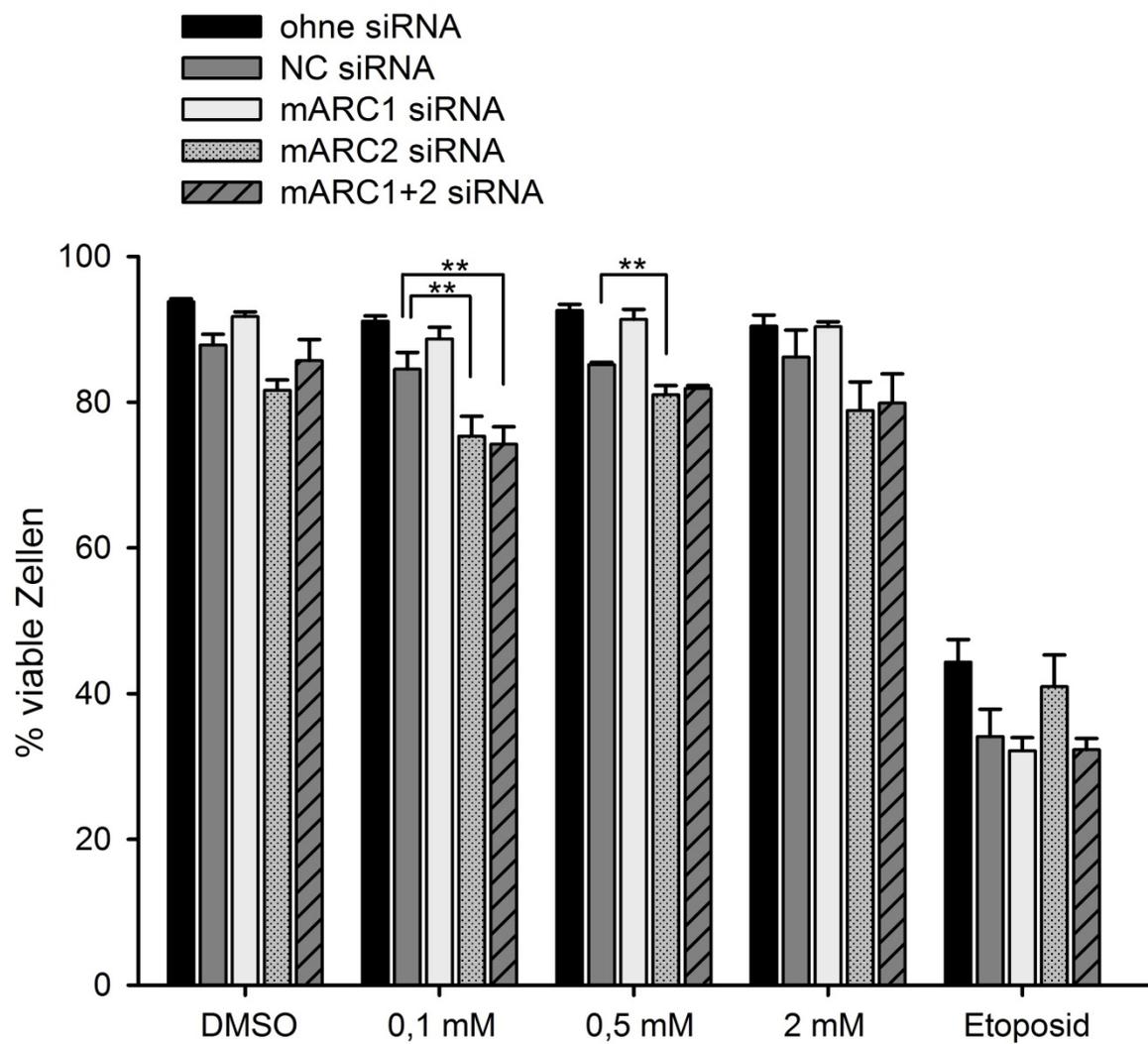


Abb. VII: Anteil der viablen Zellen nach 24 h Kultivierung in Gegenwart von HAP.

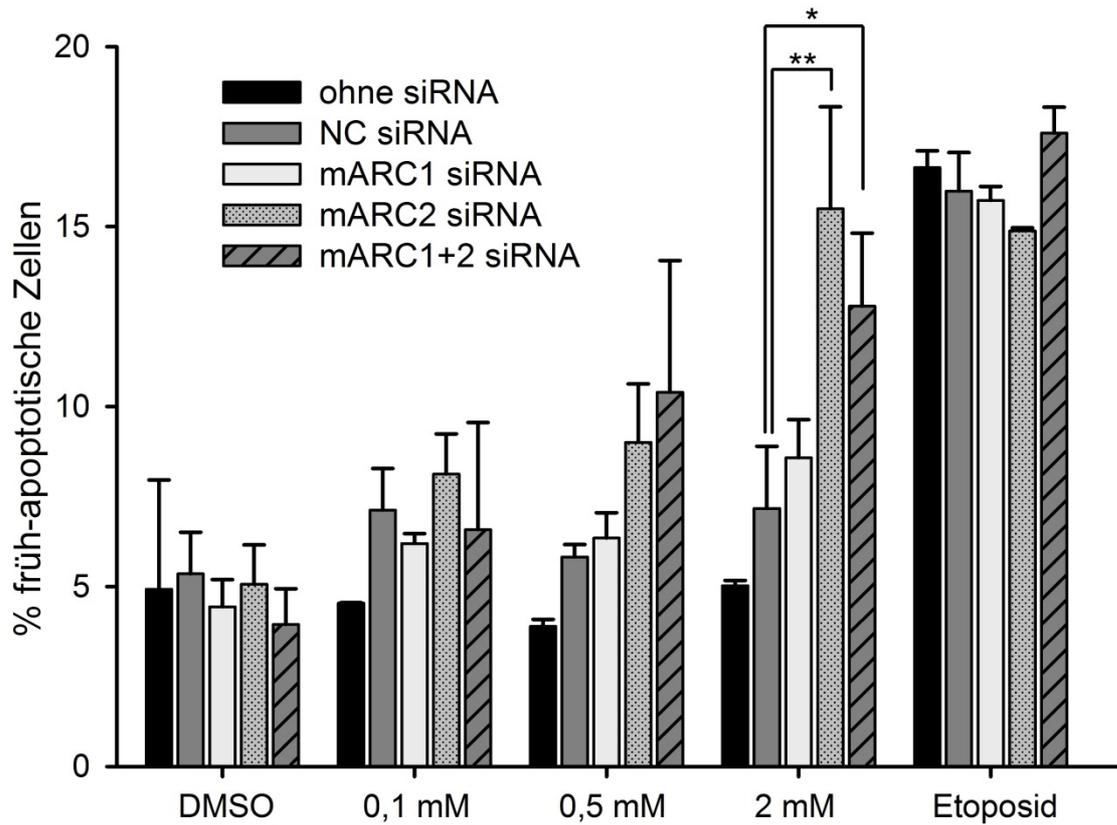


Abb. VIII: Anteil der früh-apoptotischen Zellen nach 48 h Kultivierung in Gegenwart von HAP.

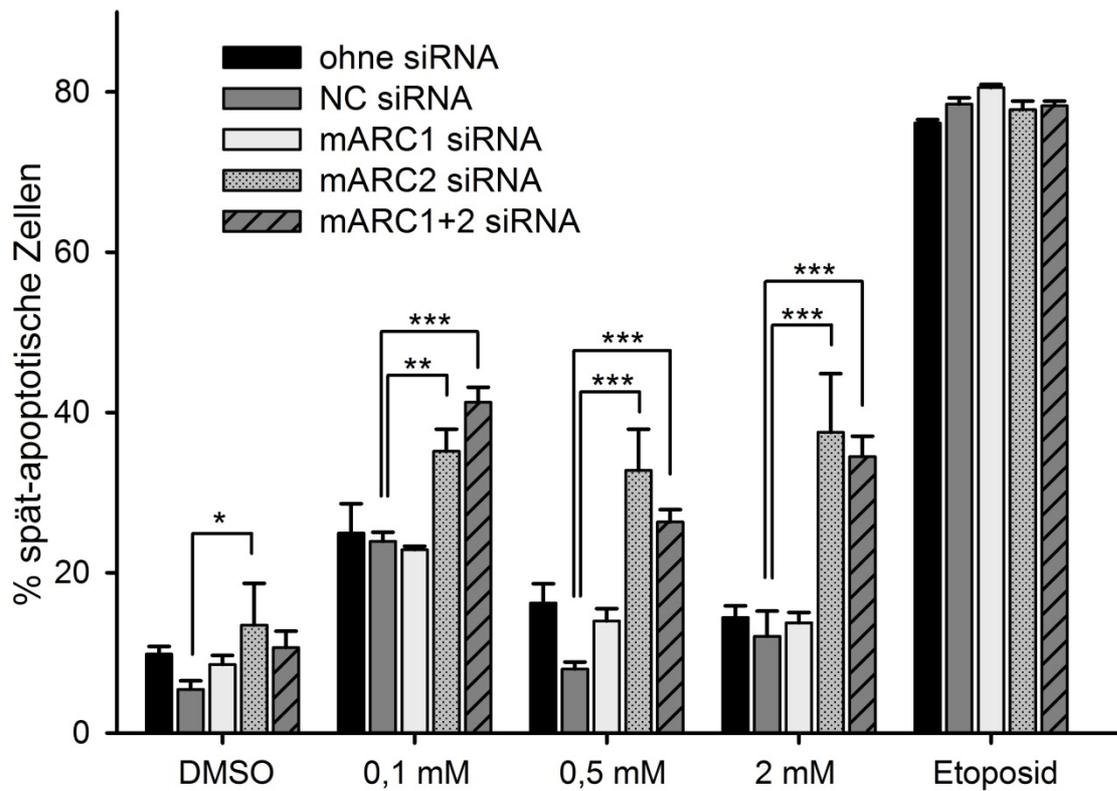


Abb. IX: Anteil der spät-apoptotischen Zellen nach 48 h Kultivierung in Gegenwart von HAP.

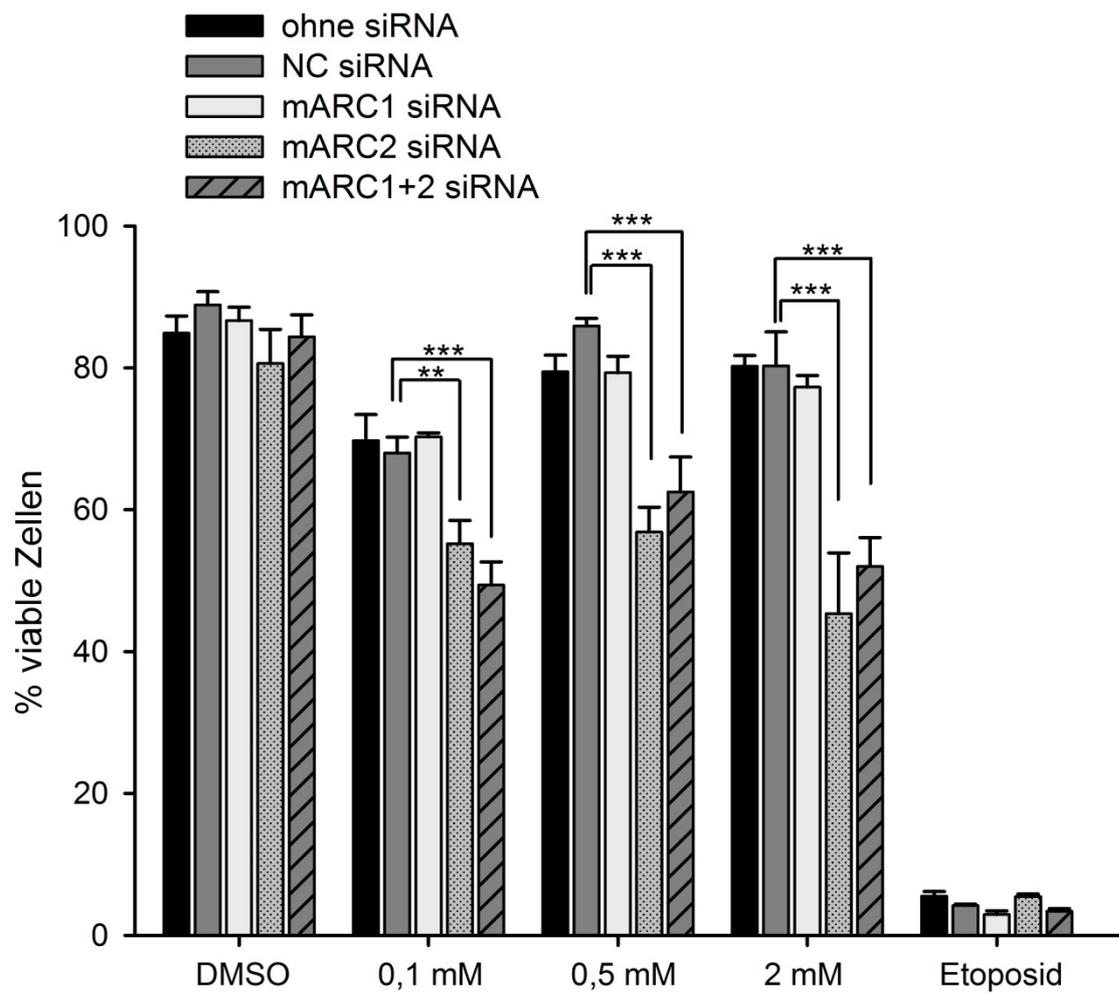


Abb. X: Anteil der viable Zellen nach 48 h Kultivierung in Gegenwart von HAP.

	(%)	ohne siRNA	NC siRNA	mARC1 siRNA	mARC2 siRNA	mARC1+2 siRNA
DMSO	viabel	94±0	88±2	92±1	82±1	86±3
	früh-apoptot.	4±0	7±1	4±1	9±2	8±2
	spät-apoptot.	2±0	5±1	4±1	9±0	6±1
	gesamt-apoptot.	6±0	12±1	8±1	18±2	14±3
	prim. Nekrose	0±0	0±0	0±0	1±0	0±0
0,1 mM	viabel	91±1	85±2	89±2	75±3	74±2
	früh-apoptot.	6±1	8±2	4±1	11±2	11±2
	spät-apoptot.	3±0	8±1	8±1	13±1	14±1
	gesamt-apoptot.	9±1	15±2	11±2	24±3	25±2
	prim. Nekrose	0±0	0±0	0±0	1±0	1±0
0,5 mM	viabel	93±1	85±0	91±1	81±1	82±0
	früh-apoptot.	5±1	9±0	4±1	10±1	10±0
	spät-apoptot.	3±1	6±0	5±1	8±2	8±0
	gesamt-apoptot.	7±1	15±0	9±1	18±1	18±0
	prim. Nekrose	0±0	0±0	0±0	1±0	0±0
2 mM	viabel	91±2	86±4	90±1	79±4	80±4
	früh-apoptot.	6±2	8±2	4±0	12±4	10±1
	spät-apoptot.	3±0	6±2	6±1	9±4	10±3
	gesamt-apoptot.	9±2	14±4	9±1	21±4	20±4
	prim. Nekrose	0±0	0±0	0±0	1±0	1±0
Etoposid	viabel	44±3	34±4	32±2	41±4	32±2
	früh-apoptot.	11±1	13±2	12±1	9±1	14±1
	spät-apoptot.	43±3	50±2	53±2	46±3	50±1
	gesamt-apoptot.	53±3	64±4	65±2	55±4	64±2
	prim. Nekrose	2±1	2±0	3±0	4±0	4±0

Tab. I: Durchflusszytometrische Analyse nach 24 h Kultivierung in Gegenwart von HAP. HeLa Zellen wurden mit der in 3.1.10.1 beschriebenen Methode nach Annexin V -PE/7-AAD Färbung mittels Durchflusszytometrie vermessen. Quantifiziert wurden die Populationen durch das Legen von Gates, deren Grenzen mit Hilfe von mit nur Annexin V-PE oder nur 7-AAD gefärbten Zellen gesetzt wurden. Viable Zellen: Annexin V-PE negativ/7-AAD negativ; früh-apoptotische Zellen: Annexin V-PE positiv/7-AAD negativ; spät-apoptotische Zellen: Annexin V-PE/7-AAD positiv, primär nekrotische Zellen: Annexin V-PE negativ/7-AAD positiv.

	(%)	ohne siRNA	NC siRNA	mARC1 siRNA	mARC2 siRNA	mARC1+2 siRNA
DMSO	viabel	85±2	89±2	87±2	81±5	84±3
	früh-apoptot.	5±3	5±1	4±1	5±1	4±1
	spät-apoptot.	10±1	5±1	9±1	13±5	11±2
	gesamt-apoptot.	15±3	11±2	13±2	19±4	15±3
	prim. Nekrose	0±0	0±0	0±0	1±0	1±1
0,1 mM	viabel	70±4	68±2	70±1	55±3	49±3
	früh-apoptot.	5±0	7±1	6±0	8±1	7±3
	spät-apoptot.	25±4	24±1	23±0	35±3	41±2
	gesamt-apoptot.	29±4	31±2	29±1	43±4	48±4
	prim. Nekrose	1±0	1±0	1±0	2±0	3±1
0,5 mM	viabel	80±2	86±1	79±2	57±4	63±5
	früh-apoptot.	4±0	6±0	6±1	9±2	10±4
	spät-apoptot.	16±2	8±1	14±2	33±5	26±2
	gesamt-apoptot.	20±2	14±1	20±2	42±4	37±5
	prim. Nekrose	0±0	0±0	0±0	1±0	1±0
2 mM	viabel	80±2	80±5	77±2	45±9	52±4
	früh-apoptot.	5±0	7±2	9±1	16±3	13±2
	spät-apoptot.	14±2	12±3	14±1	38±7	35±3
	gesamt-apoptot.	19±2	19±5	22±2	53±8	47±4
	prim. Nekrose	0±0	1±0	0±0	2±0	1±0
Etoposid	viabel	6±1	4±0	3±1	5±0	3±0
	früh-apoptot.	17±1	16±1	16±0	15±0	18±1
	spät-apoptot.	76±0	79±1	81±0	78±1	78±1
	gesamt-apoptot.	93±1	94±0	96±1	93±1	96±1
	prim. Nekrose	2±0	1±0	1±0	2±1	1±0

Tab. II: Durchflusszytometrische Analyse nach 48 h Kultivierung in Gegenwart von HAP. HeLa Zellen wurden mit der in 3.1.10.1 beschriebenen Methode nach Annexin V-PE/7-AAD Färbung mittels Durchflusszytometrie vermessen. Quantifiziert wurden die Populationen durch das Legen von Gates, deren Grenzen mit Hilfe von mit nur Annexin V-PE oder nur 7-AAD gefärbten Zellen gesetzt wurden. Viable Zellen: Annexin V-PE negativ/7-AAD negativ; früh-apoptotische Zellen: Annexin V-PE positiv/7-AAD negativ; spät-apoptotische Zellen: Annexin V-PE/7-AAD positiv, primär nekrotische Zellen: Annexin V-PE negativ/7-AAD positiv.

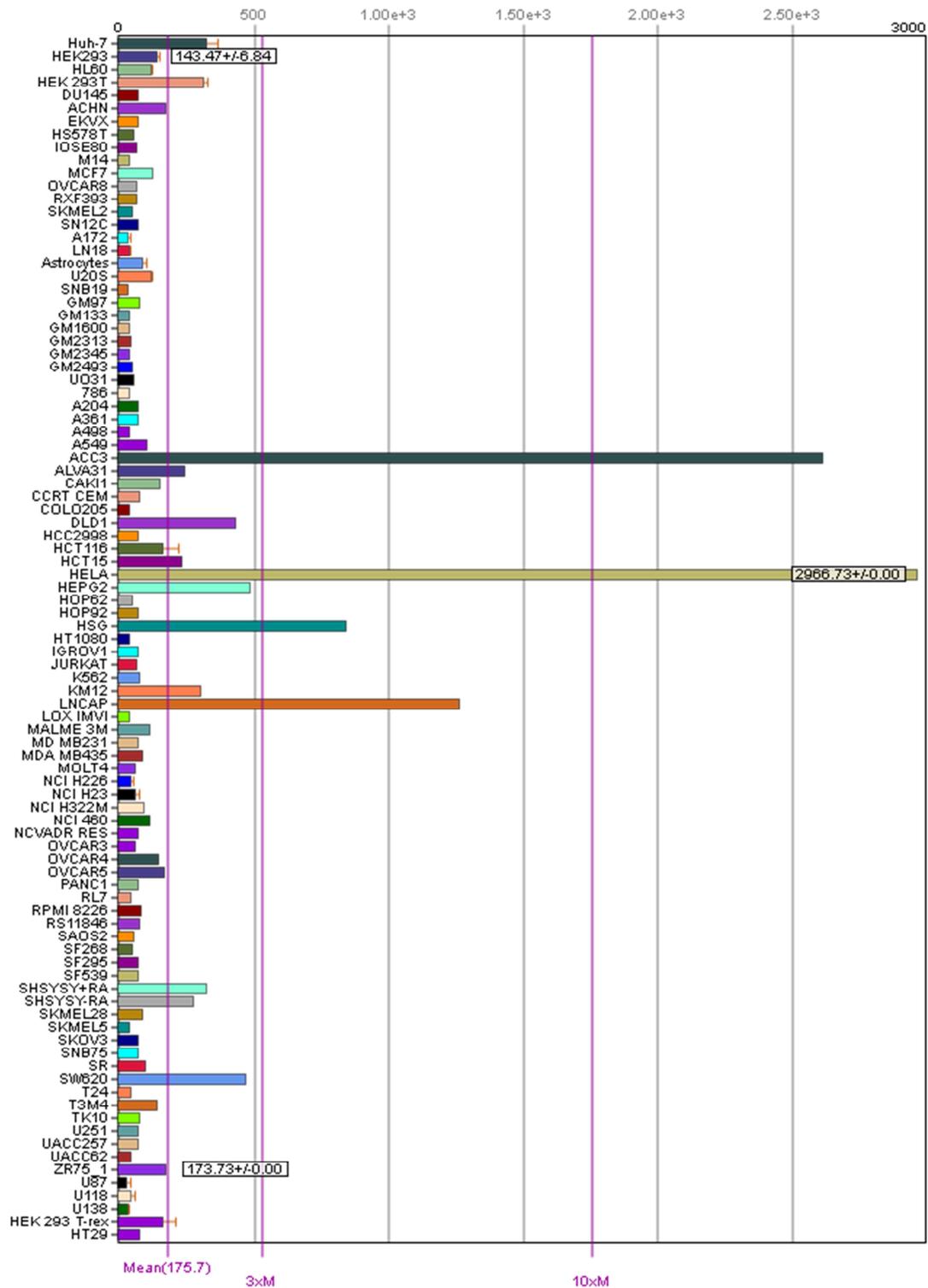


Abb. XI: mARC1 Genexpression humaner NCI60 Zelllinien. <http://biogps.org/gene/64757/>. Die Expressionsdaten der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind markiert.

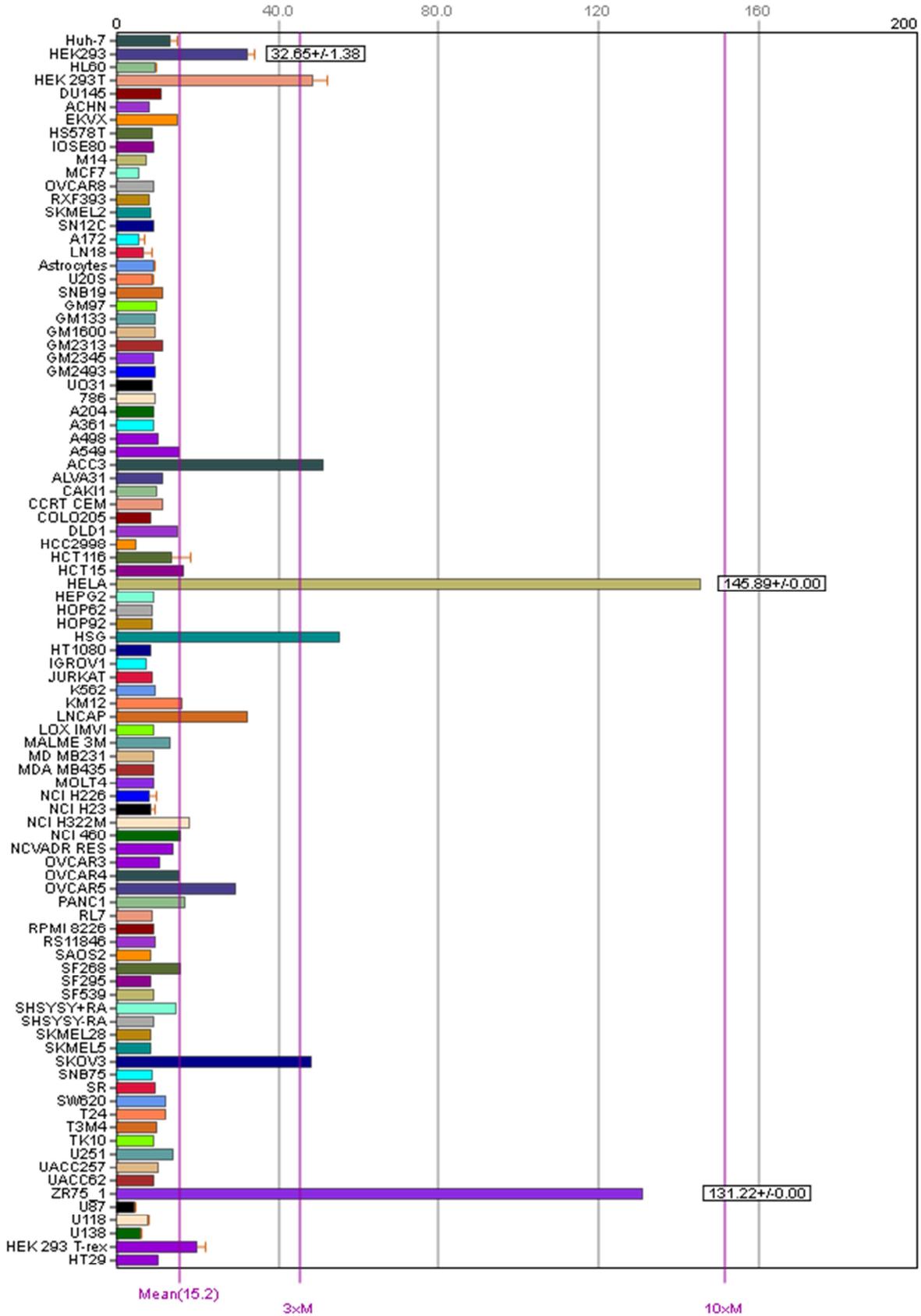


Abb. XII: mARC2 Genexpression humaner NCI60 Zelllinien. <http://biogps.org/gene/54996/>. Daten der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind markiert.

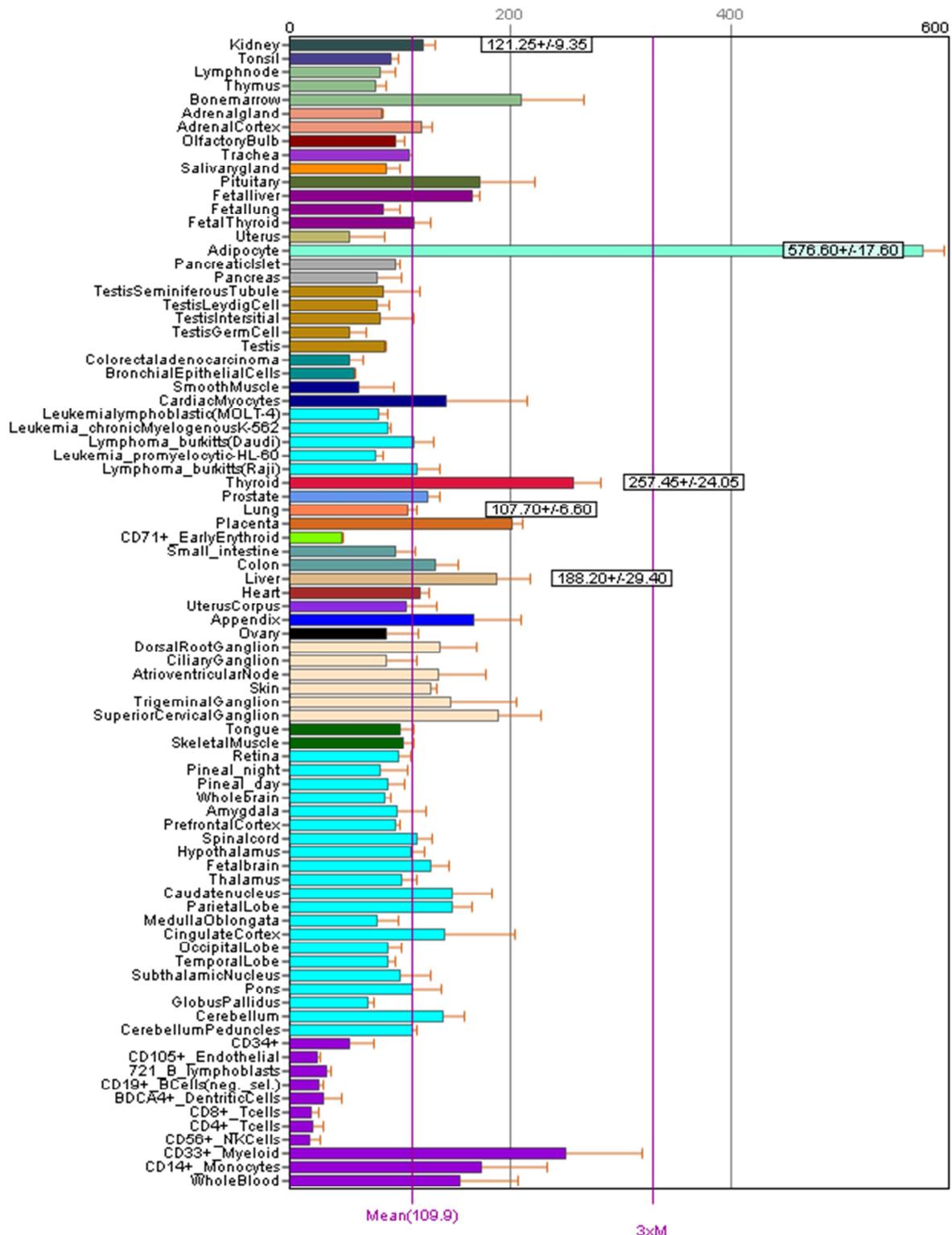


Abb. XIII: mARN1 Genexpression humaner Gewebe. <http://biogps.org/gene/64757/>. Daten einiger Gewebe von Interesse sind markiert. Datenset aus Su *et al.*⁽¹⁶¹⁾.

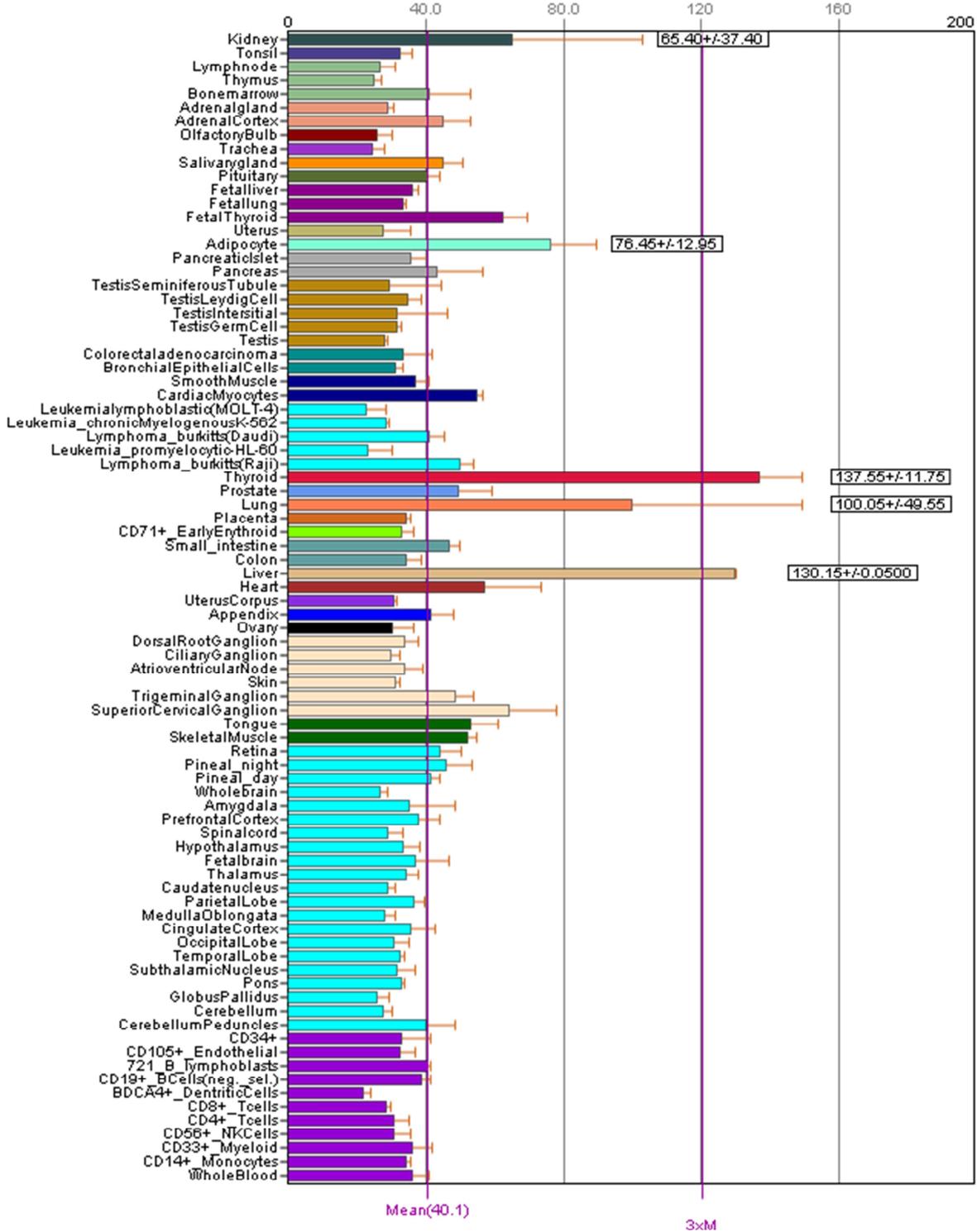


Abb. XIV: mARC2 Genexpression humaner Gewebe. <http://biogps.org/gene/54996/>. Daten einiger Gewebe von Interesse sind markiert. Datenset aus Su *et al.*⁽¹⁶¹⁾.

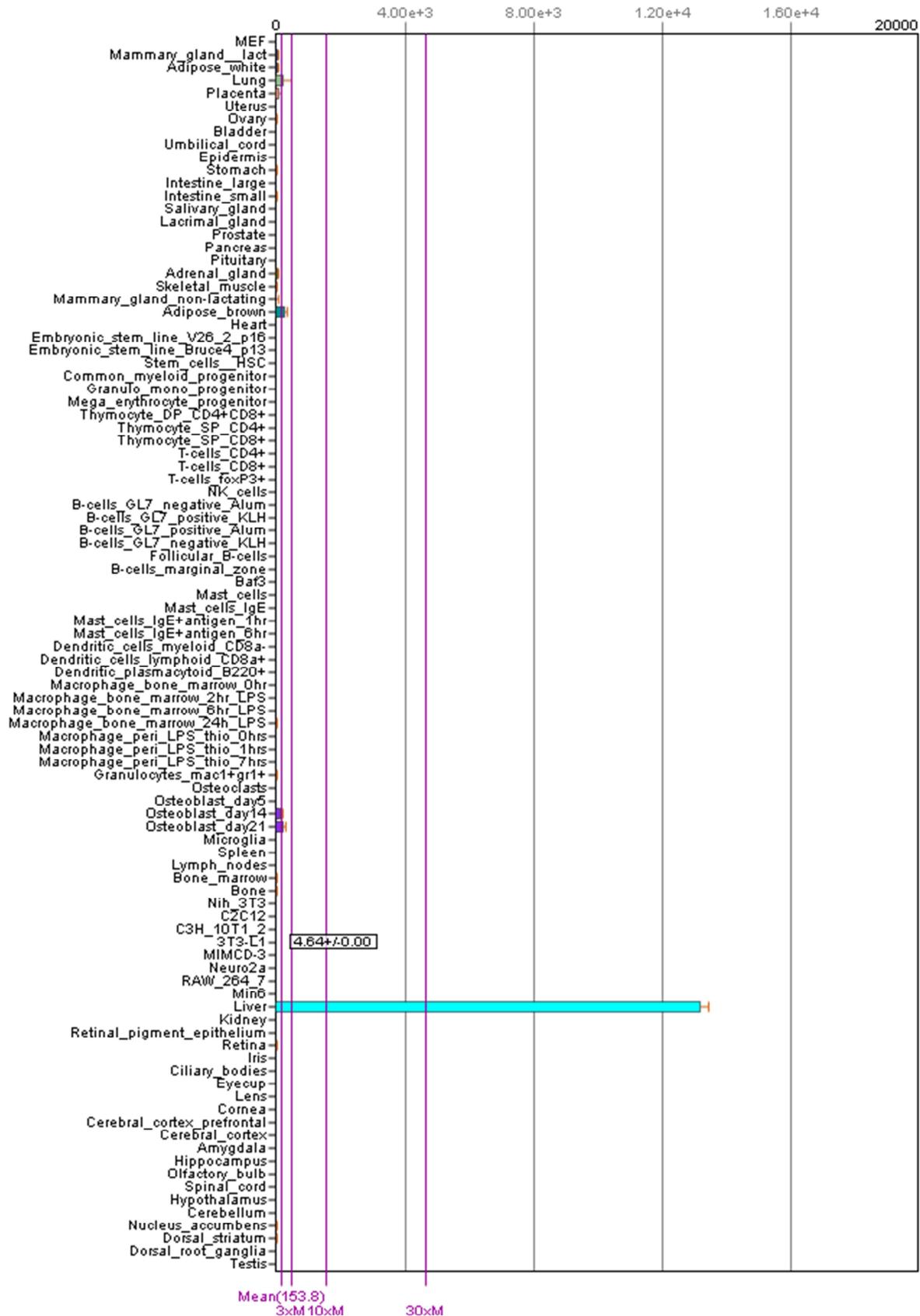


Abb. XV: mARC1 Genexpression muriner Gewebe und Zelllinien. <http://biogps.org/gene/66112/>. Markiert ist die von Neve *et al.* verwendete Zelllinie 3T3-L1 ⁽⁷⁵⁾. Datenset u.a. aus Lattin *et al.* ⁽¹⁶²⁾.

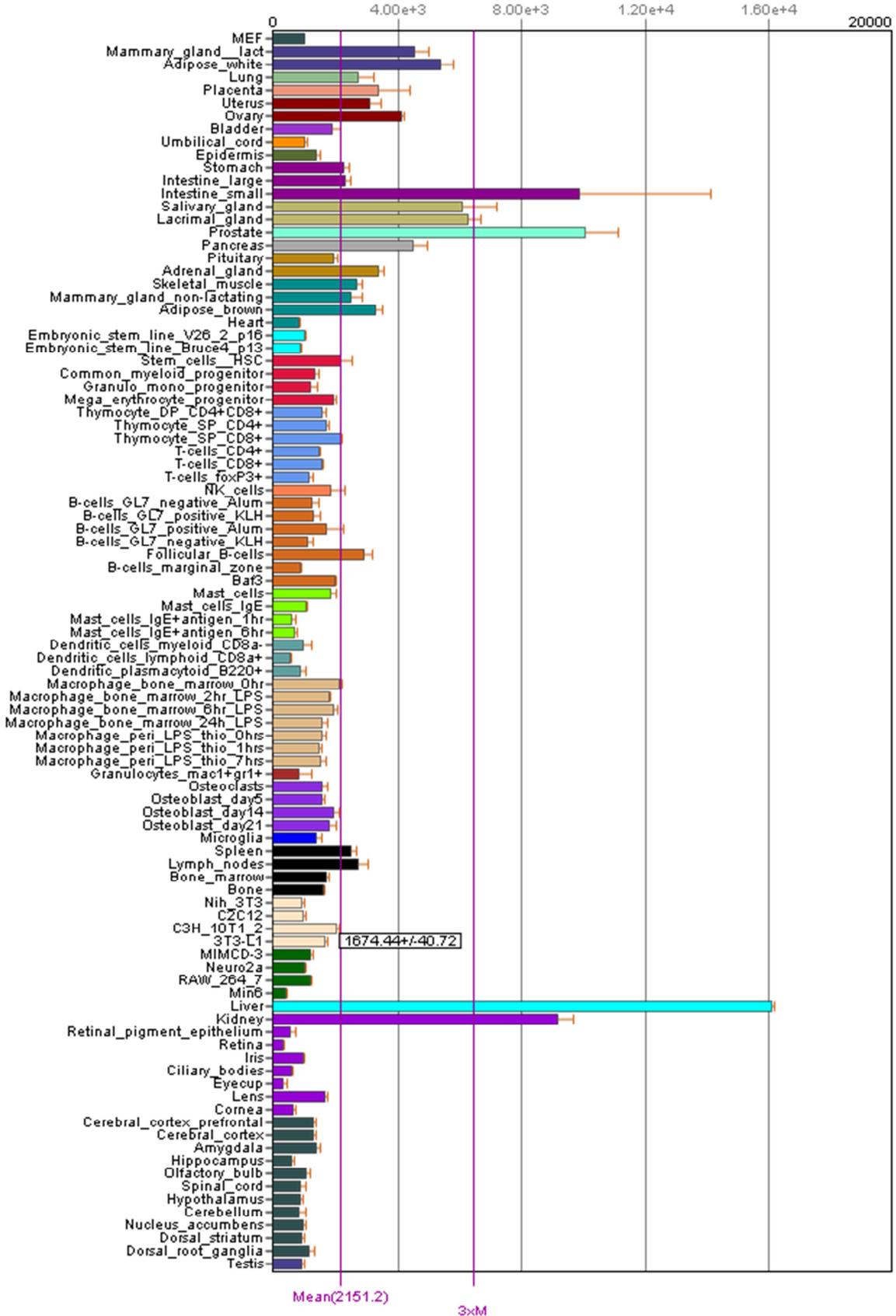


Abb. XVI: mARC2 Genexpression muriner Gewebe und Zelllinien. <http://biogps.org/gene/67247/>. Markiert ist die von Neve *et al.* verwendete Zelllinie 3T3-L1 ⁽⁷⁵⁾. Datenset u.a. aus Lattin *et al.* ⁽¹⁶²⁾.

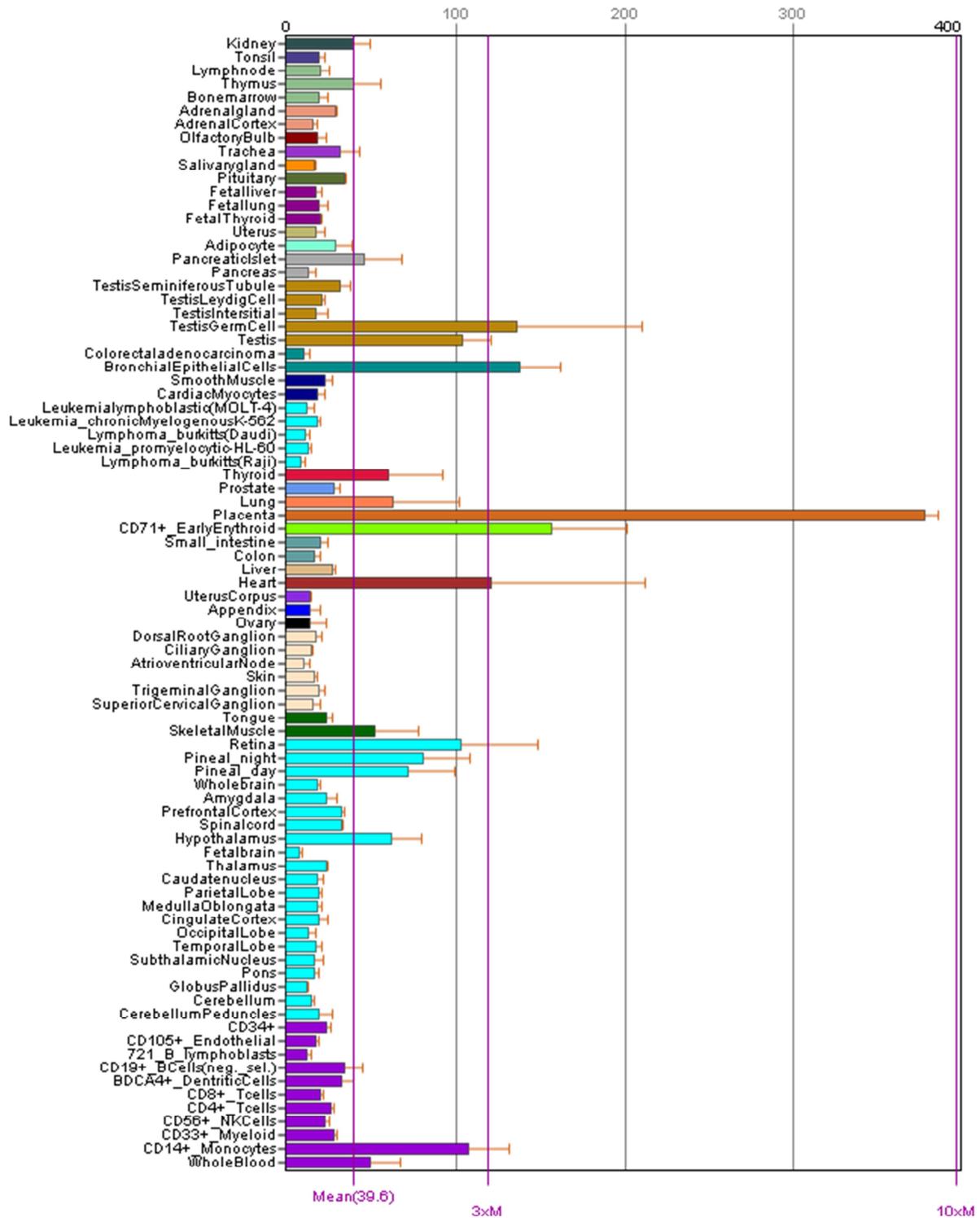


Abb. XVII: CYB5R1 Genexpression humaner Gewebe. <http://biogps.org/gene/51706/>. Datenset aus Su *et al.*⁽¹⁶¹⁾



Abb. XVIII: CYB5R2 Genexpression humaner Gewebe. <http://biogps.org/gene/51700/>. Datenset aus Su *et al.*⁽¹⁶¹⁾

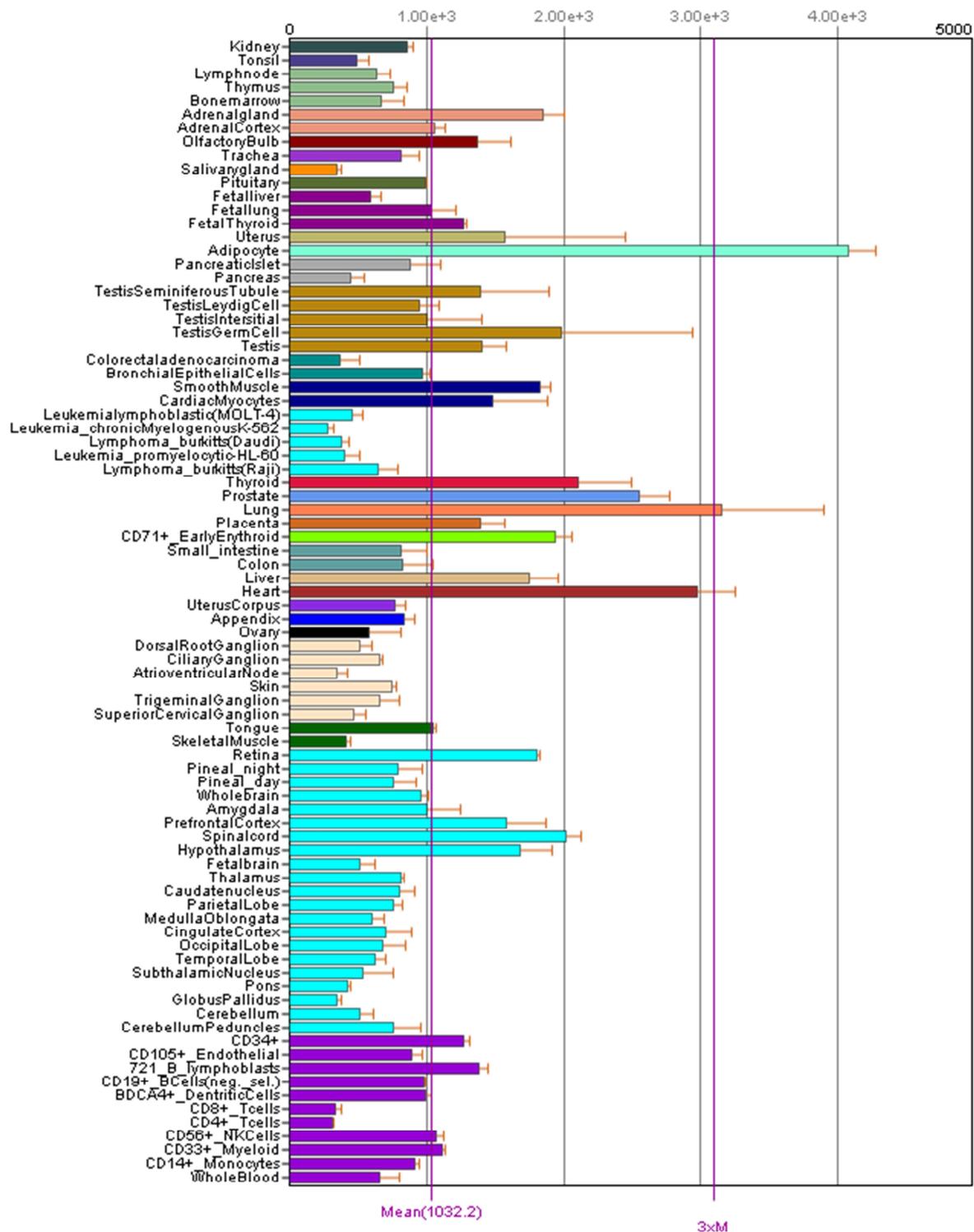


Abb. XIX: CYB5R3 Genexpression humaner Gewebe. <http://biogps.org/gene/1727/>. Datenset aus Su *et al.*⁽¹⁶¹⁾

Erklärung zu §7 der Promotionsordnung

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

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

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht worden:

Publikationen:

Plitzko, B.; Ott, G.; Reichmann, D.; Henderson, C. J.; Wolf, C. R.; Mendel, R. R.; Bittner, F.; Clement, B.; Havemeyer, A. (2013) The involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2 and mitochondrial cytochrome b₅ in *N*-reductive metabolism in human cells. *J. Biol. Chem.* 288, 20228–20237

Ott, G.; Plitzko, B.; Krischkowski, C.; Reichmann, D.; Bittner, F.; Mendel, R. R.; Kunze, T.; Clement, B.; Havemeyer, A. (2014) Reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine (SMX-HA) by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Chem. Res. Toxicol.* Epub ahead of print

Tagungsbeiträge:

Havemeyer, A.; Krischkowski, C.; Plitzko, B.; Reichmann, D.; Bittner, F.; Mendel, R.; Henderson, C.J.; Wolf, C.R.; Clement, B.: A newly discovered human molybdenum enzyme mARC - involved in drug metabolism. *Poster Präsentation: DPhG Jahrestagung*, Braunschweig 2010.

Plitzko B.; Krischkowski C.; Reichmann, D.; Henderson, C.J.; Wolf, C.R.; Bittner, F.; Mendel, R.; Clement, B.; Havemeyer, A.: Exclusively the mitochondrial isoform of cytochrome b₅ is involved in the mARC-containing enzyme system. *Poster Präsentation: Frontiers in Medicinal Chemistry*, Saarbrücken 2011

Plitzko, B.; Krischkowski, C.; Reichmann, D.; Henderson, C.J.; Wolf, C.R.; Bittner, F.; Mendel, R.; Clement, B.; Havemeyer, A.: Localisation of mARC in the outer mitochondrial membrane. *Poster Präsentation: Molybdenum and Tungsten Enzyme Conference*, Edmonton, Alberta, Canada 2011

Plitzko, B.; Krompholz, N.; Reichmann, D.; Bittner, F.; Mendel, R.; Clement, B.; Havemeyer, A.: Elucidating the role of the mARC-containing enzyme system in human cells by the use of RNAi experiments. *Poster Präsentation: EFMC-ISMIC 2012 Symposium*, Berlin

Plitzko, B.; Reichmann, D.; Bittner, F.; Mendel, R.; Clement, B.; Havemeyer, A.: Involvement of mitochondrial amidoxime reducing components 1 and 2, mitochondrial cytochrome b₅ and NADH-cytochrome b₅ reductase in human *N*-reductive cell metabolism. *Poster Präsentation: Molybdenum and Tungsten Enzymes Conference*, Sintra, Portugal 2013

Kiel, August 2014

Birte Plitzko

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Pharmazeutischen/Medizinischen Chemie des Pharmazeutischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Anleitung von **Herrn Prof. Dr. Bernd Clement** angefertigt.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernd Clement für seine andauernde engagierte Unterstützung und Förderung schon während meines Studiums, des Diploms und schließlich der Zeit der Promotion besonders herzlich danken. Ich danke ihm für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe dieses für mich sehr interessante und vielseitige Thema mit allen Freiheiten bearbeiten zu dürfen und für das mir stets entgegengebrachte Vertrauen.

Als nächstes geht ein besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze für die Anfertigung des Zweitgutachtens, aber noch vielmehr für die vielen wertvollen motivierenden Diskussionen und Anregungen, die mich häufig weitergebracht haben. Auch die originelle sowie lehrreiche Zusammenarbeit im Biochemie Praktikum bei der Studentenbetreuung hat mir immer Freude bereitet.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Antje Havemeyer, die mir schon während meiner Diplomzeit mit ihrer Begeisterungsfähigkeit die biochemischen und zellbiologischen Arbeiten näher gebracht hat. Mit vielen kreativen Ideen hat sie diese Promotionsarbeit ins Rollen gebracht. Vielen Dank für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, stete Unterstützung und gute Zeit.

Für die sehr nette Zusammenarbeit und Bereitstellung der rekombinanten Proteine sowie die unterhaltsamen und konstruktiven Zusammentreffen bei den gemeinsamen Tagungen bedanke ich mich bei PD Dr. Florian Bittner (TU Braunschweig) und seiner Arbeitsgruppe. Bei Prof. Roland Wolf (University of Dundee) bedanke ich mich für die Bereitstellung der CYB5A-Knockout Mausproben.

Vielen, vielen Dank an Antje und an meine Schwester Inken für das wunderbar sorgfältige und überaus hilfreiche zügige Korrekturlesen der kompletten Arbeit!

Sven Wichmann möchte ich für die unzähligen Rettungen bei HPLC-Problemen danken. Petra Köster danke ich vor allem für die Hilfe bei der Bewältigung der Massen an BCA-Bestimmungen und Gel-Produktionen sowie für das absolut beste Labormanagement. Für die Aufnahmen der Zellfotos und den anschließenden heiteren Bearbeitungssessions danke ich Rüdiger Smal herzlich. Tino Schneider möchte ich für die Einarbeitung und Hilfe am Durchflusszytometer danken. Auch bei Dr. Ulrich Girreser möchte ich mich bedanken für seine jederzeit gegebene Hilfsbereitschaft bei analytischen und statistischen Fragen. Als gute Seelen des Instituts und weil sie mit ihren lebenswerten Arten immer gute Laune erzeugt und für ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben, möchte ich mich bei Susanne, Ilka, Kalle und Martin bedanken.

Für die unterhaltsame und angenehme Zusammenarbeit bei der Betreuung des 6. Semesters möchte ich mich auch bei Eva, Helene, Jennifer, Thomas B. und den ehemaligen Stefan, Karin, Nina, Jürke, Niko und Anja K. bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Büropartnerin Carmen bedanken. 4 Jahre haben wir Freud und Leid, Spaß und Frust geteilt. Vor allem die letzten beiden Jahre auf der Sonnenseite haben mir gefallen. Ich kann mir keine angenehmere Partnerin vorstellen!

Der mARC-Gruppe danke ich für die hilfsbereite, unkomplizierte und fast perfekt organisierte Zusammenarbeit in unserem Stock sowie für die sehr nützlichen und hilfreichen Diskussionen in der Freitagrunde und der Gruppensitzung. Auch den Zellkultur-Freunden Swetlana, Julia, Heyka und Boris möchte ich für die ja zwangsläufig enge Zusammenarbeit und gute Organisation danken. An dieser Stelle danke ich auch Julia für die Kurzeinführung am Fluoreszenzmikroskop.

Ein sehr großes Dankeschön geht an all die Kollegen, die zu Freunden geworden sind. Unvergessliche Zeiten in Sehlendorf, auf Tagungen oder in gemeinsamen Urlauben verbinden uns und ich bin unglaublich froh, dass genau wir die Zeit hier zusammen verbringen konnten. Neben all dem verrückten Spaß, den wir zusammen hatten, wart ihr genauso moralische Unterstützung, und nicht selten entstanden die besten Ideen und Zusammenarbeiten nach Feierabend.

Ein besonderer Dank gilt Markus für die grenzenlose und wundervolle Unterstützung und für großes Verständnis während der gesamten Zeit, aber insbesondere für das Rückenfreihalten während der Anfertigung dieser Arbeit.

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die stets für mich da sind und die durch ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Birte Plitzko
Geburtsdatum	14. Oktober 1984
Geburtsort	Buchholz i.d.N.
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1991 bis 1995	Grundschule Handeloh
1995 bis 1997	Orientierungsstufe am Kattenberg, Buchholz i.d.N.
1997 bis 2004	Gymnasium am Kattenberg, Buchholz i.d.N.
2001 bis 2002	East Central High School, Hurley, Mississippi, USA
Mai 2004	allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 2004 bis Sep. 2005	Studium der Pharmazie TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
Okt. 2005 bis Mai 2009	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jul. 2009 bis Dez. 2009	Diplom an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
Jan. 2010 bis Jun. 2010	Pharmaziepraktikum in der Hirsch Apotheke, Friedrichsort
Nov. 2010	Erteilung der Approbation als Apothekerin

Promotion und Weiterbildung

seit Oktober 2010	wissenschaftliche Mitarbeiterin am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
seit November 2010	Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

Kurzfassung

Die mitochondriale Amidoxim reduzierende Komponente mARC ist ein erst kürzlich entdecktes Molybdoenzym, das zusammen mit den Elektronentransportproteinen Cytochrom b₅ (CYB5) und NADH-Cytochrom b₅ Reduktase (CYB5R) *in vitro* die Reduktion diverser *N*-hydroxylierter Verbindungen katalysiert. Daher ist allgemein anerkannt, dass das mARC-haltige Enzymsystem für die Aktivierung von *N*-hydroxylierten Amidin- und Guanidin-Prodrugs und für die Entgiftung toxischer Hydroxylamine verantwortlich ist. Alle bisher hierauf analysierten Säugetier-Genome codieren für zwei mARC-Proteine, die eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Mit RNAi Experimenten in humanen Zellen konnten in dieser Arbeit die für den Zellmetabolismus essentiellen Komponenten des *N*-reduktiven Systems identifiziert werden. Dabei wurde erstmals gezeigt, dass beide mARC-Proteine im Zellmetabolismus die Fähigkeit haben *N*-hydroxylierte Substrate zu reduzieren, dass aber das Ausmaß der Beteiligung stark vom Expressionslevel des jeweiligen mARC-Proteins abhängig ist. Des Weiteren wurde das mitochondriale CYB5B als essentielle Komponente identifiziert, während die Beteiligung der mikrosomalen CYB5-Isoform ausgeschlossen werden konnte. CYB5R3 wurde als die für den *N*-reduktiven Metabolismus relevante Reduktase ermittelt. Untersuchungen mit Apo-CYB5B zeigen, dass die *N*-Reduktion strikt vom CYB5-Häm abhängig ist, so dass für CYB5 innerhalb des *N*-reduktiven Systems eine Funktion als Elektronentransportprotein angenommen werden kann.

Mittels des etablierten mARC-Knockdowns wurde untersucht, ob die im rekonstituierten System beobachtete Detoxifizierung des mutagenen Nucleobasenanalogs 6-*N*-Hydroxyadenin (HAP) und des Nucleosidanalogs 6-*N*-Hydroxyadenosin (HAPR) durch das mARC-haltige *N*-reduktive Enzymsystem im humanen Zellsystem einen relevanten Entgiftungsweg darstellt. Für HAP wurde eine mARC-abhängige *N*-reduktive Entgiftung in HEK-293 Zellen nachgewiesen. Für HAPR wurde unterdessen gezeigt, dass die Metabolisierung zu Inosin nur in geringem Maße über eine mARC-vermittelt *N*-Reduktion zum Intermediat Adenosin verläuft, sondern primär direkt von der Adenosindesaminase katalysiert wird. Zur Detektion HAP-induzierter Apoptose wurden zwei Assays etabliert. Es zeigte sich, dass mARC2 HeLa Zellen vor den apoptotischen Effekten des Basenanalogs schützen kann, während mARC1 bei der reduktiven Detoxifizierung von HAP in HeLa Zellen scheinbar keine entscheidende Rolle spielt.

Abstract

The mitochondrial Amidoxime Reducing Component mARC is a recently discovered molybdenum containing enzyme. *In vitro* mARC catalyzes, together with the electron transport proteins cytochrome b₅ (CYB5) and NADH-cytochrome b₅ reductase (CYB5R), the reduction of various *N*-hydroxylated compounds. Therefore, the mARC-containing enzyme system is considered to be responsible for the activation of amidoxime- and *N*-hydroxylated guanidine-prodrugs and for the detoxification of toxic hydroxylamines. All hitherto analyzed mammalian genomes code for two mARC proteins, which share a high sequence similarity. In this study the essential components of the *N*-reductive system in cell metabolism were identified by RNAi experiments in human cells. Thereby, it could be demonstrated for the first time that both mARC proteins are capable of reducing *N*-hydroxylated substrates in cell metabolism. However, the extent of their involvement is highly dependent on the expression level of the particular protein. Furthermore, the mitochondrial isoform of CYB5 (CYB5B) was clearly identified as an essential component, whereas the involvement of the microsomal isoform (CYB5A) could be excluded. CYB5R3 was determined to be the relevant reductase for *N*-reductive metabolism. Using apo-CYB5B *N*-reductive catalysis was proven to strictly depend on CYB5-heme. Therefore, it can be assumed that CYB5B functions as an electron transport protein within the *N*-reductive system.

By applying the established mARC-knockdown it was tested whether the mARC-containing *N*-reductive enzyme system could play a significant role in detoxification of the mutagenic nucleobase analog 6-*N*-hydroxyadenine (HAP) and the nucleoside analog 6-*N*-hydroxyadenosine (HAPR) in human cell metabolism.

The mARC-dependent *N*-reductive conversion of HAP in HEK-293 could be demonstrated. For HAPR, on the other hand, it was shown that its metabolism to inosine is only to a small extent mARC-mediated via the *N*-reduction to adenosine as an intermediate. In fact, a direct dehydroxyamination of HAPR is catalyzed by adenosine deaminase.

Two assays were established for the detection of HAP-induced apoptosis. Using these assays mARC2 was shown to protect HeLa cells against the apoptotic effects of the base analog, whereas the involvement of mARC1 in reductive detoxification of HAP does not seem to be pivotal.