

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

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Patrick Marcel Indorf

Kiel 2020

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Tag der mündlichen Prüfung:

27.11.2020

Zum Druck genehmigt:

27.11.2020

Prof. Dr. Frank Kempken

(Dekan)

Kurzfassung

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

In dieser Arbeit ist es gelungen einen schnellen NADH-Assay zu etablieren, der zur Findung von neuen Substraten und Inhibitoren mit einem sehr viel höheren Durchsatz als vergleichbare HPLC-Methoden in der Lage ist. Nach erfolgreicher Validierung und Kopplung mit einer LC-MS-Methodik konnten so über 50 Substanzen mithilfe einer Kombination von unterschiedlichen Methoden näher untersucht werden. Dabei wurden erstmals die Reduktion von anderen Bindungstypen nachgewiesen. Ein bislang nicht beschriebener Schritt der Toxifizierung von Pyrrolizidinalkaloiden wurde durch die neuen Methoden mit mARC in Verbindung gebracht. Auch in dem Feld des Arzneistoffmetabolismus konnten neue Erkenntnisse gesammelt werden. So wurden mit Hydroxyharnstoff und Zileuton, Hydroxyharnstoffe als neue funktionelle Gruppe identifiziert, welche durch mARC reduziert werden. Anhand dieser teils über mehr als 60 Jahre angewendeten Arzneistoffe konnte zudem gezeigt werden, wie die Einführung von Substituenten die Reduktion beeinflusst.

Erstmalig ist es gelungen, einen mARC1-selektiven Inhibitor zu finden.

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

Abstract

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

In this thesis, a rapid NADH-assay capable of finding new substrates and inhibitors with a much higher throughput than comparable HPLC methods has been established. After successful validation and coupling with a LC-MS method, more than 50 substances could be investigated through a combination of different methods in greater detail. This was the first time that the reduction of other types of bonds was detected. A previously undescribed step in the toxification of pyrrolizidine alkaloids was associated with mARC using the new methods. New findings were also obtained in the field of drug metabolism. For the examples of hydroxyurea and zileutone the hydroxyurea functional group, was identified as a new functionality, which is reduced by mARC. Based on these drugs, some of which have been established for more than 60 years, it was also possible to show the influence of substituents in the reduction.

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

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