Untersuchung der Sauerstoffradikalproduktion und des Elektronentransfermechanismus der Xanthinoxidoreduktase

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Nadine Möller
aus Bückeburg

Von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

Genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Friedrich
Berichter: Prof. Dr. Hildebrandt
Berichter: Prof. Dr. Silke Leimkühler
Berichter: Prof. Dr. Dr. Stefan Anker

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 16.05.2008

Berlin 2008

D 83

Kurzfassung:

Nadine Möller:

Untersuchung der Sauerstoffradikalproduktion und Elektronentransfer-mechanismus der Xanthinoxidoreduktase

Xanthinoxidoreduktase (XOR) katalysiert die Oxidation der Purine Xanthin und Hypoxanthin unter gleichzeitiger Bildung von Sauerstoffradikalen. Hierbei werden Elektronen vom Molybdän-Kofaktor aufgenommen und intramolekular über zwei Eisen-Schwefel-Cluster und auf den FAD Kofaktor übertragen. Xanthinoxidoreduktase kann in der Form der Xanthindehydrogenase (XDH) oder der Xanthinoxidase (XO) vorliegen, die entweder die Elektronen bevorzugt auf NAD^+ oder ausschließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen. Zusätzlich können während der Reaktion beider Enzyme Sauerstoffradikale entstehen, die auf Grund ihrer radikalischen Eigenschaften und hohen oxidativen Reaktivität Zellschäden verursachen können.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Aufreinigung von XOR in unterschiedlichen Reinheitsstufen aus Lebergewebe unterschiedlicher Organismen entwickelt, die eine schnelle Aktivitätsbestimmung zur Sauerstoffradikalbildung der beiden Isoformen der XOR ermöglichte. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die XO mehr Sauerstoffradikale über die Zeit bildet als die XDH. Das Vorhandensein von NAD^+ führte zu einem Absinken der gebildeten Sauerstoffradikale der XDH, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Sauerstoffradikalproduktion der XO.

Ebenfalls wurde mittels EPR-Spektroskopie der intramolekulare Elektronentransfer durch die Eisen-Schwefel Cluster am Beispiel der *Rhodobacter capsulatus* Xanthindehydrogenase untersucht. Experimente mit Varianten zeigten, dass die beiden Eisen-Schwefel-Cluster Funktionen für die Stabilität und den Elektronentransfer im Enzym haben. Insbesondere das Eisen-Schwefel-Cluster 1 hat eine wichtige Rolle im Erhalt der Konformation des Enzyms.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die Aktivität der XOR aus Rattenleber bei krebskranken Tieren im Vergleich zu gesunden Tieren untersucht. Es konnte eine stark erhöhte XOR-Aktivität in der krebskranken Tiergruppe nachgewiesen werden. Eine Behandlung der krebskranken Ratten mit einem XOR-Inhibitor führte zu einem Absinken der XOR-Aktivität und zu einem längeren Überleben der Tiere.

1 Einleitung 6

1.1 Xantinoxidoreduktase 6

1.1.1 Reaktion der XDH 14

1.1.2 Inhibition der XOR 14

1.1.3 XOR als NADH Oxidase 15

1.1.4 Struktur der Xanthindehydrogenase isoliert aus Rhodobacter capsulatus 16

1.1.5 Aldehydoxidase 17

1.2 Medizinische Relevanz der XOR und der produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) 17

1.2.1 Antioxidatives System 20

1.2.2 Oxidativer Stress 21

1.2.3 Bedeutung der Xanthinoxidoreduktase in der Tumor-Kachexie 21

1.3 Ziele der Arbeit 23

2 Material und Methoden 24

2.1 Material 24

2.1.1 Chemikalien 24

2.1.2 Chromatografiemedien und Säulen 24

2.1.3 Geräte und Hersteller 24

2.2 Biochemische Methoden 25

2.2.1 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen 25

2.2.2 SDS-und native PAGE 25

2.2.3 Immunoblot-Analyse 25

2.2.4 Proteinreinigung aus Gewebe 26

2.3 Expression und Reinigung von rekombinanter XDH und mAO aus *R.capsulatus* 28

2.3.1 Reinigung der RcXDH 28

2.3.2 Reinigung der AO 29

2.4 Charakterisierung der gereinigten Proteine 29

2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung 29

2.4.2 Entfernung des FAD-Kofaktors mit anschließender Bestimmung des FAD-Gehaltes per HPLC 29
2.4.3 Umwandlung der XO-Form in die XDH Form 30
2.5 EPR Spektroskopie und Spintrapping 30
2.5.1 Theoretische Hintergrund 30
2.5.2 EPR-Experimente mit Varianten der RcXDH 37
2.5.3 Spintrapping von Sauerstoffradikalen 37
2.5.4 Probenvorbereitung und Durchführung der Aktivitätsmessungen mit XOR Proteinen 40
2.5.5 Bestimmung der Messfehlers in Gewebemessungen 41
2.5.6 Probengewinnung von den Ratten des Leberkarzinom-Tierversuches 41
2.5.7 Bestimmung von Sauerstoffradikalen entstehend durch den Metabolismus von Cytochrom P450 und unter dem Einfluss von Katalase 43
2.6 UV/VIS Spektroskopie 43
2.6.1 Cytochrom C Assay 43
2.6.2 Bestimmung des Dehydrogenase/Oxidase Verhältnisses 44
3 Ergebnisse 45
3.1 Methodenentwicklung und allgemeine Untersuchungen an RcXDH und AOX 45
3.1.1 Aktivitätsbestimmungen von Gewebe mit der Reinheitsstufe 1 von unbehandelten Tumortieren und deren Kontrollen 46
3.1.2 Experimente zur Sauerstoffradikalproduktion der XOR und AO 47
3.1.3 Messungen mit AOX und XDH 51
3.1.4 Trennung von AOX und RcXDH durch Verwendung von unterschiedlichen Substraten 54
3.1.5 Aktivitätsbestimmung der aus Gewebe isolierter XDH 56
3.1.6 XOR-Aktivitätsbestimmung von Rattenlebergewebe der Reinheitsstufe 2 . 59
3.1.7 Aktivitätsbestimmungen von Gewebe der Reinheitsstufe 3a von unbehandelten Tumortieren 60
3.1.8 Aktivitätsbestimmung der XOR von unbehandelten und behandelten Tieren mittels nativer PAGE 61

3.1.9 Quantifizierung der XOR von unbehandelten und behandelten Tieren per Immunblot-Analyse 62
3.1.10 Vergleich der XOR –Aktivitätsmessungen ausgehend von den drei unterschiedlichen Reinheitsstufen mittels EPR Spintrapping 63
3.2 Vergleich der XOR Aktivität aus unterschiedlichen Organismen 64
3.2.1 XOR aus Rinderleber 64
3.2.2 XOR aus Hühnerleber 67
3.2.3 XOR aus Rattenleber 67
3.2.4 Messungen der Sauerstoffradikalproduktion 68
3.2.5 Messung der XOR-Aktivität mittels Reduktion von oxidiertem Cytochrom C und Vergleich der Ergebnisse mit der Spintrapping-Methode 74
3.2.6 Bildung von Superoxid-Anionen der *deflavo* XOR 74
3.2.7 Bildung von Superoxid-Anionen mit dem Substrat NADH 76
3.2.8 EPR Untersuchungen an Varianten der RcXDH 77
3.2.9 EPR Untersuchungen des WT 78
3.2.10 EPR Spektren der Varianten der Liganden im FeSI Cluster RcXDH 81
3.2.11 EPR Signale der Varianten der Liganden im FeSII Cluster 83
3.2.12 EPR Signale der Variante C47S 85
3.2.13 Aktivitätsmessung der RcXDH-Varianten mit der Spintrap-Methode 87
3.3 Auswertung des Tierversuches: Auswirkungen eines induzierten Leberzellkarzinoms mittels AH-130 Hepatoma Zellen bei Ratten 87
3.3.1 Körperzusammensetzung, Futteraufnahme und physikalische Aktivität der Tiere 88
3.3.2 Produktion von Sauerstoffradikalen durch XOR 89
4 Diskussion 92
4.1 Entwicklung einer Reinigungsmethode zur Aktivitätsbestimmung der XOR .. 92
4.1.1 XOR Aktivitätsbestimmungen mit XOR der Reinheitsstufe 1 92
4.1.2 Untersuchung von Verunreinigungen 93
4.1.3 Messungen am Modellsystem RcXHD 93
4.1.4 Katalase und Cytochrom P450 95
4.1.5 Trennung von AOX und RcXDH 96
4.1.6 Messungen in Gewebe 98

4.2 Untersuchungen der Elektronenakzeptoren der Isoformen XO und XDH von unterschiedlichen Organismen 100
4.3 Untersuchungen des Elektronenflußes durch das Enzym anhand von EPR Spektren an dem WT der RcXDH und Varianten 107
4.3.1 Untersuchungen am Redoxsystem FeSI 109
4.3.2 Untersuchungen am Redoxsystem FeSII 110
4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Elektronentransportkette von der Moco-Seite zum FAD-Kofaktor 111
4.5 Medizinischer Teil 113
5 Literaturverzeichnis 117

1 Einleitung

1.1 Xantinoxidoreduktase

Das Enzym Xanthinoxidoreduktase (XOR) gehört zur Klasse der Molybdoenzyme. Die XOR benötigt für ihre katalytische Aktivität den Molybdänkofaktor (Moco) [1]. Enzyme mit einem Moco werden anhand der unterschiedlichen Liganden des Zentralatoms Molybdän in drei Klassen eingeteilt: Molybdän ist als anorganische Komponente des Mocos chelatartig über eine Dithiolengruppe gebunden und ligandiert selbst noch entweder zwei Sauerstoffatome (Dioxoform; Sulfitoxidase-Familie), ein Sauerstoff- und ein Schwefelatom (Monooxoform, Xanthinoxidase-Familie) oder die Dithiolengruppe eines zweiten Molybdopterinkofaktors (Bis-MGD, DMSO-Reduktase-Familie) (Abbildung 1).

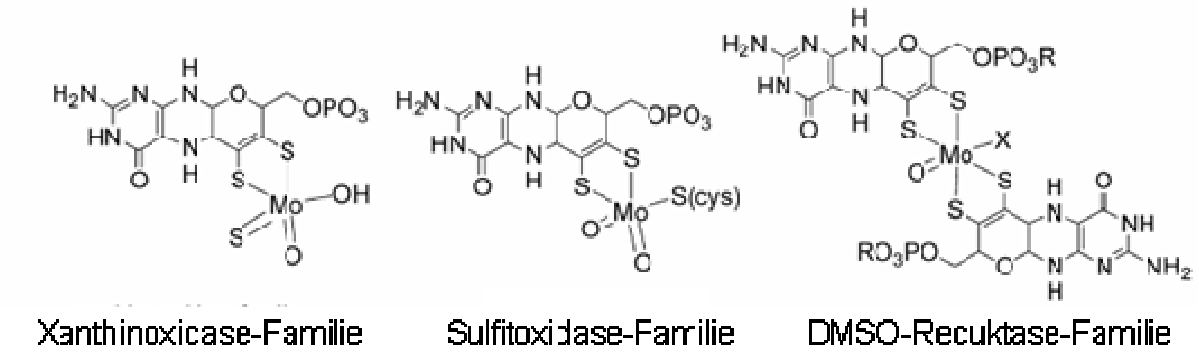


Abbildung 1: Der Molybdänkofaktor (Moco) der drei Klassen der Molybdoenzymfamilie.

Die XOR in Eukaryonten ist ein zytosolisches Enzym, welches aus katalytisch unabhängigen, je 150 kDa schweren Untereinheiten besteht. XOR katalysiert den

letzten Schritt des Purinabbaus, als typische Reaktion kann die Oxidation von Xanthin und Hypoxanthin zu Harnsäure angesehen werden. Hierbei werden die Elektronen auf NAD und/oder O_2 übertragen unter gleichzeitiger Bildung von NADH und $O_2^{\bullet -}$ (Abbildung 2).

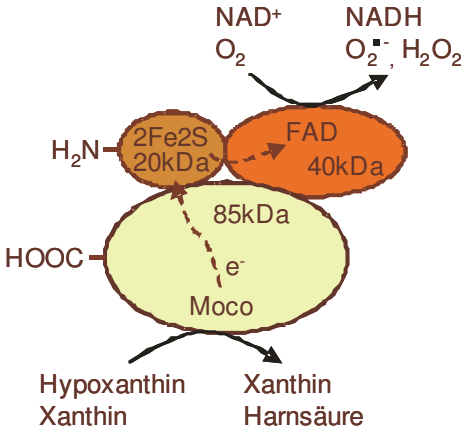
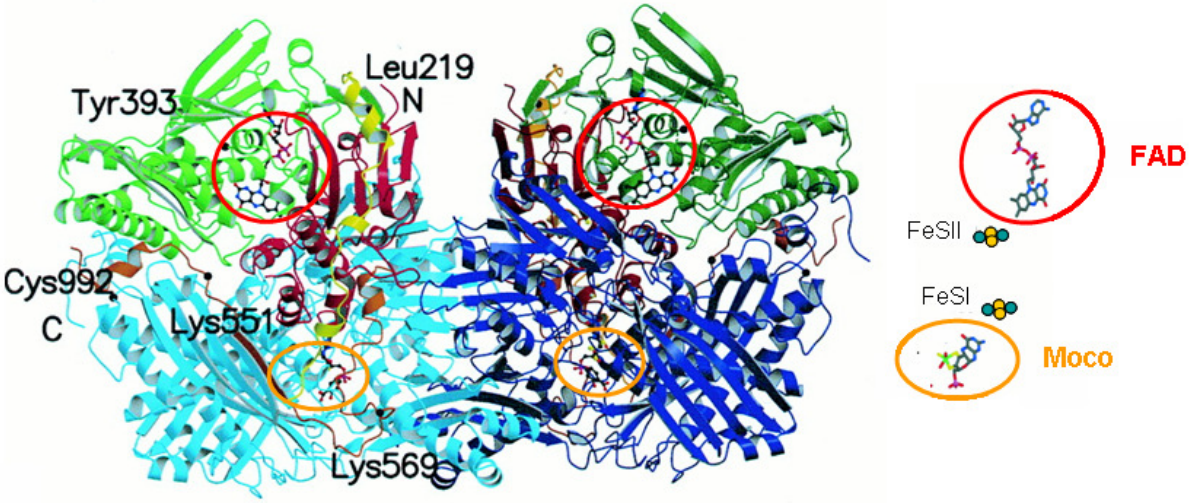


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Enzyms Xanthinoxidoreduktase. Die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin erfolgt an der in beige dargestellten Moco-Domäne. Der Elektronenfluß verläuft entlang der in braun dargestellten [2Fe2S]-Cluster-Domäne um eine Reduktion der Elektronenakzeptoren NAD und O_2 an der in rot dargestellten FAD-Domäne zu ermöglichen.

Die Untereinheiten assemblieren zu einem Homodimer [2], dessen dreidimensionale Struktur eine charakteristische Schmetterlingsform annimmt. Jede Untereinheit besteht aus drei Domänen die tryptisch voneinander gespalten werden können. Jede Domäne bindet einen der drei Kofaktoren Moco, zwei [2Fe2S]-Cluster und das



Flavinadenindinucleotid (FAD) (Abbildung 4).

Abbildung 3: Kristallstruktur eines Homodimers der Rinder XOR [3]. Die Struktur zeigt die Form eines Schmetterlings. Jeder Flügel stellt ein Dimer dar, welches sich jeweils aus der FAD-enthaltenden Domäne (grün), der Moco-enthaltenden Domäne (blau) und der Domäne mit dem [2Fe2S]-Cluster (rot) zusammensetzt.

Die zwei [2Fe2S]-Cluster werden in der N-terminalen Domäne gebunden. In dieser wird jeweils ein [2Fe2S]-Cluster durch vier konservierte Cysteine in einer hydrophoben Region koordiniert [4]. Der Aufbau der Cluster ähnelt sehr dem des [2Fe2S]-Cluster des Ferrodoxins in der Grünalge. Durch die unterschiedliche Konformation der umgebenden Aminosäuren weisen beide Cluster nicht das gleiche Redoxpotential auf [5,6]. Die mittlere Domäne enthält die Bindungstasche des FAD-Kofaktors und wird durch ein Linkerpeptid an die N-terminale Domäne gebunden. Die C-terminale Domäne stellt die größte Domäne dar und bindet den Moco. Es sind ebenso inaktive Formen der XOR möglich. Hierbei wird entweder Molybdän nicht im Enzym gebunden (demolybdo-Form) oder der Schwefel-Ligand des Molybdäns ist nicht koordiniert (desulfo-Form). Besonders in der humanen Muttermilch liegt ein Großteil der XOR als inaktive Demolybdo- oder Desulfo-Form vor, da zwar XOR eine wichtige Rolle bei Milchbildung einnimmt, jedoch der Einbau der Kofaktoren während der Enzymbildung hohen metabolischen Energieaufwand erfordert [7,8]. XOR nimmt in der Muttermilch zwei unterschiedliche Funktionen ein: zum einen ist XOR essentiell für die Milchtröpfchenbildung und somit für den hohen kalorischen Wert der Muttermilch und zum anderen wird durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. $O_2^{\bullet-}$ eine antimikrobielle Wirkung erzielt [9,10]. Bei Säugetieren wurde XOR in der Leber und Dünndarm gefunden [11]. Ebenso konnte XOR im Herzen der Ratte und des Rindes nachgewiesen werden [12]. Im Menschen wurden sehr geringe Mengen in der Leber, dem Dünndarm und der Brustdrüse gefunden. Aussagen zum XOR Gehalt im Herzen sind kontrovers, so konnten diverse Gruppen XOR nachweisen [13,14 15], anderen hingegen gelang dies nicht [16,17].

Die Isoformen der XOR: XO und XDH

XOR kann zwei unterschiedliche Isoformen einnehmen, die sich durch ihre Konformation und dem Elektronenakzeptor unterscheiden. Die Isoform Xanthinoxidase (XO) überträgt im Reaktionsverlauf die Elektronen ausschließlich auf molekularen Sauerstoff. Sowohl auf molekularen Sauerstoff als auch auf NAD werden die Elektronen bei der Isoform Xanthindehydrogenase (XDH) übertragen.

In vivo liegt die XOR als XDH Form vor [18,19,20,21]. Die Umwandlung von der XDH-Form zur XO-Form kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen (Abbildung 4). Zum einen wird durch Oxidation der Thiolgruppen der Cysteine 535 und 992 zwischen der FAD- und Moco-Untereinheit eine XO Form gebildet. Nishino et al konnten durch Experimente mit Varianten der Cysteine 535 und 992 zeigen, dass diese eine entscheidende Beteiligung an der Umwandlung besitzen und die Disulfidbrücke hier gebildet wird [22]. Unter reduzierenden Bedingungen wird diese Disulfidverbindung gelöst, und es entsteht wiederum die XDH-Form [23]. Diese XO-Form wird daher als XO(reversibel) bezeichnet. Die reversible Umwandlung wird *in vitro* durch die verschiedensten Mechanismen ausgelöst: Della Corte et al. berichten von einer Umwandlung bei einer Lagerung bei -20°C, Inkubation bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen [18, 24]. Ebenso kann eine Umwandlung durch sulfhydrierende Reagenzien erreicht werden [20]. Unter anderem kann weiterhin durch Proteolyse eine nicht wieder umwandelbare XO Form entstehen, die als XO(irreversibel) bezeichnet wird. Hierbei entstehen drei unabhängige Fragmente mit den Größen von 20, 40 und 85 kDa, die jedoch die Reaktivität mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor beibehalten [25,26, 27]. Die irreversible Umwandlung kann durch Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Pancreatin ausgelöst werden [18, 19]. Die Moco Seite wird durch die Umwandlungen nicht beeinflusst. Für die Umwandlung des Enzyms *in vivo* liegen kontrovers diskutierte Veröffentlichungen vor. So wird der XO-Form eine Beteiligung an auftretenden Gewebeschäden durch Reperfusionen nach Ischämie zu geschrieben [28]. Unklar bleibt jedoch, durch welchen Trigger das Enzym umgewandelt wird [29]. Möglichweise lässt sich das Verhältnis der beiden Isoformen auf Grund der Umwandlung während der Reinigung nicht genau bestimmen [29] (siehe unten).

Die Xanthinoxidoreduktase des Huhnes nimmt keine XO Form ein. Jedoch wird durch Proteolyse eine Trennung in drei Untereinheiten erreicht, so dass die Bildung von Harnsäure zwar abnimmt, jedoch kein Anstieg in der Bildung von Superoxid-Anionen beobachtet wird. Die bei der Proteolyse gebildeten Proteine weisen eine ähnliche Größe wie die der XOR der Säugetiere auf. Werden die proteolytischen Bedingungen zu denaturierend, sind nur noch zwei Proteinfragmente nachzuweisen. Hierbei enthält die fehlende Fraktion den FAD-Kofaktor. Die Bindungsseite am Moco wird nicht beeinflusst [30].

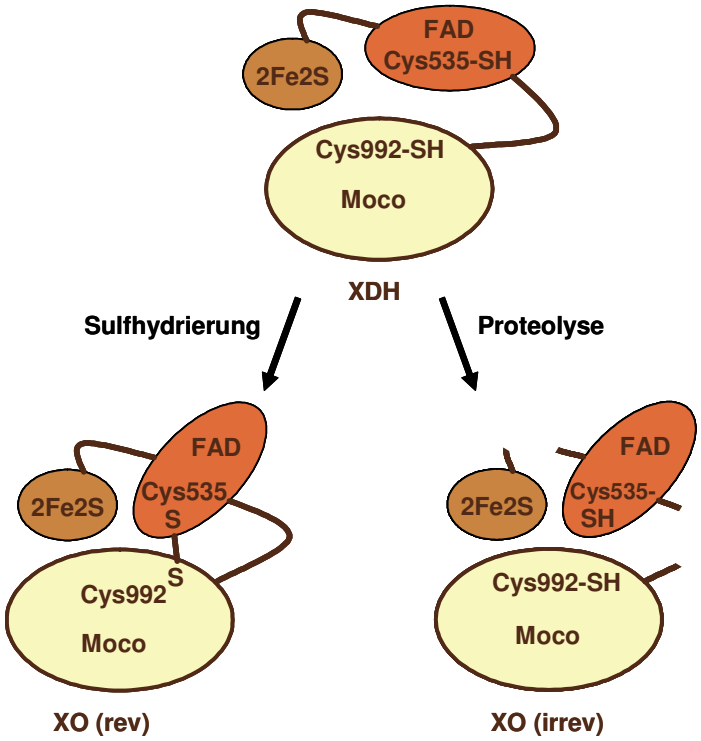


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Umwandlung der Rinder-XDH in die Formen bXO (irreversibel) und bXO (reversibel) durch Sulfhydrierung bzw. proteolytische Spaltung.

Bei einer Reinigung der XOR aus dem Gewebe bestimmen die Bedingungen maßgeblich die vorliegende Form. Wird eine Reinigung ohne weitere Zusätze durchgeführt, wird XOR in der XO Form isoliert. Jedoch kann eine Umwandlung während der Aufarbeitung durch reduzierende Bedingungen verhindert werden, z.B. durch einen Zusatz von Dithiothreitol (DTT) [20,31, 32]. Die XOR wird so als umwandelbares Enzym gereinigt und kann nach der Reinigung durch DTT oder andere Thiolverbindungen in die XDH–Form umgewandelt werden [26, 31, 32].

Reaktion der XOR und Unterschiede der beiden Isoformen

Beide Isoformen der XOR katalysieren die letzten beiden Schritte des Purinabbaus von Hypoxanthin über Xanthin zu Harnsäure, welche über die Nieren ausgeschieden wird (Abbildung 5). XOR übernimmt hierbei eine Hauptrolle und stellt somit auch den geschwindigkeitsabhängigen Schritt des Purinabbaus dar [11]. In niederen Tieren wird Harnsäure weiter zu Allantoin durch das Enzym Uricase abgebaut, welches in Säugetieren nicht aktiv ist [33]. Hierbei werden vorrangig Hypoxanthin und Xanthin metabolisiert, jedoch können auch andere Purine, Purin-Ribonucleotide und 2' Desoxyribonucleotide abgebaut werden [2].

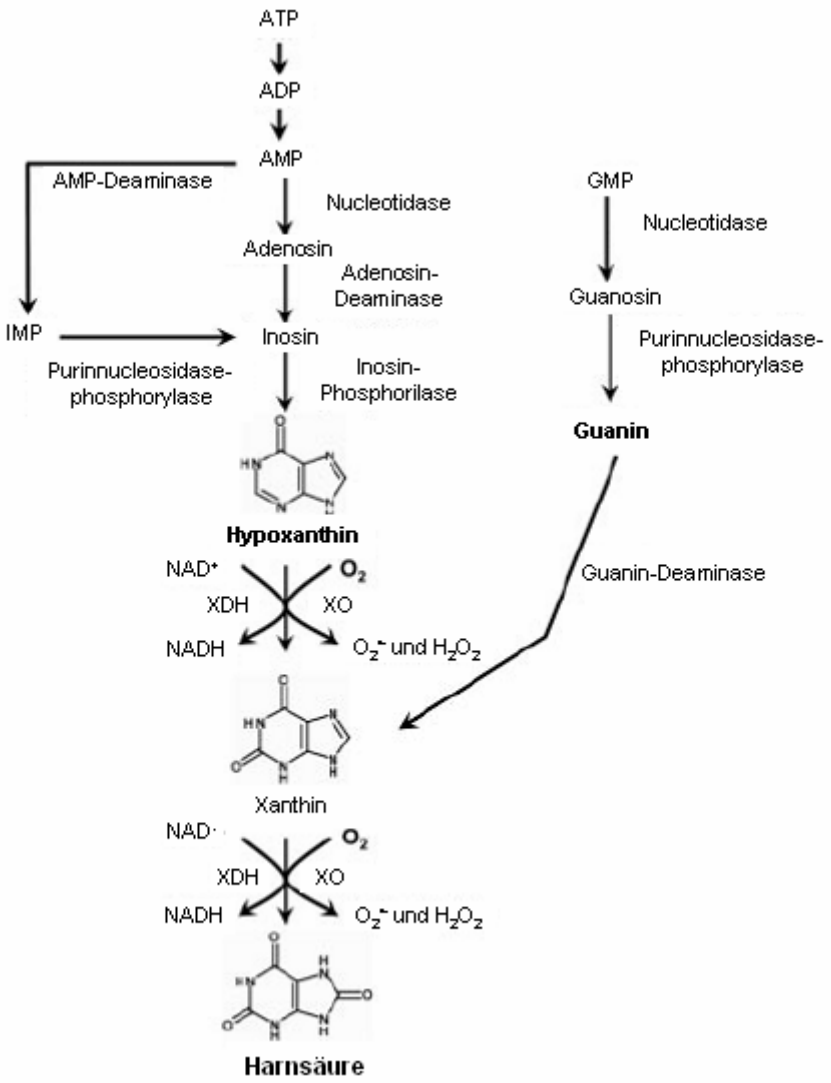


Abbildung 5: Darstellung des *in vivo* Abbau von Purinen ausgehend von AMP und GMP zu Harnsäure mit den beteiligten Enzymen [34**].**

Bei der Umwandlung der XDH erfolgen signifikante Änderungen des Enzyms an der FAD-Seite. Durch die Reduktion der Disulfidbrücken wird zwischen den Cysteinen 992 und 535 wird ein Loop von 70Å Länge gespannt. Da die beiden Cysteine jedoch nur 15,7Å voneinander entfernt vorliegen, gehen Änderungen des Loops mit einer erheblichen Konformationsänderung einher [3] (Abbildung 6). Durch diese Änderung ist keine Bindung von NAD an den FAD-Kofaktor möglich [26, 35], hingegen wird ein Tunnel für O_2 geöffnet, der eine leichtere Bindung an das FAD ermöglicht [36]. Der variable Loop verändert die elektrostatische Umgebung des FAD. Die Konformationsveränderung führt zu einer sterischen Hinderung der Bindung des NAD an den FAD-Kofaktor.

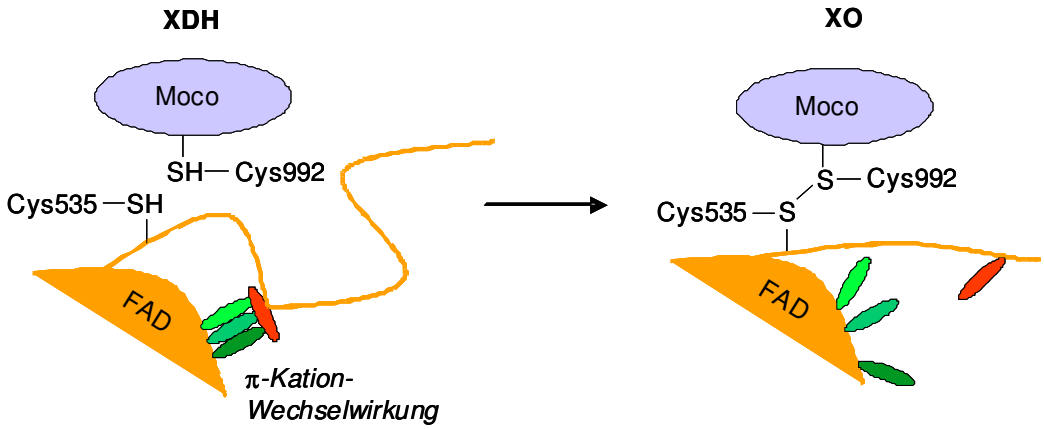


Abbildung 6: Konformelle Änderungen der Kuhmilch-XOR vorliegend in den Isoformen XDH und XO, modifiziert nach Nishino et al. [22]. In hellblau dargestellt die Moco-bindende Domäne, mit der enthaltenen Aminosäure Cystein 992, in orange die FAD-Domäne und der Loop mit der enthaltenen Aminosäure Cystein 535. Die Bildung einer Thiosulfatbrücke zwischen den Cysteinen 992 und 535 führt zu einer Auflösung des in grün und rot dargestellten Aminosäureclusters, dass durch p-Kation-Wechselwirkung gebildet wird und den Loop stabilisiert. Hierbei sind die Aminosäure in grün dargestellt an der FAD-Domäne gebunden und die in rot dargestellte Aminosäure am Loop.

Die veränderte Proteinstruktur löst Änderungen in den Redoxpotentialen des FAD aus [6, 30]. So ist das mittlere Redoxpotential des FAD in der XDH geringer als in der XO. Der Unterschied beträgt in der Kuhmilch XOR 180 mV [6,[37]. Insbesondere die Reihenfolge des Redoxpotentials der aktiven Zentren verändert sich: bei der Kuhmilch-XO liegt eine relative Reihenfolge von FeSII>$FADH^{\bullet}/FADH_2$>$FAD/FADH^{\bullet}$~FeSI~Mo(V)/Mo(IV)>Mo(VI)/Mo(V) vor (38). Der FAD-Kofaktor kann hierbei die Formen $FADH_2$/FADH* (Hydroquinon/Semiquinon) und $FADH^{\bullet}$/FAD einnehmen. Die Reduktion des FeSI erfolgt im Gegensatz zur XDH vor dem FAD-Kofaktor (26). Die relative Reihenfolge der Zentren der XDH lautet FeSII>$FAD/FADH^{\bullet}$~FeSI>$FADH^{\bullet}/FADH_2$~FeSI~Mo(VI)/Mo(V)>Mo(V)/Mo(IV) (26,143). Das Semiquinon der XDH wird durch thermodynamische Wechselwirkungen der Proteinstruktur stabilisiert [6] und nicht durch ein niedrigeres mittleres Redoxpotential des Semiquinons [39]. Die Ausbildung des FAD-Semiquinons ist stark pH-Wert abhängig. Der Gehalt an FADH* sinkt bei einem pH-Wert Anstieg von 6 auf 8,5 und steigt mit einem weiter steigenden pH-Wert signifikant an, um bei einem pH-Wert von 10 sein Maximum zu erreichen.

Die Reaktion der XOR und ihrer Isoformen kann in eine reduktive und oxidative Halbreaktion eingeteilt werden [40]. Die reduktive Halbreaktion umfasst die Bindung

und Oxidation des Substrates Xanthin und Hypoxanthin am Moco. Nach Xia et al. erfolgt mit der Bindung des Substrates Xanthin ein 2 Elektronentransport auf den Moco und Molybdän wird von Mo(VI) zu Mo(IV) reduziert [40]. Der nicht geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Elektronentransfers innerhalb des Enzyms wird über zwei [2Fe2S]-Cluster erreicht [41, 42]. Die [2Fe2S]-Cluster fungieren hierbei als eine Art „Elektronenauffangbecken“, sie ziehen die Elektronen von den aktiven Seiten des Enzyms ab, um die funktionellen Gruppen des Enzyms, den Moco und den FAD-Kofaktor in der reaktionsfähigen Form darstellen zu können [43].So werden die Elektronen auf den Moco zurückgegeben, um Molybdän in der Oxidationsstufe +5 darzustellen und vom FAD-Kofaktor abgezogen, um diesen in der $FADH_2$- Form zu erhalten. Ausgehend vom FAD werden die Elektronen entweder auf den Elektronenakzeptor NAD oder gelösten molekularen Sauerstoff übertragen [44]. Die oxidative Halbreaktion findet an der Bindungsstelle des Elektronenakzeptors, des FAD-Kofaktors, statt. Auf Grund der veränderten Konformation in der Umgebung des FAD-Kofaktors überträgt XO die Elektronen ausschließlich auf Sauerstoff, während Xanthindehydrogenase die Elektronen sowohl auf Sauerstoff, als auch bevorzugt auf NAD überträgt. (Abbildung 2). Im Folgenden wird die Reaktion der beiden Isoformen detailierter beschrieben.

Reaktion der XO

XO überträgt die freiwerdenden Elektronen auf Grund der fehlenden Bindungsstelle für NAD ausschließlich auf molekularen Sauerstoff. Hierbei entstehen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Superoxid-Anionen ($O_2^{-\bullet}$) (Abbildung 7).

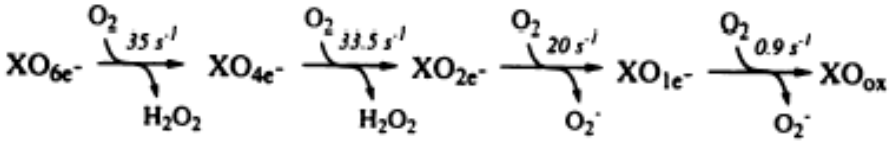


Abbildung 7: Oxidative Halbreaktion der XO, modifiziert nach Hille et al. [45]

Die Reaktion mit molekularem Sauerstoff ausgehend von der reduzierten XO kann in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase umfasst Oxidation von XO_{6e-} bis XO_{2e-} und führt über das FAD-Hydroquinon zu einer Bildung von je 1 Molekül H_2O_2. Pro Schritt werden zwei Elektronen übertragen. Liegt das Enzym in einem

Redoxzustand von 2e- bis zur oxidierten Form vor, wird das FAD-Semiquinon ausgebildet. Dieses überträgt in je zwei ein-Elektronenschritten die Elektronen auf Sauerstoff unter Bildung von Superoxid-Anionen.

1.1.1 Reaktion der XDH

XDH überträgt die freiwerdenden Elektronen vorrangig auf NAD aber auch auf molekularen Sauerstoff [20]. Es entstehen die Reaktionsprodukte NADH und Superoxid. Ausgehend von reduzierter XDH wird die Oxidation bis zum vollständig oxidierten Enzym mit NAD als Elektronenakzeptor nicht durchlaufen. Auf Grund des niedrigeren mittleren Redoxpotential der XDH als der XO endet die Reaktion bei der zweifach reduzierten XDH. Die Bindung von NAD an XDH verändert das Redoxpotential des FADH/$FADH_2$-Paares zu einem positiveren Wert. Dieses führt zu einer Instabilisierung des FAD-Semiquinons mit anschließender Übertragung von 2 Elektronen auf NAD [5, 42]. Die Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff verläuft in drei Phasen ausgehend vom Flavinsemiquinon, welches in der XDH thermodynamisch stabilisiert wird. Pro Phase wird ein Superoxid-Anion pro Monomer gebildet.

In der Literatur wird die größere Menge an produzierten Sauerstoffradikalen im Vergleich zur XO Form durch die XDH durch die höhere Stabilität des Flavin-Semiquinons begründet [6, 35, 39]. Das Semiquinon reagiert langsam mit O_2 zu $O_2^{\bullet-}$, trotzdem werden 40% des Elektronenflußes des Turnovers der XDH auf Sauerstoff übertragen, bei der XO liegt der Elektronenfluß auf O_2 zur Bildung von $O_2^{\bullet-}$ bei 20-30% [26, 39]. Die Reaktionsgeschwindigkeit der XDH mit O_2 wird im Vergleich zur XO als gering betrachtet, so liegt die maximale Rate bei 25% der V_{max} XO/O_2 [35]. NAD ist ein starker, schnell reagierender Inhibitor zur Reaktion der XDH mit O_2, schon sehr geringe Konzentrationen verhindern eine O_2-Bindung [46]. *In vivo* stellt O_2 somit nur einen schwachen Competitor in der Reaktion des Elektronenflußes dar, da die NAD Konzentrationen in einem Organismus ausreichen, um kein O_2 an den FAD-Kofaktor zu binden [47].

1.1.2 Inhibition der XOR

Das Enzym XOR kann durch verschiedene Substanzen inhibiert werden (Abbildung 8). Zur Inhibierung der humanen XOR ist seit 1966 die Substanz Allopurinol (1,5-dihydro4*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-on) von der FDA zur Behandlung von Gicht

zugelassen. Allopurinol ist ein Hypoxanthin-Analogon, bindet an den Moco der XOR und wird *in vivo* zu Oxypurinol (4,6-dihydroxypyrazolo[3,4*d*]pyrimidin) oxidiert.

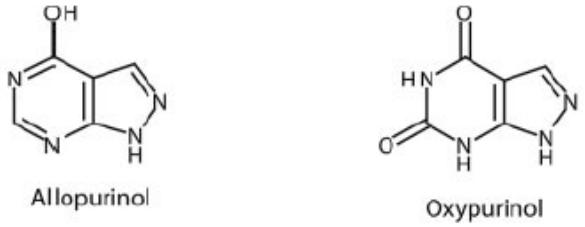


Abbildung 8: Inhibitoren der XOR: links dargestellt der kompetitive Inhibitor Allopurinol und rechts der Metabolit und nicht kompetitiver Inhibitor Oxypurinol.

Allopurinol fungiert in geringen Konzentrationen als kompetetiver Inhibitor, erst in hohen Konzentrationen tritt eine nicht kompetetive Inhibition ein [48].Oxypurinol bindet durch direkte Ligation an den Moco und wirkt schon bei geringen Konzentrationen als nicht kompetetiver Inhibitor [55]. Von Spector wird Oxypurinol als wirkungsvollerer Inhibitor der Superoxid-Radikalproduktion als Allopurinol angesehen, da im Metabolismus keine Superoxidradikale entstehen [49] und eine Bindung von Oxypurinol an den Moco nicht durch geringe Konzentrationen an Xanthin verhindert werden kann. Oxypurinol weist zudem eine höhere Halbwertszeit (14-30h) im Vergleich zu Allopurinol (2-3h) auf und kann dadurch in geringeren Dosierungen verwendet werden [50].

1.1.3 XOR als NADH Oxidase

XOR kann ebenfalls das Substrat NADH zu NAD oxidieren [47, 51]. Hierbei werden die freiwerdenden Elektronen direkt vom NADH auf den Flavin-Kofaktor übertragen mit gleichzeitiger Bildung von Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid. Hierbei wird das Enzym bis zum 2fach-reduzierten Zustand reduziert [52]. Da diese Reaktion nicht am Moco stattfindet, ist die NADH-Oxidase-Aktivität nicht mit Inhibitoren der Substratbindung, wie z.B. Allopurinol zu verändern [47]. Jedoch kann die NADH-Oxidase durch den nicht spezifischen FAD-Inhibitor DPI inhibiert werden. Die NADH-Oxidase Aktvitität ist bei der XDH-Form mit 40% der Xanthin:NAD-Aktivität als signifikant zu beschreiben [51], hingegen weist die XO-Form nur eine geringe NADH-Oxidase Aktivität auf [20]. Von verschiedenen Autoren wird die Reduktion von NADH durch die XDH insbesondere bei durch ROS ausgelösten oder mitverursachten Krankheiten als wichtig betrachtet [53,54]. So steigt die Konzentration von NADH

während einer Ischämie-Phase drastisch an, die Reduktion von NADH durch XDH kann zu einer vemehrten Bildung von ROS führen.

1.1.4 Struktur der Xanthindehydrogenase isoliert aus Rhodobacter capsulatus

Aus dem Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* kann eine XDH mit einem Moco isoliert werden, der ebenso wie der Moco der Eukaroyten eine Molybdopterinstruktur enthält. XDH aus *R. capsulatus* (RcXDH) weist eine hohe Homologie der Aminosäurensequenz zu eukaryotischer XOR auf. RcXDH ist ein zytoplasmatisches Enzym mit einer heterotetrameren $(\alpha\beta)_2$ Struktur mit einer Gesamtmasse von 275 kDa. Die enthaltenen Kofaktoren sind dieselben wie in der XOR der Säugetiere, nur sind sie hier an zwei unterschiedlichen Polypeptiden lokalisiert. Die XDHA Untereinheit enthält die beiden [2Fe2S]-Cluster und das FAD. Der Moco ist an die XDHB Untereinheit gebunden (Abbildung 9).

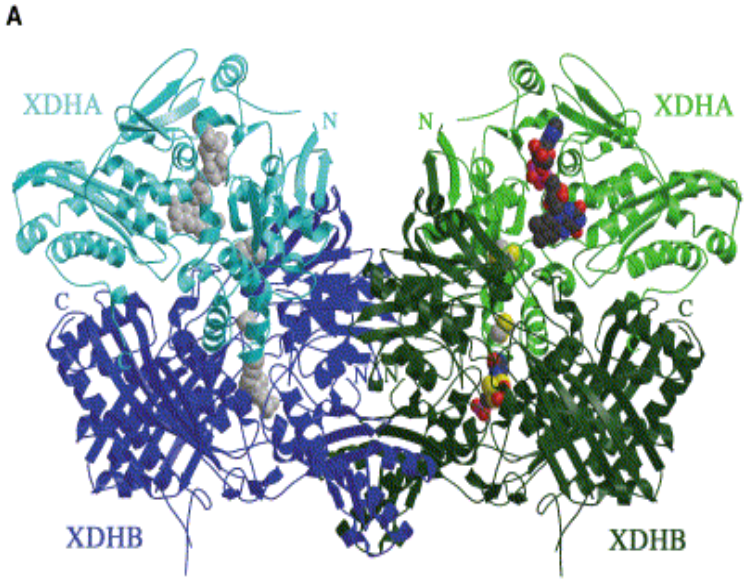


Abbildung 9: Kristallstruktur der RcXDH [55]. Die XDHA Untereinheiten sind in hellgrün und hellblau, die XDHB Untereinheiten in dunkelgrün und dunkelblau dargestellt. Die N- und C-Termini sind in den entsprechenden Farben in der Abbildung gekennzeichnet. Die [2Fe2S]- und der FAD-Kofaktor der XDHA und der Moco in XDHB sind als Kugelmodelle dargestellt.

Das Redoxverhalten der Kofaktoren unterscheidet sich ebenfalls von eukaryotischen XOR Proteinen. So führt die Erniedrigung des FAD/FADH bzw FADH/FADH2 Redoxpotentials zu einer stabilen Ausbildung der FAD Semiquinon Form. Das Redoxpotential des FeSI-Clusters ist bei RcXDH im Gegensatz zur eukaryotischen XOR niedriger als das des FeSII-Clusters [56]. Durch diese unterschiedliche

Konformation ist ebenfalls eine Umwandlung der XDH-Form in die XO-Form nicht möglich [55].

1.1.5 Aldehydoxidase

Ein weiteres ROS produzierendes Enzym ist die Aldehydoxidase (AOX). AOX gehört ebenfalls in die Familie der Molybdoenzyme. Der Aufbau der AOX ähnelt sehr der XOR, so sind die gleichen Kofaktoren mit einem Moco, 2 [2Fe2S]-Clustern und einem FAD enthalten [57]. Das Enzym besteht ebenso aus zwei identischen Homodimeren mit je 150 kDa [58]. AOX katalysiert in Gegenwart von O_2 die Oxidation von endogenen und exogenen N-Heterozyklen und Bildung von $O_2^{\bullet-}$ [59]. Obwohl die physiologische Rolle der AOX noch noch nicht abschließend geklärt wurde, konnte der AOX eine Beteiligung beim Abbau von Xenobiotika und Chemotherapheutika wie Methothrexat nachgewiesen werden [60]. Die AOX wird insbesondere in der Leber exprimiert [58]. Auf Grund der hohen koformellen Ähnlichkeiten und des physikalischen und chemischen Verhalten ist eine Trennung der Enzyme XOR und AOX während der Reinigung von Proteinen aus Lebergewebe schwierig.

Im Folgenden Kapitel wird in die medizinische Problematik der von verschiedenen Enzymen produzierten ROS betrachtet und dabei besonders auf den Metabolismus der XOR in der Tumor-Kachexie eingegangen.

1.2 Medizinische Relevanz der XOR und der produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Freie Radikale gehören in die Klasse reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Als „freie Radikale“ werden Atome und Moleküle mit einer ungeraden Anzahl an Elektronen bezeichnet. Freie Radikale entstehen entweder durch Elektronenaufnahme eines nicht-radikalischen Moleküls unter Bildung eines Radikalanions, durch Elektronenabgabe unter Bildung eines Radikalkations oder auch durch homolytische Spaltung einer kovalenten Bindung. Da ROS eine hohe chemische Reaktivität besitzen, kann die Interaktion freier Radikale mit Zellbestandteilen zur Bildung von sekundären Radikalen aus Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren führen. Durch die Reaktion der durch ROS gebildeten sekundären Radikale kann eine Kettenreaktion ausgelöst werden, die erhebliche Zellschädigungen, wie z.B. Nekrosen, Fibrosen und

auch Tumorgenese, zur Folge hat. Im Folgenden sollen einige Charakteristika ausgewählter ROS vorgestellt werden.

Superoxid-Anion-Radikal $O_2^{-\bullet}$

Ein Superoxidanion entsteht durch die univalente Reduktion von molekularem Sauerstoff (Gleichung 1

$$O_2 + e- \rightarrow \bullet O_2^-$$

Gleichung 1

Auf Grund der geringen Halbwertszeit und Polarität sind sie nicht in der Lage, intrazellulär große Strecken zurückzulegen bzw. Membranen zu durchdringen. In wässriger Lösung, besonders bei saurem pH-Wert dismutieren die Superoxidanionen zu H_2O_2. H_2O_2 bildet in der Fenton-Reaktion das Edukt für die $OH^{\bullet}$-Generierung (siehe Gleichung 4). Superoxid-Anionen werden z. B. in den Elektronentransportketten der Mitochondrien und in enzymatischen Reaktionen gebildet. Hierbei sind sie z.B. Produkte der Enzyme Xanthinoxidoreduktase (siehe Kapitel 1) und der NO-Synthase. Neben ihrer Funktion als *second messenger* übernehmen Superoxid-Anionen eine wichtige Rolle in der Vasoregulation [61].

Wasserstoffperoxid H_2O_2

H_2O_2 kann neben einer direkten enzymatischen Bildung durch spontane oder durch eine Superoxiddismutase-katalysierte Dismutation von $O_2^{-\bullet}$ entstehen ($2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Gleichung 2):

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Gleichung 2

Da Wasserstoffperoxid eine stabile Elektronenkonfiguration aufweist, ist es kein Radikal und zeigt nur eine geringe Reaktionsfreudigkeit [62]. Bei einer Halbwertszeit von einigen Sekunden liegt die intrazelluläre Konzentration im mikromolaren Bereich. Eine Membranpermeierung durch das ungeladene Wasserstoffperoxidmolekül ist

möglich [63]. H_2O_2 hat als Edukt der Fenton-Reaktion eine pathophysiologische Bedeutung. Das enzymatische antioxidative Schutzsystem baut H_2O_2 mittels der Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase (GPX) ab.

Hydroxylradikal $OH^{\bullet}$

Das Hydroxylradikal ist auf Grund seines stark positivem Redoxpotential von 183 mV eines der aggressivsten Sauerstoffradikale und stärksten Oxidationsmittel in wässriger Lösung [62]. Dies ist begründet zum einen auf seiner außerordentlichen Reaktionsfreudigkeit, andererseits gibt es keinen physiologischen, spezifischen Schutzmechanismus. Als Hauptquelle für die Entstehung von $OH^{\bullet}$ in biologischen Systemen gilt die Eisen(II)-vermittelte Fenton-Reaktion [64]. Auf Grund der sehr kurzen biologischen Halbwertszeit von 1 ns werden nur Verbindungen in unmittelbaren Nähe nucleophil angegriffen [65]. Hierbei werden Wasserstoffatome aus CH-Bindungen abstrahiert und an Doppelbindungen oder aromatischen Strukturen angebunden [66]. Hydroxylradikale sind die Hauptverursacher von Lipidperoxidationen.

Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion

Bei der Fenton-Reaktion werden Hydroxylradikale gebildet. Die Fenton-Reaktion ist eine übergangsmetallkatalysierte Variante der Haber-Weiss-Reaktion (Gleichung 3, Gleichung 4).

Gleichung 3

$$Fe^{3+} + O_2^{-\bullet} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Gleichung 4

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

In biologischen Systemen kann als Übergangsmetall ebenso Kupfer fungieren, z. B. bei der Superoxiddismutase (SOD). Für die Reduktion des Fe^{3+} sind *in vivo* vor allem Superoxid-Anionen verantwortlich [63].

1.2.1 Antioxidatives System

Reaktive Sauerstoffspezies werden im Organismus mittels eines antioxidativen Schutzsystems abgebaut. Dieses setzt sich sowohl aus enzymatischen als auch nicht-enzymatischen Reaktionen zusammen.

Die nicht-enzymatischen Reaktionen bestehen aus einer Unterbrechung der radikalischen Kettenreaktion durch α-Tocopherol (Vitamin E) und β-Carotin und eine Funktion als Radikalfänger (*scavenger*) der Substanzen Ascorbinsäure (Vitamin C), Glutathion und Harnsäure [67, 68].

Der enzymatische Schutz beruht im Wesentlichen auf den drei Enzymen Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Enzyme vorgestellt.

Superoxiddismutase (SOD)

Fridovich und McCord beschreiben 1969 erstmals die Dismutationsreaktion von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid ($2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ Gleichung 2). Die Reaktion der intrazellulär vorliegenden SOD läuft 10^4fach schneller ab als die Spontandismutation und ist nur durch die Diffusion des Substrates zum Enzym limitiert [63]. SOD kommt in verschiedenen Formen vor. Die intrazelluläre cytosolische Cu-/Zn-haltige SOD ist in nukleären Bereichen und Lysosomen zu finden [69]. In Plasma, Lymphe und Cerebrospinalflüssigkeit liegt die extrazelluläre Cu-/Zn- haltige SOD vor [70]. Mit Mangan ein hat die mitochondriale Mn-haltige SOD in den Mitochondrien ein anders Zentralatom, jedoch macht die Cu-SOD mit 95% den Hauptanteil bei Säugern aus [71]. Eine hohe Konzentration von SOD ist in stoffwechselaktiven Organen wie Herz, Lunge, Niere und Leber nachzuweisen.

Katalase

Das Enzym Katalase ist ein intrazellulär-mikrosomales tetrameres Hämprotein mit je einer zentralen Hämgruppe. Im Metabolismus der Katalase wird durch einen zwei-Elektronenübergang Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abgebaut (Gleichung 5).

Gleichung 5

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist nur durch die Diffusion des Substrates zum Enzym beschränkt.

1.2.2 Oxidativer Stress

Als „oxidativer Stress“ wird das Überwiegen von ROS durch deren zunehmende Generierung oder durch verringerte antioxidative Kapazität eines Organismus bezeichnet. Hierbei gerät der Zellstoffwechsel, in dem sich unter Normalbedingungen Radikalbildung und Radikalabbau im Gleichgewicht vorliegen, außer Balance. Viele Radikalreaktionen finden in der Fenton-Reaktion ihren Abschluß. Die hierbei generierten Hydroxylradikale sind Mitverursacher vielfältiger Krankheiten. Als Beispiel sind Arteriosklerose, Diabetes mellitus und der Ischämie-Reperfusionsschaden zu nennen [62, 72]. Als eine Folge von hohem oxidativen Stress wird möglicherweise das klinisch-metabolische Syndrom der Kachexie verursacht. Ob Kachexie eine direkte Folge der hohen ROS Belastung oder eher eine Folge des zu erhöhten oxidativen Stresses führenden Grunderkrankung darstellt, wird im Folgenden diskutiert. Hierbei wird insbesondere auf die Stoffwechselprodukte der XOR in Zusammenhang mit Kachexie eingegangen.

1.2.3 Bedeutung der Xanthinoxidoreduktase in der Tumor-Kachexie

Der Begriff der Kachexie kommt ursprünglich von dem griechischen Ausdruck „kakos hexis“, was übersetzt „schlechter Zustand“ bedeutet. Kachexie ist ein komplexes metabolisches Syndrom, das mit einem Verlust von Muskelmasse mit oder ohne gleichzeitigen Verlust an Körperfett einhergeht [73,74]. Verstärkter Abbau des Muskulatur, Anorexie, Entzündungen und Insulin Resistenz sind oftmals mit Kachexie verbunden [75, 76, 77, 78]. Das Syndrom der Kachexie wird bei vielen schweren, chronischen Krankheiten beobachtet, z.B. AIDS, chronische Herzinsuffizenz, Tuberkolose und Krebs, ebenso aber auch bei akuten Infektionen. Als diagnostische Kriterien gelten: ein Gewichtsverlust von mindestens 5% in den letzten, je nach Erkrankung 3-6 (Krebs), bzw 12 Monaten (chronische Nieren- oder Herzinsufizienz) [73]. Zusätzlich müssen drei der folgenden Kriterien zutreffend sein: eine Abnahme der Muskelkraft, Anorexie, geringer BMI, abnormale Leveln von Biomarkern und anderen Plasmaspiegeln, einer Anämie und/oder ein geringes Serum Albumin. Ausgeschlossen werden müssen Folgen des Fastens, bzw

Hungerns, Malabsorption, Depressionen, einer Schilddrüsenüberfunktion und altersabhängiger Abbau der Muskulatur.

Viele Mechanismen wirken bei der Entstehung von Kachexie zusammen. Oftmals ist der Stoffwechsel der Erkrankten von Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten verändert, einhergehend mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Neurotransmittern. Ebenso werden Veränderungen der Hormonausschüttung und ggf. ein Auftreten von Anorexie beobachtet. Jedoch ist das Auftreten einer Anorexie nicht der alleinige Grund für die Entwicklung einer Kachexie [79,80].

Gewichtsverlust tritt bei Krebserkrankungen sehr häufig auf. Über 50% der unbehandelten erkrankten Krebspatienten verlieren Gewicht, hierbei zeigt sich bei einem Drittel ein Gewichtsverlust von mehr als 5% des Ausgangsgewichtes [81]. Kachexie wird in 22% aller Todesfälle als Grund betrachtet, insbesondere beeinflusst die Kachexie jedoch die Effektivität der Behandlung (Chemotheraphie, Bestrahlung) und resultiert daher in einer kürzeren Überlebenszeit [82].

ROS und Kachexie

Bei Untersuchungen von kachektischen Ratten wurde eine hohe Bildung von ROS, Veränderungen im antioxidativen Status und die Bildung von Hydroperoxiden nachgewiesen [83]. Xanthinoxidoreduktase katalysiert neben anderen Enzymen wie die NADH-Oxidase die Bildung von Superoxid-Anionen. Superoxid-Anionen können durch ihre Beteiligung an der Membranlyse Gewebe schädigen und zu einer chronischen Inflammation mit erhöhter Ausschüttung von Akuten Phase Proteinen (APP) führen [84], die wiederum die Zytokinproduktion erhöhen. Die nicht-radikalische, aber dennoch hochoxidative und zytotoxische Spezies Peroxynitrit kann z.B. in der Reaktion von Superoxid-Anionen mit von der NOS produzierten NO-Molekülen entstehen und Zellverletzungen auslösen [85, 86, 87]. Xanthinoxidoreduktase bildet zusätzlich in ihrem Metabolismus als Produkt Harnsäure. Harnsäure wird im Immunsystem eine „danger signal“ Funktion zugeschrieben, die ebenso in einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen resultiert [88]. Oxidativer Stress induziert die Expression der Gene des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges, der sowohl den Abbau von Proteinen ermöglicht als auch den Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert [89]. Zu den Zytokinen gehören neben dem Tumor-Nekrose-Faktor TNF-α, Interferon (IFN)-γ, die Interleukine Il-1 und Il-6 und der Leukämie-Inhibitions-Faktor LIF. Zytokine sind verantwortlich für eine Aktivierung des

Ubiquitin-Proteasom-Signalweges mit resultierendem vermehrtem Proteinabbau der Skelettmuskulatur und Veränderungen im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel (Insulinresistenz). IL-1 und TNF-α haben eine große Bedeutung in der Entstehung der Anorexie bei Krebskranken durch einen Anstieg der Corticotropin-Hormone, die im Zentralennervensystem als Neurotransmitter die Nahrungsaufnahme verringern.

1.3 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte eine Methode zur Aktivitätsbestimmung der XOR aus Gewebeproben entwickelt werden. Diese Methode sollte die Forderung nach einer Möglichkeit für die Messungen von sehr vielen Proben in kurzer Zeit erfüllen, da sie zur XOR-Aktivitätsbestimmung aus großen Tierversuchen bestimmt war. Um diese Forderung zu erfüllen, sollten im Vorfeld Untersuchungen zur XOR Aktivität aus verschiedenen Geweben und Organismen ebenso wie Untersuchungen zu möglichen Fehlerquellen durch Verunreinigungen durchgeführt werden.

Ausgehend von der entwickelten Methode wurde Lebergewebe eines Tierversuches mit tumorkranken Ratten ausgewertet. Hierbei wurden die Tiere mit den XOR Inhibitoren Allopurinol und Oxypurinol in zwei unterschiedlichen Dosierungen behandelt und mit unbehandelten Tieren verglichen. Zu jeder Gruppe (mit Ausnahme einer Allopurinolgruppe) lagen Daten von schein-operierten (sham)-Tieren zum Vergleich vor.

Ebenso sollten Experimente zur Bildung von Superoxid-Anionen mit verschiedenen Substraten und XOR verschiedener Organismen durchgeführt werden. Inbesondere sollte eine Aussage getroffen werden, welche Isoform der XOR, XO oder XDH, mehr Superoxidradikale produziert.

Des Weiteren sollten Experimente mittels EPR zur Bestimmung des Elektronenflußes entlang der redoxaktiven Zentren FeSI und FeSII an verschiedenen Varianten der RcXDH durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Firma	Chemikalie
Alexis	1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine • HCl (CPH)
Duchefa	Tris-HCl Dithiotreitol (DTT)
Fluka	Bradford Reagenz
Promega	Entwicklungskit Westernblot
Roche	Xanthin Oxidase (Kuhmilch) (XO)
Serva	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)
Sigma	Alle weiteren Chemikalien

2.1.2 Chromatografiemedien und Säulen

Firma	Matrixmaterial
Amersham Bioscience	Nick-Säulen (Sephadex G-50) PD-10 Säulen (Sephadex G-25) NAD Säulen (Sephadex G-25)
Qiagen	Ni-NTA Superflow Matrix
Sigma	QAE-Sepharose
Pharmacia	Superdex 200 Superose 12
Biorad	Hydroxylapatit

2.1.3 Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
SDS PAGE Unit	Biorad
Äkta basic	Amersham Biosciences
Kühlzentrifuge 6K15	Sigma/ Sartorius
French Press	American Instruments Company, Maryland, USA
Miniscope MS 200 mit Biotemperaturkontroller	Magnettech
9,5GHz X-Band ESP300E	Bruker

UV/VIS 2401 PC	Shimadzu
Temperature controller UV/VIS Julabo F25	Shimadzu

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

Standardlösungen, Puffer und Medien wurden mit Millipore-Wasser hergestellt und sind in den entsprechenden Kapiteln zu Proteinreinigungen und analytischen Methoden angegeben. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit HCl oder NaOH eingestellt. Medien und Zusätze wurden durch Autoklavieren (20 min, 1 bar, 121°C) oder Filtrieren (0,2 µM) sterilisiert.

2.2.2 SDS-und native PAGE

Bei der SDS-PAGE wurden Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Probenvorbereitung und Durchführung erfolgte nach dem Prinzip von Lämmli [90], jedoch enthielten sowohl Sammel- als auch Trenngel kein SDS. Die Proteindetektion erfolgte durch die Bindung des Coomassie-Farbstoffes im sauren Milieu an die basischen Gruppen der Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin. Das Gel wurde direkt nach der Gelelektrophorese für 30 min in einer Färbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure und 0,25 g/l Coomassie Brilliant Blue R) geschwenkt. Nach der Fixierung und Färbung wurde das Gel mindestens 30 min bis zur deutlichen Erkennbarkeit der Proteinbanden entfärbt. Die Nachweisgrenze lag bei ~400 ng Protein/Bande.

Während einer nativen PAGE wurden die Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen getrennt, so dass eine selektive Aktivitätsüberprüfung durchgeführt wurde. Die Proben wurden nicht mit Mercaptoethanol versetzt und wurden nicht gekocht. Das Gel wurde im Anschluß an die Elektrophorese in 100 mM Tris, pH 7,8, 50 mM MTT und einem spezifischen Substrat 20 min im dunklen gefärbt (XOR mit 1 mM Xanthin, AOX mit 1 mM Phenanthridin).

2.2.3 Immunoblot-Analyse

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele für 10 min in Transferpuffer (10% Ethanol in 50 mM Tris, 200 mM Glycin) äquilibriert. Für den Transfer der Proteine auf

die Trägermembran (HybondTM-P, GE Healthcare) wurde die Blot-Apparatur gemäß den Herstellerangaben von Bio-Rad (Mini Trans-Blot Cell) zusammengebaut. Das Blotten erfolgte bei 125 mA über 1h (3 mA/cm^2). Im Anschluss wurde die Membran mehrmals mit 1 x TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) und 1 x TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% TWEEN, pH 7,5) gewaschen. Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (5% Milchpulver in 1 x TBS) geschwenkt. Nach dem Entfernen der Blockierlösung wurde der Xanthin-Oxidase Antikörper AB-2, Klon 154,4 (Neomarkers) in einer 1/1000 –Verdünnung für 1 h und darauf folgend der gekoppelte α-Maus-AP-Sekundärantikörper 1/7500 (Sigma) auf der Membran unter Schwenken belassen. Nach jeder Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern wurde die Membran mehrmals gründlich gewaschen. Zur Entwicklung wurde ein Färbekit der Firma Promega benutzt, der als Farbstoff NBT enthält. Die Membran wurde mit der Färbelösung überschichtet und 3 min entwickelt.

2.2.4 Proteinreinigung aus Gewebe

Die verwendete XOR aus Geweben wurden in bis zu vier unterschiedlichen Reinheitsstufen aufgearbeitet. Als Grundlage der Methodenwicklung dienten Varianten von Maia et al [91] und Landmesser et al [92].

1. Stufe: Homogenat mit anschließender Zentrifugation

Das gefrorene Gewebe wurde mittels eines Ultraturrax (IKA-Werke) in 2-fachem Volumen eiskalten 50 mM Tris-Puffer (pH 7,8; 200 mM NaCl, 2 mM PMSF) 30 sec homogenisiert, anschließend bei 4°C 60 min mit 30.000 x g zentrifugiert und die lösliche Proteinfraktion verwendet.

Stufe2: Ammoniumsulfatfällung

Die in Stufe 1 erhaltene Suspension wurde für 10 min im Wasserbad schnell auf 55°C erhitzt, im Eisbad auf 4°C abgekühlt und bei 30.000 x g für 10 min zentrifugiert. Eine Ammoniumsulfatlösung wurde bis zum Erreichen einer 60% Sättigung langsam unter Rühren hinzugegeben. Nach einer Stunde unter Rühren bei 4°C wurde das ausgefallene Protein mittels Zentrifugation (30.000 x g, 20 min) abgetrennt und in 2-fachem Volumen Puffer (50 mM $NaPP_i$, pH 7,5) aufgenommen. Verbliebenes

Ammoniumsulfat wurde durch die Verwendung einer Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25, Amersham Bioscience) entfernt.

Stufe 3: Gelfiltrationschromatografie/Hydroxylapaptit-Säule

Im Anschluß an die Ammoniumsulfatfällung wurde eine Gelfiltrationschromatografie unter Verwendung einer Superdex 200 Säule mit einem Säulenvolumen von 15 ml an einem ÄktaBasic-System (GE Healthcare) mit einer Flußrate von 0,5 ml/min und einem Gesamtprobenvolumen von 500 µl durchgeführt. Bei der Gelfiltrationschromatografie werden mittels Siebeffekt die Moleküle nach Molekülgröße und Gestalt getrennt. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit 50 mM Tris Puffer, pH 7,5, 200 mM NaCl. Das eluierende Protein wurde in 500 µl Fraktionen gesammelt, alle Fraktionen wurden mittels nativer PAGE auf ihre Aktivität mit Xanthin und Phenanthridin überprüft, konzentriert mittels Ultrazentrifugation (Centripreps 3/10, Millipore, Ausschlußvolumen 30 kDa) und bei -80°C gelagert (Reinheitsstufe 3a).

Um eine höhere Reinheit zu erzielen, wurde in einigen Versuchen zuvor eine Ionenaustauscher/Affinitätschromatografie mit Hydroxylapatit als Matrix durchgeführt. Hydroxylapatit ist ein Calciumphosphatmaterial, das Proteine über zwei Mechanismen bindet. Saure Proteine bilden über die Carbxylgruppen Komplexverbindungen mit dem Calcium des Hydroxylapatits aus, basische Proteine werden hingegen über elektrostatische Wechselwirkungen ihrer Aminogruppen mit der basischen Oberfläche der Matrix gebunden. Kleineren Proteinen ist eine Bindung nicht möglich, so dass niedermolekulare Substanzen wie Substrate oder Vitamine entfernt werden konnten.

Nach Äquilibrierung der Säule mit einem Säulenvolumen von 120 ml mit 50 mM NaPPi pH 7,5 wurde die Proteinlösung auf die Säule gegeben und mit 2 Säulenvolumen NaPPi Puffer ansteigender Konzentration (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM und 400 mM) bei einer Flußrate von 3 ml/min eluiert. Die Eluate wurden gesammelt und auf XOR bzw AOX Aktivität mittels nativer PAGE überprüft. Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und bei -80°C gelagert (Reinheitsstufe 3b).

In allen Reinheitsstufen wurde mittels Westernblot und Benutzung des Xanthin-Oxidase Antikörpers der Firma Neomarkers XOR nachgewiesen.

2.3 Expression und Reinigung von rekombinanter XDH und mAO aus *R.capsulatus*

Eine Einzelkolonie wurde in 50 ml LB- (Luria Bertani: 10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt ad 1 l ddH_2O, pH 7,0) Flüssigmedium (inkl. 1 mM Molybdat und 0,02 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) und 150 µg/ml Ampicilin) überführt. Für die mAO wurde anstatt Trypton der gleiche Anteil Pepton verwendet. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (170 rpm) für 12-16 h bei 37°C. Aus dieser Vorkultur dienten 4 ml zum Animpfen einer 1000 ml Großkultur. Diese wurde bei 30°C bei 130 rpm 16 h geschüttelt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugieren (5.000 x g, 5 min, 4°C), im Anschluß wurde das Zellpellet in 8 fachen Volumen Puffer (50 mM NaPPi, 300 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert. Der mechanische Aufschluß erfolgte durch 3-5maliges Passagieren der Zellsuspension durch eine vorgekühlte French Press Zelle bei 1200 psi und anschließender Zentrifugation des Lysates bei 20.000 x g für 20 min.

Die nach der French Press mit folgender Zentrifugation erhaltene lösliche Proteinfraktion wurde mittels Ni-NTA Affinitätschromatografie weiter gereinigt. Die rekombinante RcXDH ist N-terminal mit einem His-Tag versehen, welcher sehr spezifisch mit den komplexierten Nickel-Ionen der Ni-NTA-Matrix (Qiagen) interagiert Für die Elution wurde Imidazol als Kompetitor zugegeben, welcher das His_6-Tag-Protein von der Matrix verdrängt.

Die lösliche Proteinfraktion wurde mit Imidazol (finale Konzentration 10 mM) und 2 ml Ni-NTA Matrix pro Liter des Kulturansatzes versetzt und bei 4°C 30 min gerührt. Die Suspension wurde in eine Tropfsäule überführt, mit 2 Säulenvolumen 50 mM $NaPP_i$-Puffer, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 8,0 und mit weiteren 2 Säulenvolumen 50 mM $NaPP_i$-Puffer, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 8.0 gewaschen. Das rekombinante His_6-getaggte Protein wurde mit 50 mM $NaPP_i$-Puffer, 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 8,0 eluiert und die entsprechenden Fraktionen über Nacht gegen 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, pH 7,5 dialysiert.

2.3.1 Reinigung der RcXDH

Das Dialysat wurde auf eine Q-Sepharose FPLC Säule, angeschlossen an einem Äktabasic System (GE Healthcare), gegeben und mit einem 50 mM NaPPi-Puffer, pH 7,5, NaCl Gradienten von 0-250 mM eluiert. RcXDH enthaltende Fraktionen

wurden gesammelt und mittels einer Sepharose 4B/Folat-Gelaffinitätschromatografie weiter gereinigt. Die inaktive Form wurde durch Waschen mit 20 mM Tris, 0,2 mM EDTA, pH 7,8, 10% Pyrophosphat abgetrennt. Die aktive Form der RcXDH konnte mit 20 mM Tris, 0,2 mM EDTA, pH 7,8, 15% Pyrophosphat und 20 mM Salicylat von der Säule eluiert werden. Nach Konzentration durch Ultrazentrifugation (Centripreps 3/10, Millipore) und Gelfiltration mittels einer PD-10 Säule zum Überführen in 20 mM Tris, 0,2 mM EDTA, 2,5 mM DTT, pH 7,8 wurden die Proteine bei -80°C gelagert.

2.3.2 Reinigung der AO

Die AO wurde rekombinant nach einer Methode von Silvia Schumann gereinigt [93]. Hierbei wurde eine Ni-NTA und Benzamidin-Affinitätschromatografie benutzt. Nach Konzentration durch Ultrazentrifugation und Gelfiltration mittels einer PD-10 Säule zum Überführen in 20 mM Tris, 0,2 mM EDTA, pH 7,8 wurden die Proteine bei -80°C gelagert.

2.4 Charakterisierung der gereinigten Proteine

2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen: Angereinigte Proteine wurden mittels Bradford-Assay gemäß Anleitung quantifiziert. Rinder-Serum Albumin wurde als Standrad benutzt. Alle anderen Proteine wurden über die spezifische Absorption des FAD-Kofaktors bei 450 nm (XOR), bzw 465 nm (RcXDH) quantifiziert. Hierbei wurde das Lambert-Beersche Gesetz genutzt mit den spezifische Extinktionskoeffizienten von 35,8 mM^{-1} cm^{-1} für XOR und 31,6 mM^{-1} cm^{-1} für RcXDH [94].

2.4.2 Entfernung des FAD-Kofaktors mit anschließender Bestimmung des FAD-Gehaltes per HPLC

Zur Entfernung des FAD Kofaktors wurde XOR über 2 h mit 25 mM NADH unter aeroben Bedingungen reduziert [95]. Nach der Zugabe von 1,5-fachen Volumen einer 5 M Kaliumiodidlösung wurde herausgelöstes FAD mittels einer Nick-Gelfiltrationssäule entfernt. Die Proteine wurden sofort auf ihre Aktivität mit Xanthin überprüft und anschließend bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung des FAD Gehaltes wurde die Proben 3 min bei 97°C gekocht und denaturierendes Protein mittels Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde per HPLC auf das fluoreszierende Flavin untersucht. Die Kalibrierung wurde mit FAD (Sigma) bei einer Absorption von 442 nm und einer Emission bei 510 nm und einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Es wurden keine chromatografischen Medien an das System angeschlossen.

2.4.3 Umwandlung der XO-Form in die XDH Form

In einigen Experimenten wurden beide Isoformen der XOR auf ihre Aktivität mit Xanthin, NAD und NADH hin überprüft. Hierzu wurde jeweils die Hälfte der Proteinlösung 2 h bei RT mit 5 mM DTT inkubiert.

2.5 EPR Spektroskopie und Spintrapping

In dieser Arbeit werden sowohl die Arbeiten zur Untersuchung des Elektronenflußes durch die XOR als auch die Aktivitätsbestimmung der von XOR gebildeten Sauerstoffradikale mit Spintrapping-Experimenten mittels Elektronen-Spin-Resonanz (EPR) durchgeführt. Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die Methode EPR gegeben werden.

2.5.1 Theoretische Hintergrund

Mittels EPR kann die elektronische Struktur paramagnetischer Substanzen (z.B. Übergansmetalle und freie Radikale untersucht werden. Informationen über den Spinzustand und die Spindichteverteilung können erhalten werden. Daraus lassen sich z.B. bei einem freien NO-Radikal mit einem Spinzustand von S =1/2 auch indirekt Informationen über die räumliche Struktur erhalten. Hier soll eine kurze Einführung in diese Methode gegeben werden, wobei nur die auftretenden Wechselwirkungen betrachtet werden. Weitere Wechselwirkungen werden in Standardwerken beschrieben [96].Ebenso ist eine Quantifizierung der Radikalmenge über das Integral des EPR Spektrums möglich. Paramagnetische Substanzen weisen mindestens ein ungepaartes Elektron auf. Elektronen können auf Grund ihres Eigendrehimpulses oder Spins S Wechselwirkungen mit äußeren Magnetfeldern eingehen. Mit dem Spin ist ein magnetisches Moment μ_s verbunden (Gleichung 6).

Gleichung 6

$$\mu_s = -g_e \mu_B \hat{S}$$

Das hierbei verwendete Bohr´sche Magneton β setzt sich aus der elektrischen Ladung e, der Masse m eines Elektron, dem Planckschen Wirkungsquantum h und der Lichtgeschwindigkeit c zusammen (Gleichung 7).

Gleichung 7

$$\beta = eh/2mc$$

Das Verhältnis von magnetischem Moment μ und Spindrehimpuls S wird durch die dimensionslose Konstante g_e definiert. Für ein freies Elektron beträgt dieser Wert 2,0023193. Diese Konstante wird auch als „g-Faktor“ bezeichnet [96].

Diese Wechselwirkung des Elektronenspins mit einem äußeren Magnetfeld wird als Zeeman-Wechselwirkung bezeichnet und führt zu einer Aufspaltung der Energienieveaus des Elektronenspin (*S*) in zwei unterschiedliche Zustände. Jeder Zustand wird von einer magnetischen Quantenzahl $m_S = \pm 1/2$ beschrieben und gibt die Richtung des Spins (up oder down) relativ zum Magnetfeld an (Abbildung 10). Die magnetische Quantenzahl m_s drückt die z-Komponente des Elektronenspins aus, wenn z die Feldrichtung des Magnetfeldes ist. Anhand Gleichung 6 ist zu erkennen, dass der Spin des magnetischen Moments des Elektrons entgegengesetzt ist.

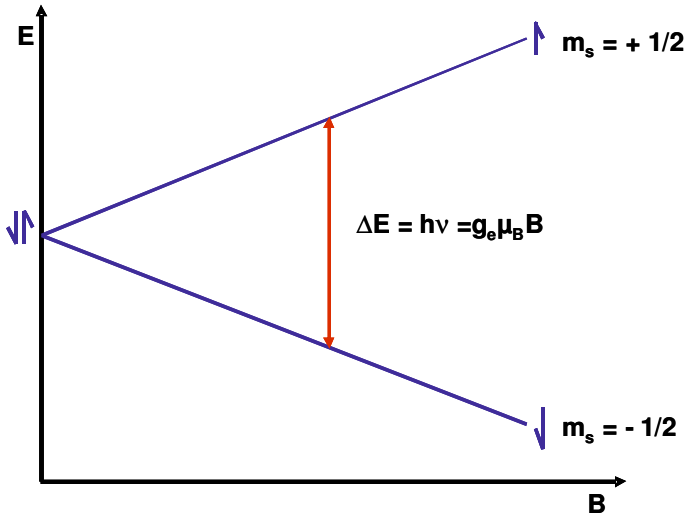


Abbildung 10:Zeeman-Effekt: Aufspaltung der Energieniveaus von Elektronen im magnetischen Feld

Die Energie eines magnetischen Moments μ_s eines Elektrons im Magnetfeld wird durch diskrete Werte beschrieben. Da m_s für einen beliebigen Spin S die Werte –S, -S+1,…, S+1, S annehmen kann, liegt bei einem NO-Radikal mit S = ½ $m_S = \pm 1/2$ vor (Gleichung 8).

Gleichung 8

$$E_{1,2} = \mu_s B = g_e \mu_B \Delta B m_s$$

Zwischen den beiden Energieniveaus können Übergänge durch das Einstrahlen elektromagnetischer Strahlung induziert werden. Die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung muss die Resonanzbedingung erfüllen (Gleichung 9).

Gleichung 9

$$\Delta E = g_e \mu_B B m_s = h\nu$$

Die benötigte Energie liegt im Bereich der Mikrowellen und ist proportional zur Größe des äußeren magnetischen Feldes.

Für eine Übergang ist eine unterschiedliche Besetzung der Energieniveaus notwendig. Die Besetzung N der Energieniveaus ist entsprechend des Boltzmann-Faktors von der Temperatur abhängig (Gleichung 10).

Gleichung 10

$$N_{up} / N_{down} = e^{-\Delta E / kT}$$

Daraus ergibt bei Raumtemperatur und einer Frequenz von ν = 9,5 GHz ein Besetzungunterschied von N_{up}/N_{down} von ca. 1/1000. Daraus resultiert eine geringe Empfindlichkeit der EPR.

In einem Molekül befindet sich das ungepaarte Elektron in einem Molekülorbital und geht Wechselwirkungen mit anderen Elektronspins und Kernspins in der Umgebung ein. Diese Wechselwirkungen resultieren in einer Verschiebung des g-Faktors abhängig von der Orientierung des Elektrons im äußeren Magnetfeld. Sowohl der g-Faktor als auch das erhaltende Spektrum ist für jedes Elektron in einem definierten Molekül charakteristisch. In fester Matrix muss der g-Wert daher Tensor (3*3 Matrix) ausgedrückt werden und enthält somit die Hauptkomponenten g_x, g_y und g_z. Je nach Konformation und deren Symmetrie des Moleküls können diese Komponenten unterschiedlich sein. Ist $g_x = g_y = g_z$ wird ein isotroper g-Faktor beobachtet. Im axialsymmetrischen Fall sind zwei dieser Werte gleich, wohingegen bei einer rhombischen Molekülsymmetrie drei unterschiedliche Werte vorliegen. In flüssigen Lösungen führt im Allgemeinen die schnelle Bewegung der Moleküle zu einer zeitlichen Ausmittlung des g-Faktors, der dann als isotrop beobachtet wird

(Abbildung 11). In gefrorener Lösung oder Festkörpermessungen werden jedoch alle drei g-Faktoren beobachtet.

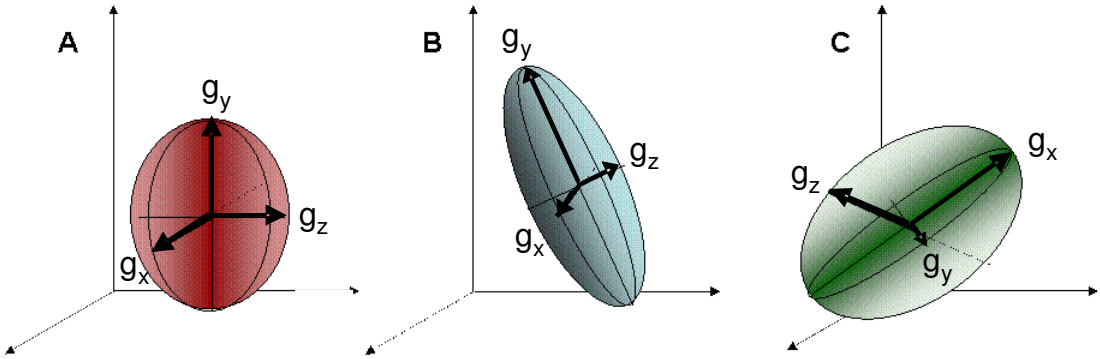


Abbildung 11: Abhängigkeit der g-Faktoren von der Symmetrie des Moleküls. A: isotrop, hierbei gilt $g_x = g_y = g_z$. , B: axialsymmetrisch mit $g_x = g_y \neq g_z$, C: rhombisch mit der Symmetrie der Vektoren $g_x \neq g_y \neq g_z$.

Die Energie eines paramagnetischen Systems wird vollständig durch den Hamilton-Operator beschrieben (Gleichung 11) [96]. In diesem Operator-Term sind alle Wechselwirkungen des Spins mit dem magnetischen Feld und Spin-Spin Wechselwirkungen enthalten, die zu einer Aufspaltung der Energieniveaus führen. *i* beschreibt die Anzahl der gekoppelten Elektronen, *j* die Anzahl der Kerne.

Gleichung 11

$$\hat{\mathrm{H}} = \sum_i \mathrm{H}_i^{EZ} + \sum_j \hat{\mathrm{H}}_j^{nZ} + \sum_{i,j} \hat{\mathrm{H}}_{i,j}^{hf} + \sum_{(i-1)!} \hat{\mathrm{H}}_i^{dip} + \sum_{(i-1)!} \hat{\mathrm{H}}_i^{ex}$$

Der Elektron-Zeeman-Operator $\hat{\mathrm{H}}_i^{EZ}$ beschreibt die Wechselwirkungen des Elektronenspins $\vec{S}_i$ mit dem äußeren Magnetfeld $\vec{B}$ (Gleichung 12).

Gleichung 12

$$\hat{\mathrm{H}}_i^{EZ} = \beta \vec{S}_i \cdot g_i \cdot \vec{\hat{B}}$$

Dieser Operator enthält die g-Matrix, welche die Orientierungsabhängigkeit des effektiven g-Faktors bestimmt.

Die Wechselwirkungen des Kernspins werden durch den Kern-Zeeman Hamilton-Operator $\hat{\mathrm{H}}^{nZ}$ und den Operator der Hyperfeinwechselwirkung $\hat{\mathrm{H}}^{hf}$ beschrieben. Ähnlich des Elektron-Zeeman-Operators beschreibt der Kern-Zeeman-Operator die

Wechselwirkung eines Kernspins $\vec{I}$ mit dem äußeren Magnetfeld $\vec{B}$ (Gleichung 13) statt.

Gleichung 13

$$\hat{\mathrm{H}}^{jZ} = \beta_j \vec{I} \cdot g_j \cdot \vec{B}$$

Jedoch gilt für diese Wechselwirkungen: $\hat{\mathrm{H}}^{nZ} << \hat{H}^{EZ}$.

Die Wechselwirkung eines Elektronenspins S mit einem Kernspin I wird durch den Hyperfein-Hamilton-Operator $\hat{\mathrm{H}}^{hf}$ beschrieben und kann unter Benutzung des Operators $\vec{S}$ für den Elektronenspin, $\vec{I}$ für den Kernspin und A für die Hyperfeinkopplungskonstante dargestellt werden (Gleichung 14).

Gleichung 14

$$\hat{\mathrm{H}}^{hf} = \vec{S} \cdot A \cdot \vec{I}$$

Der Hyperfeinwechselwirkungstensor A besteht aus einer isotropen Feinkopplungskonstante (a_{iso}) und einem anisotropen Hyperfeinwechselwirkungstensor A` (Gleichung 15).

Gleichung 15

$$\hat{\mathrm{H}} = a_{iso} SI + SA`I$$

Der isotrope Anteil, auch als Fermi-Kontakt-Term bezeichnet, entsteht durch die richtungsunabhängige Wechselwirkung zwischen dem Kern und der Spindichte des ungepaarten Elektron bei einem Abstand zum Kern mit r=0 (Gleichung 16) [97].

Gleichung 16

$$E_{hfiso} = -8\pi / 3 \left|\Psi(0)\right|^2 \langle \mu_e \mu_N \rangle$$

Jedoch ist nur für s-Orbitale eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit $\left|\Psi(0)\right|^2 \neq 0$ am Kernort gegeben. Ein ungepaartes Elektron hält sich jedoch meistens in einem π-Orbital auf. Durch die Spinpolarisation ist es möglich, dass ein ungepaartes Elektron aus einem π-Orbital die Spinpaarung im energetisch tieferliegenden s-Orbital stört und somit eine Spindichte auch im s-Orbital vorliegt.

Der anisotrope Anteil A´ setzt sich aus einer winkelabhängigen Dipol-Dipol Wechselwirkung der magnetischen Momente des Elektrons und des Kerns zusammen. Bei einem großen Abstand r von Kernspin und Elektronspin kann die anisotrope Wechselwirkung vereinfacht ausgedrückt werden und entspricht der Punkt-Dipolnäherung(Gleichung 17). Hierbei stellt γ den Winkel zwischen der Achse der Verbindung zwischen dem magnetischen Moment des Elektrons μ_e und dem magnetischen Moment des Kerns μ_N mit dem äußeren magnetischen Feld dar. A´ ist hierbei axial und benutzt die Hauptwerte $A_1' = A_2' = -A_0$ $\gamma = 90°$, wobei $A_3 = 2A_0$ für $\gamma = 0°$. In Lösungen wird dieser Term auf Grund der schnellen Rotation der Moleküle und der resultierenden örtlichen Mittelung nicht berücksichtigt.

Gleichung 17

$$E_{hfdipolar} = -A_0 / r^3 (\mu_e \mu_N)(3\cos^2 \gamma - 1)$$

Aufbau und Funktion eines EPR-Spektrometers

Ein typisches EPR-Spektrometer besteht aus einem Mikrowellenteil und einem Magneten. Hinzu kommen noch die Nachweiselektronik und ein Computer zur Signalerfassung und Bedienung des EPR-Gerätes. Der Mikrowellenteil umfasst die Mikrowellenquelle, den Resonator und den Referenzarm mit Abschwächer (Abbildung 12).

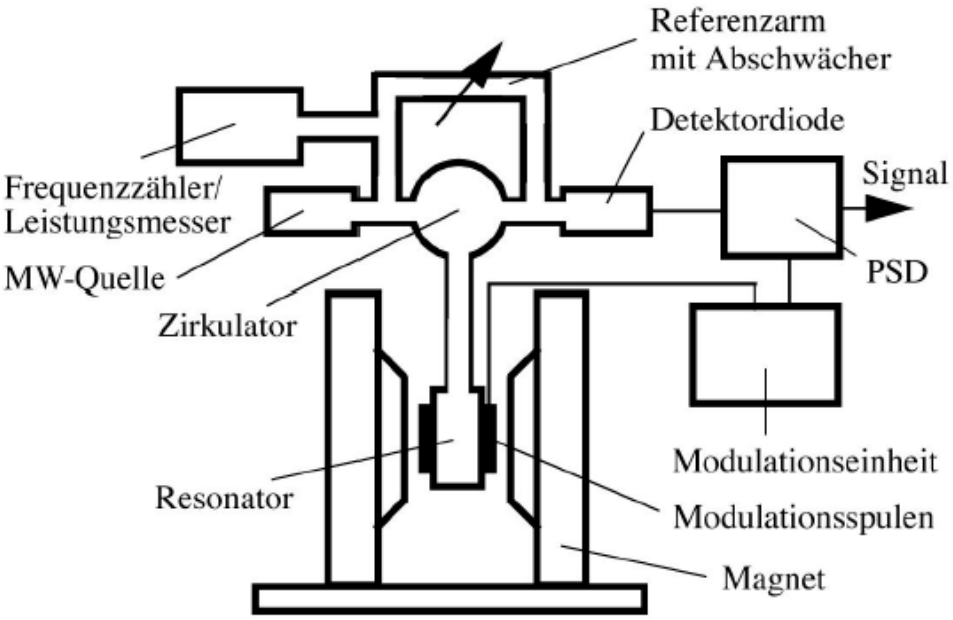


Abbildung 12: Prinzipieller Aufbau eines EPR-Spektrometers [98]

In der Mikrowellenquelle, die auch als Brücke bezeichnet wird, wird sowohl die Mikrowelle erzeugt als auch die Resonanzabsorption des Elektronenspins der in den Resonator eingeführten Probe gemessen. Der Mikrowellenresonator ist ein Hohlraum, dessen Größe ungefähr der Mikrowellenfrequenz entspricht. Um die empfindlichen EPR-Übergänge detektieren zu können, wird zunächste die Mikrowellenfrequenz exakt auf die Resonanzfrequenz des Resonators abgestimmt, so dass keine Mikrowelle vom Resonator reflektiert wird. Während einer EPR-Messung wird das Magentfeld verändert und die Resonanzbedinung für einen Übergang erfüllt. Hierdurch wird durch die Probe Mikrowellenleistung absorbiert, die Impedanz des Resonators steigt. Durch die steigende Impedanz kommt es zu einer Reflektion der Mikrowelle vom Resonator. Die reflektierte Mikrowelle kann über eine Diode als EPR -Absorption detektiert werden (Abbildung 13). Um die Nachweisempfindlichkeit zu steigern, wird eine Feldmodulation angewandt und das Signal in der ersten Ableitung dargestellt.

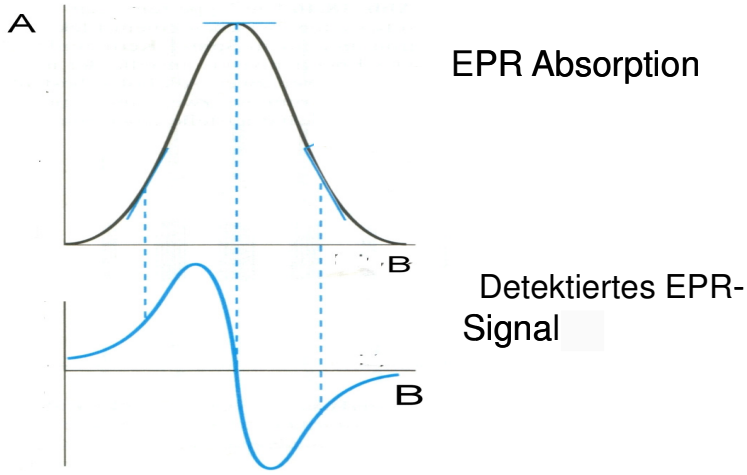


Abbildung 13: Schematische Darstellung der EPR-Absoprtion mit resultierender erster Ableitung des Signals.

2.5.2 EPR-Experimente mit Varianten der RcXDH

Messungen zur Strukturaufklärung von Mutanten der RcXDH wurden in mit einem 9,5GHz X-Band EPR Gerät ESP300E der Firma Bruker, ausgestattet mit einem Standardrechteckresonator TE_{102} durchgeführt. Die Experimente erfolgten in einem Temperaturbereich zwischen 6 K und 100 K. Hierzu wurde ein Oxford ESR 900 Helium Kryostat mit einem Oxford ITC4 Temperaturkontroller verwendet. Die Mikrowellenfrequenz wurde über einen EIP frequency counter (Microwave Inc.) detektiert. Die Kalibrierung des magnetische Feldes erfolgte mittels eines LiLiF Standard mit einem bekannten g-Wert von 2,002293 +/- 0,000002 [99]. Um die [2Fe2S]-Cluster zu reduzieren, wurden 90 µl der Proben (0,1 mM) im Argon Gegenstrom in ein EPR-Quarzröhrchen eingefüllt und mit 10 µl entgaster Dithionitlösung in 20 fachem Überschuss reduziert. Nach erfolgtem Farbumschlag wurden die Kapillaren vorsichtig in flüssigem Stickstoff eingefroren und für alle Experimente in gefrorenem Zustand gehalten.

Basislinienkorrekturen wurden, sofern notwendig, über eine Subtraktion des Pufferhintergundspektrums durchgeführt. Die Simulation der experimentellen EPR Spektren erfolgte mit dem Programm *EasySpin* [100].

2.5.3 Spintrapping von Sauerstoffradikalen

Sauerstoffradikale haben durch das freie Elektron paramagnetische Eigenschaften und sind somit EPR aktiv. Die Halbwertszeit dieses Radikals ist jedoch viel zu kurz, um eine Detektion bei Raumtemperatur zu ermöglichen. Die Reaktion eines

Superoxid-Anions mit einem sogenannten „Spintrap“ erlaubt es, Sauerstoffradikale durch eine chemische Reaktion in stabile Radikale umzuwandeln und deren Konzentration per EPR zu bestimmen. Spintraps sind diamagnetische Substanzen, die mit Radikalen zu einem relativ stabilen, EPR-aktiven Produkten reagieren. Das erhaltene Spektrum ist sowohl für die Art des Spintraps als auch für die Eigenschaften des gebundenen Radikals charakteristisch. Gebräuchliche Spintraps sind Nitronderivate, in dieser Arbeit wird jedoch auf das Hydroxylamin 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CPH) zurückgegriffen. CPH reagiert mit Sauerstoffradikalen zu einem stabilen Nitroxylradikal Carboxy-Proxyl (CP*) (Abbildung 14).

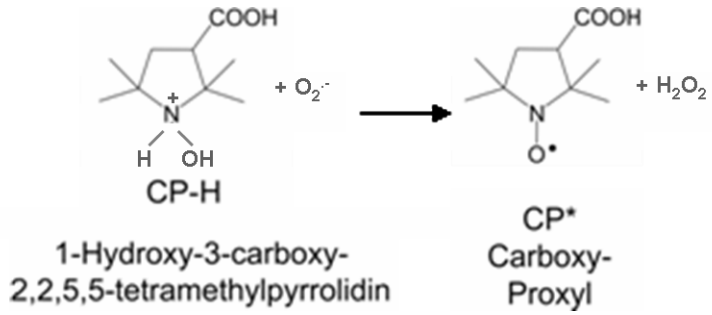


Abbildung 14: Reaktion des Spintraps CPH mit Sauerstoffradikalen zu CP*.

Das Nitroxylradikal ist durch die Methylierung in para-Position des Pyrrolidins bis zu 10 min stabil und kann somit per EPR in Lösung bei RT vermessen werden.

In Abbildung 15 sind Spektren des Spinadduktes abgebildet. In rot dargestellt eine Messung des Spintraps CPH mit XO aus der Kuhmilch nach 90 sec Inkubation bei 30C°. In blau ein Spektren desselben Ansatzes jedoch mit 100 µM des Substrates Xanthin. Die Auswertung zur Bestimmung der Aktivität erfolgte über die Signalintensitäten des mittleren Peaks.

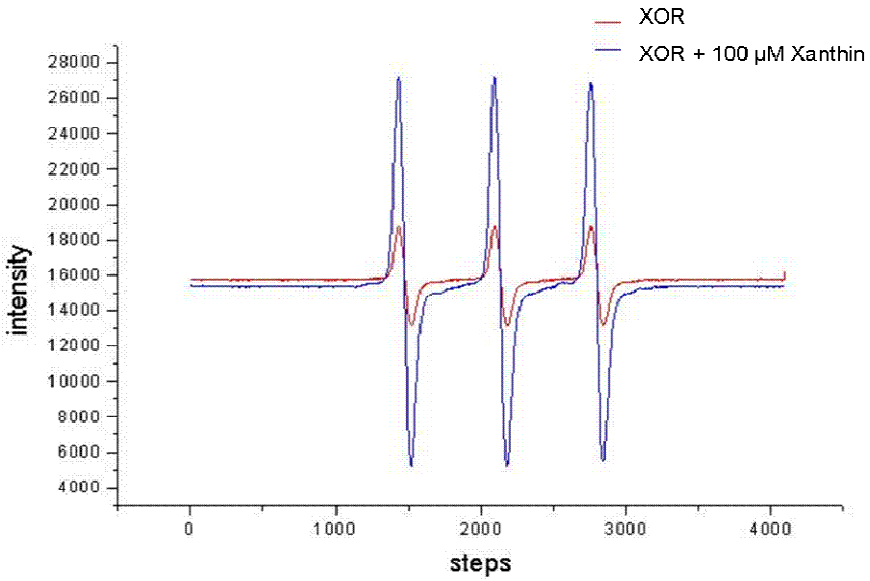


Abbildung 15: Spektren des Spinadduktes CP*. In rot dargestellt ist ein Messsignal von XOR mit CPH, in blau dargestellt ein Messsignal von XOR mit 100 µM Xanthin. Die Inkubationszeit betrug 90 sec. Messparameter: B0-Feld: 3357,26 G, Sweep 75 G, Sweeptime 30 sec, Modulationsamplitude 2000 mG, Mikrowellenabschwächung 6 dB, Frequenz 9,5 GHz.

Das Spektrum des CP*-Radikals setzt sich aus den nachfolgend erläuterten Wechselwirkungen zusammen: ein CP*-Radikal stellt ein durch Methylierung in β-Position ein stabiles NO-Radikal dar. Das Elektron in einem solchen Radikal die Spinquantenzahl S = ½ und wechselwirkt mit einem ^{14}N Kernspin von I = 1. In Lösung bei Raumtemperatur spaltet dieses Spinsystem mit einer Zeeman-Aufspaltung, einer Kern-Zeeman-Aufspaltung und einer isotropen Hyperfeinkopplungskonstante a in sechs Energieniveaus auf (Abbildung 16). Es ergeben sich drei verschiedene Übergänge, die zu den drei Linien gleicher Intensität in Abbildung 15 führen. Die anistrope, winkelabhängige Hyperfeinkopplung mittelt sich durch die schnelle Rotation der Radikale zu null.

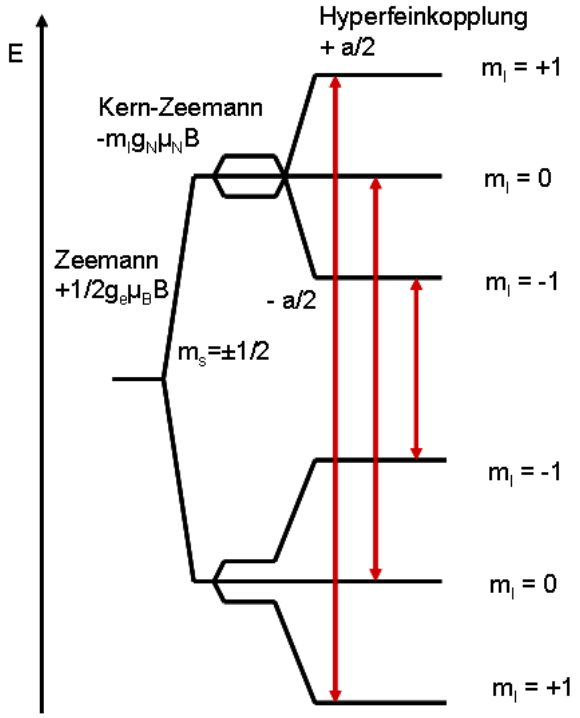


Abbildung 16: Spin-Energieniveaus eines NO-Radikals nach Aufspaltung im Magnetfeld durch die Zeeman, Kern-Zeeman Aufspaltung und Hyperfeinkopplung. In rot dargestellt sind mögliche EPR-Übergänge des NO-Radikals.

2.5.4 Probenvorbereitung und Durchführung der Aktivitätsmessungen mit XOR Proteinen

Eine über die in Kapitel 2.4.1 bestimmte exakte Proteinmenge (10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration mittels Bradford oder 0,027 µg/ml bestimmt über die spezifische Absorption) wurde zum Reaktionspuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA) und dem Spintrap CPH (5 mM) gegeben.

Die Detektion der Sauerstoffradikale erfolgte über chemische Stabilisierung der Radikale durch die Reaktion mit CPH zu einem stabilen Nitroxylradikal CP*. Die Kalibrierung wurde mit gelöstem CP* durchgeführt und unmittelbar danach per EPR vermessen.

Um die Hintergrundaktivität der XOR isoliert aus Lebergewebe des Tierversuches der Charite zu bestimmen, wurden die Proben nach 90 sec Inkubationszeit bei 30°C vermessen. Die Aktivitätsbestimmung der Probe mit den Substraten Xanthin (50-100 µM), NADH (100 µM), Phenanthridin (100 µM), Benzaldehyd (100 µM), die Substratgemische NAD/Xanthin (500 µM/ 50 µM), Xanthin/NADH (50 µM/ 100 µM), NAD/ Xanthin/ NADH (500 µM/ 50 µM/ 100 µM) und Xanthin/Phenanthridin (je 50

µM) wurde nach 90 sec Inkubationszeit bei 30°C durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Oxidation des Spintraps ausschließlich durch Sauerstoffradikale erfolgte, wurden stichprobenartig die Experimente mit dem Zusatz von 50 U Superoxiddismutase (SOD) durchgeführt. Ebenso wurde die XOR durch den Zusatz von 100 µM Allopurinol inhibiert und die Aktivität überprüft.

Die Messungen erfolgten bei einem B_o-Feld von 3357,26 G, der Sweep betrug 75 G, die Sweeptime 30 sec und die Modulationsamplitude 2000 mG. Weiterhin betrug die Mikrowellenabschwächung 6 dB und die Frequenz 9,5 GHz.

2.5.5 Bestimmung der Messfehlers in Gewebemessungen

Zur Bestimmung des Messfehlers in Aktivitätsbestimmungen der XOR aus Geweben wurde eine Rattenleber in drei Stücke geteilt und wie in Kapitel 2.2.4 bis zur Reinheitsstufe 3a gereinigt. Von allen drei Leberproben wurde die Aktivität mittels der Spintrap-EPR-Methode (Kapitel 2.5.4) bestimmt und verglichen.

2.5.6 Probengewinnung von den Ratten des Leberkarzinom-Tierversuches

Die Bildung von Sauerstoffradikalen durch XOR wurde an Wistar Ratten untersucht, denen ein Leberkarzinom induziert wurde. Zudem wurden die Auswirkungen der Gabe von XOR Inhibitoren (Allopurinol und Oxypurinol) beoabachtet. Die Induktion des Tumors erfolgte durch die intraperitoneale Injuktion von 10^8 AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen, Kontrolltieren (sham) wurde eine physiologische Kochsalzlösung verabreicht. Die Körperzusammensetzung der Tiere wurde mittels MRT (EchoMRI) an den Tagen 0 (vor der Inokulation), 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 17 gemessen. Die Scan-Dauer betrug 73 Sekunden. Da es sich nicht um ein bildgebendes Verfahren handelt, wurden die Tiere nicht narkotisiert, so dass diese Messung keine Belastung für die Tiere darstellte. Die spontane Aktivität der Tiere wurde über einen Zeitraum von 24 h mittels des Supermex-Lokomotor Systems gemessen, bei dem die Tiere einzeln in Standardkäfigen gehalten wurden und die Bewegung mittels Infrarot-Messung dokumentiert wurde. Die Messung wurde einmal vor der Inokulation des Tumor und einmal am Tag 10/11 des Protokolls durchgeführt (s. u.). Die Herzfunktion wurde mittels EKG auf Arrhythmien untersucht, zusätzlich erfolgte teilweise gleichzeitig noch eine echokardiographische Untersuchung. EKG und Echokardiographie wurden an den Tagen 0, 6, 11 und 17 durchgeführt. Bei den mit

den Inhibitoren Allopurinol und Oxypurinol behandelten Tieren wurde 24 h nach Inokulation der Tumorzellen mit der Behandlung begonnen. Die Dosierung der Inhibitoren betrug je 4 mg/kg Körpergewicht/Tag und 40 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die Behandlung, Pflege, Tötung der Tiere und Präparation der Organe wurde freundlicherweise von veterinärmedizinischen Doktoranden der AG Anker durchgeführt. Ebenso nahmen sie alle Messungen am lebenden Tier vor.

Nach Organentnahme wurde die Leber sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Jeweils 400 mg Lebergewebe pro Tier wurden anschließend wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben gereinigt und ebenso wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, jedoch nur mit 100 µM Xanthin per Spintrapping-Methode auf die XOR-Aktivität untersucht. Alle Messungen erfolgten mindestens doppelt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels des Student-t-Test auf ihre Normalverteilung überprüft und anschließend mittels ANOVA eine Signifikanzprüfung durchgeführt.

Versuchsprotokoll Kachexie-Prävention:

Tag -1:	Aktivitätsmessung 24 Stunden
Tag 0:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen, Echokardiographie, Blutprobe
Tag 1:	Tumor-Inokulation
Tag 2:	Randomisierung, Start Therapie
Tag 3:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen
Tag 5:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen
Tag 7:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen
Tag 9:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen
Tag 10:	Aktivitätsmessung 24 Stunden
Tag 11:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen, Echokardiographie, Blutprobe
Tag 13:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen
Tag 15:	NMR (Körperzusammensetzung), wiegen
Tag 17:	Ende Therapie, NMR (Körperzusammensetzung), wiegen, EKG und Echokardiographie, Tiertötung, Organ- und Blutentnahme

2.5.7 Bestimmung von Sauerstoffradikalen entstehend durch den Metabolismus von Cytochrom P450 und unter dem Einfluss von Katalase

Um mögliche Störquellen bei Gewebemessungen zu untersuchen, wurden zuvor an zwei gereinigten Enzymen, Cytochrom P450 und Katalase, Untersuchungen auf die Reaktionen mit dem Spintrap CPH durchgeführt.

Hierbei wurden die Auswirkungen auf 0,29 mg/ml Katalase von 10 µl einer 1- $3{,}3 \times 10^{-6}$% Wasserstoffperoxidlösung, 0,01 M Natronlauge, 10% Ethanol und den spezifischen Inhibitoren 100 µM Natriumcyanid und 100 µM Mercaptoethanol zur Verifizierung der Sauerstoffradikalquelle untersucht. 0,01 M NaOH wurde verwendet, da das Substrat in dieser Lösung solubilisiert wurde. Ebenso wurden gereinigtes Cytochrom P 450 mit den Substraten 100 µM Xanthin, 10% Ethanol und dem spezifischen Inhibitor Miconazol versetzt und die Sauerstoffradikalproduktion mittels CP* Detektion beobachtet.

2.6 UV/VIS Spektroskopie

Eingesetzt wurde ein Spektralphotometer der Firma Shimadzu Typ „UV/VIS 2401 PC“ mit Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Schichtdicke 1 cm mit einem Volumen von 200 µl. Unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetztes $E = \varepsilon cd$ lässt sich aus der gemessenen Extinktion E und des jeweiligen spezifischen Extinktionskoeffizienten ε die Konzentration c der detektierten Substanz berechnen.

2.6.1 Cytochrom C Assay

Die Reduktion des Cytochrom C lässt sich anhand der Extinktionszunahme bei 550 nm verfolgen. Der Messansatz enthielt 100 µM Cytochrom C (oxidierte Form), 50 µM Xanthin (bzw. 100 µM NADH), 50 U Katalase und eine definierte Menge XOR (5-50 µg/ml). Die Reaktion wurde nach Leerwertregistrierung durch Zugabe von XOR gestartet. Sollte der Einfluß von NAD (100 µM) bzw. SOD (30 µg) untersucht werden, erfolgte deren Zugabe vor dem Start der Reaktion. Zur Berechnung der reduzierten Menge an Cytochrom C bzw. der dazu notwendigen Superoxid-Anionen$^{\cdot}$ über das Lambert-Beersche Gesetz wurde ein Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{550\ nm}$ von 19,6 $mM^{-1}\ cm^{-1}$ verwendet.

2.6.2 Bestimmung des Dehydrogenase/Oxidase Verhältnisses

Das Dehydrogenase/Oxidase-Verhältnis wurde von Waud definiert um ein Vorliegen von Gemischen beider Isoformen (XO, XDH) zu klassifizieren [20]. Hierbei wurde die Enzymaktivität spektralphotometrisch über die Bildung des Endproduktes Harnsäure mit oder ohne Zugabe von 500 µM NAD verfolgt. Das Verhältnis wird gebildet durch den Messwert mit NAD durch den Messwert ohne NAD.

Der Messansatz enthielt 100 µM Xanthin und tlw. 500 µM NAD in 50 mM $NaPP_i$ – Puffer, pH 7,5. Die Messung erfolgte bei RT über 60 sec und wurde durch die Enzymzugabe gestartet. Die Bildung der Harnsäure ließ sich bei 292 nm verfolgen und über den molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{292\,nm} = 12{,}2\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ quantifizieren.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenentwicklung und allgemeine Untersuchungen an RcXDH und AOX

Um die XOR Aktivität aus unterschiedlichen Geweben zu bestimmen, wurde eine Methode entwickelt, welche eine schnelle und kostengünstige Probenvorbereitung als Ziel hatte. Die Art der Quelle der XOR wird bei jedem Versuch spezfiziert. Hierzu wurde Versuchsgewebe (Leber, Lunge, Muskel der Ratte und des Huhnes), das zum Teil auch zur Auswertung in Kapitel 3.3 benutzt wurde, bis zu unterschiedlichen Reinheitsstufen gereinigt und auf ihre Aktivität mit dem Substrat Xanthin per Spintrap-Methode untersucht.

In Abbildung 17 ist die für alle Messungen benutzte Eichgerade mit CP* Radikalen mit einem Korrelationsfaktor von 0,998 gezeigt. Eine Lösung von CP*-Radikalen wurde frisch angesetzt und jede Konzentration 5-mal vermessen. Die angesetzte CP*- Lösung wurde jeweils unmittelbar verbraucht. Hieraus ergibt sich eine Eichgerade für die Bestimmung der Signalintensität für CP*-Radikale. Im Folgenden wird von der Reaktion von je einem Sauerstoffradikal mit einem CPH-Molekül ausgegangen (Abbildung 14), so dass ein detektiertes CP*-Radikal mit einem in einer chemischen Reaktion entstandenen Sauerstoffradikal gleichzusetzen ist.

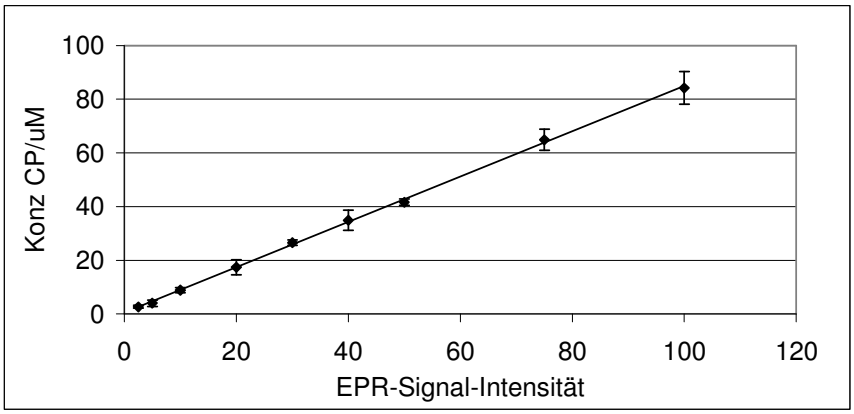


Abbildung 17: Darstellung der verwendeten Eichgerade bei allen Messungen mit dem Spintrapsystem. 2,5-85 µM CP* wurden nach 90 sec Inkubation bei 30°C vermessen. Die Untersuchungen zur Bildung von Sauerstoffradikalen wurden mit dem EPR-Spintrappingsystem durchgeführt.

3.1.1 Aktivitätsbestimmungen von Gewebe mit der Reinheitsstufe 1 von unbehandelten Tumortieren und deren Kontrollen

Die einfachste und schnellste Möglichkeit zur Messung von Enzymaktivitäten aus Gewebe ist eine Messung direkt nach der Homogenisierung und anschließender Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer. Diese Variante wird in der Literatur zur Bestimmung der XOR Aktivität beschrieben [92]. Bei Anwendung dieser Methode zeigten sich jedoch nicht zu erwartende Ergebnisse: von jeder Probe XOR aus Rattenleber wurde mittels Messung (nur XOR aus Rattenleber und Spintrap) die Hintergrundaktivität bestimmt. Wurde nur das zentrifugierte Rattenleber-Homogenat benutzt, war der Messwert nach Substratzugabe mit 10,2 +/- 6.2 nmol CP*/µg Protein niedriger als die Messung der Hintergrundaktivität mit 11,1 +/- 6,2 nmol CP*/µg Protein. Dieser Effekt war wiederholbar und trat bei 80% der Proben auf. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dieser Reinigungsmethode dargestellt. Auf Grund der stark schwankenden Messungen und der negativen Ergebnisse nach Substratzugabe mit sehr großem Messfehler konnte diese Methode nicht genutzt werden. Es wurde nach Alternativen gesucht. Zunächst wurden allgemeine Untersuchungen von XOR Proteinen durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen zu charakterisieren. Zusätzlich wurden weitere Reinigungsschritte eingefügt, um durch Verunreinigungen verursachte Messfehler auszuschließen.

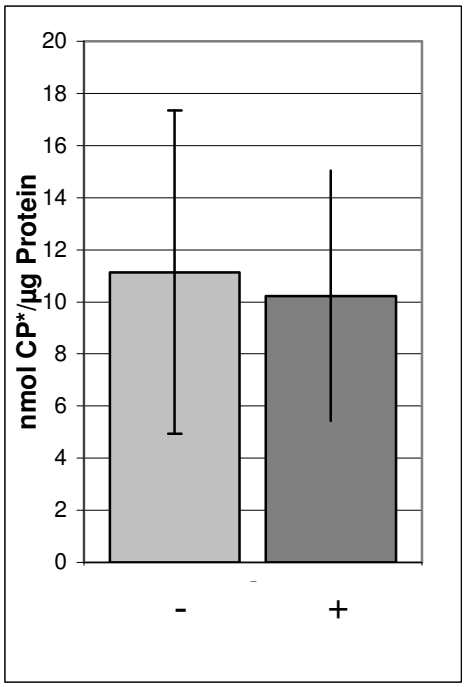


Abbildung 18: Darstellung der gebildeten CP*/nmol/µg Protein/min von Gewebe der Reinheitsstufe 1 (Homogenisation und Zentrifugation). In hellgrau mit dem Symbol – sind die Messungen der Hintergrundaktivität (n=9), in dunkelgrau mit dem Symbol + Messungen mit 50 µM Xanthin nach 90s Inkubation bei 30°C gezeigt.

3.1.2 Experimente zur Sauerstoffradikalproduktion der XOR und AO

Um Experimente zum Metabolismus der XOR durchzuführen, wurde die heterolog rekombinant exprimierte XDH des Bakteriums *R. capsulatus* benutzt. Untersuchungen an der AO erfolgten an rekombinant exprimierter Maus-AOX.

Expression und Reinigung RcXDH und AOX

Die Proteinreinigung von RcXDH erfolgte aus *E.coli* nach Leimkühler et al. [101]. Aus 12 l Kulturansatz konnten 14,5 µg RcXDH, aus einem 12 l Kulturansatz der AOX konnten 4,3 µg isoliert werden. Beide gereinigten Enzyme wurden für die im Folgenden durchgeführten Messungen verwendet.

Experimente mit RcXDH mit Substraten und Inhibitoren

Die von der XOR produzierten Sauerstoffradikale oxidieren den Spintrap CPH zu einem freien Radikal CP*. Um sicherzugehen, dass die Oxidation des Spintraps ausschließlich durch die von der XOR gebildeten Sauerstoffradikale geschah, wurden Untersuchungen mit spezifischen und unspezifischen Inhibitoren der XOR

durchgeführt. Hierzu wurde RcXDH benutzt. Mit dem unspezifischen Inhibitor SOD, welcher Sauerstoffradikale zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid abbaut, ist die deutlichste Inhibition der Oxidation um 88% des Spintraps zu erkennen (Abbildung 19). Ebenso wurde die Aktivität des Inhibitors KCN untersucht. KCN führt zu einer Desufirierung des Mocos unter Bildung von Thiocyanat. KCN zeigte wie die spezifischen Inhibitoren der Substratbindungsstelle am Moco, Allo-, bzw Oxypurinol eine ca. 50%ige Inhibition der Enzymaktivität.

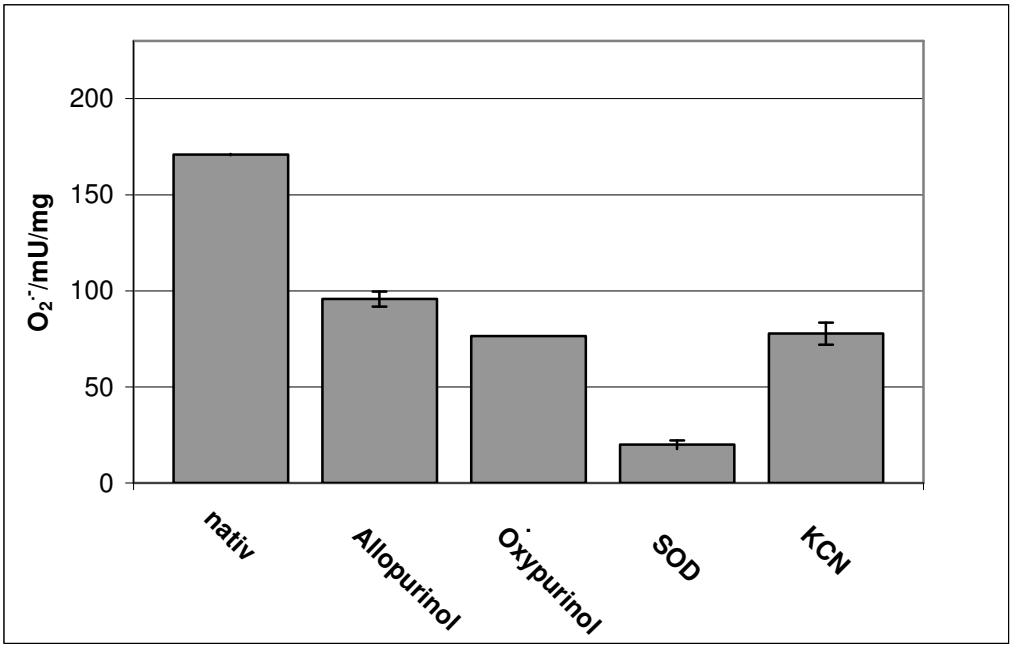


Abbildung 19: Wirkung von verschiedenen Inhibitoren auf die RcXDH Aktivität mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor mit 100 µM Xanthin als Substrat nach 3-fach Bestimmung. Eingesetzt wurden 0,025 µg RcXDH. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte vor dem Start der Reaktion, als Vergleich ist in Zeile 1 der Messwert ohne Inhibitor aber mit 100 µM Xanthin angegeben.

Bildung von Sauerstoffradikalen und Oxidation des Spintraps CPH durch Katalase und Cytochrom P 450

In ihrem Metabolismus können die Enzyme Katalase und Cytochrom P 450 Elektronen auf Sauerstoff übertragen, so dass untersucht wurde, welche Rolle Verunreinigungen durch Katalase und Cytochrom P 450 in Messungen der XOR Aktivität spielen könnten. In Abbildung 20 ist eine logarithmische Abhängigkeit der Oxidation des Spintraps durch den Zusatz von Katalase und ansteigenden Konzentrationen von Wasserstoffperoxid zu erkennen. Es zeigte sich, dass schon geringe Verunreinigungen durch Katalase und Wasserstoffperoxid eine erhebliche Oxidation des Spintraps verursachen.

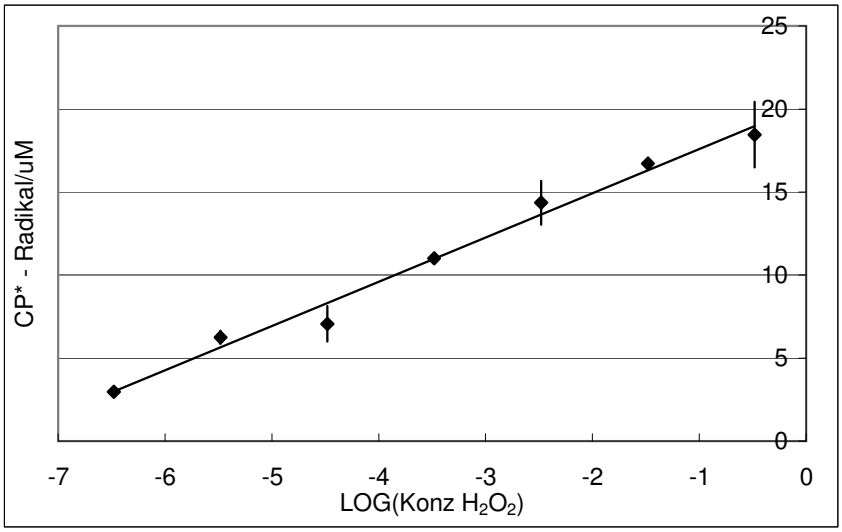


Abbildung 20: Bildung von oxidiertem CP* durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid mit 0,29 mg/ml Katalase. Bestimmtheitsmaß 0,986; 5-fach Messung der Datenpunkte.

Ebenso wurde die Wechselwirkung von Katalase auf den Spintrap CPH ohne Substratzugabe untersucht (Abbildung 21). Es zeigte sich, dass allein der Zusatz von Katalase ein Messignal von CP* Radikalen generiert. Eine Inhibition durch SOD war zu 50% möglich. Da sowohl Xanthin als auch die Inhibitoren Allopurinol und Oxypurinol in basischer Lösung gelöst wurden, sollte die Aktivität der Katalase in basischer Lösung untersucht werden. Die Zugabe von 100 µM 0,1 M NaOH führte zu einem 3-fachen Anstieg des Signals. Eine signifikante 70-fache Steigerung des Signals entstand durch die Zugabe des Häm-Protein Inhibitors KCN.

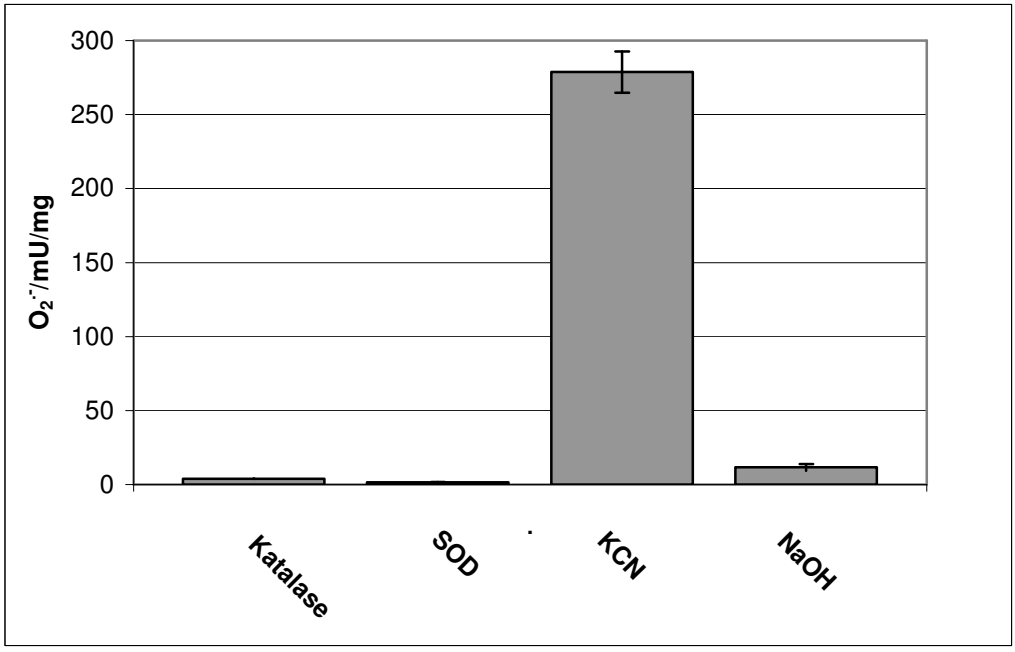


Abbildung 21: Oxidation des Spintraps durch 0,29 mg/ml Katalase ohne Substratzugabe und mit drei Inhibitoren. Hierbei wurden entweder 150 U SOD, 100 µM KCN oder 100 µM NaOH eingesetzt und bei 30°C 90 sec inkubiert.

Ebenfalls wurden die Auswirkungen von gereinigtem Cytochrom P450 auf den Spintrap CPH mit zwei Substraten und einem selektiven Inhibitor untersucht (Abbildung 22). Einen Anstieg des Messsignals kann schon bei einer Zugabe von Cytochrom P 450 ohne weiteres Substrat beobachtet werden. Durch Zugabe der Substrate Xanthin und Messung in 10% Ethanol wird ein weiterer Anstieg des detektierten CP* beobachtet. Verwendung des Cytochrom P450-Inhibitors Miconazol gleichzeitig mit dem Substrat Xanthin führt zu einem Absinken des Messsignals, vergleichbar mit dem Wert, der allein mit Cytochrom P450 erhalten wurde.

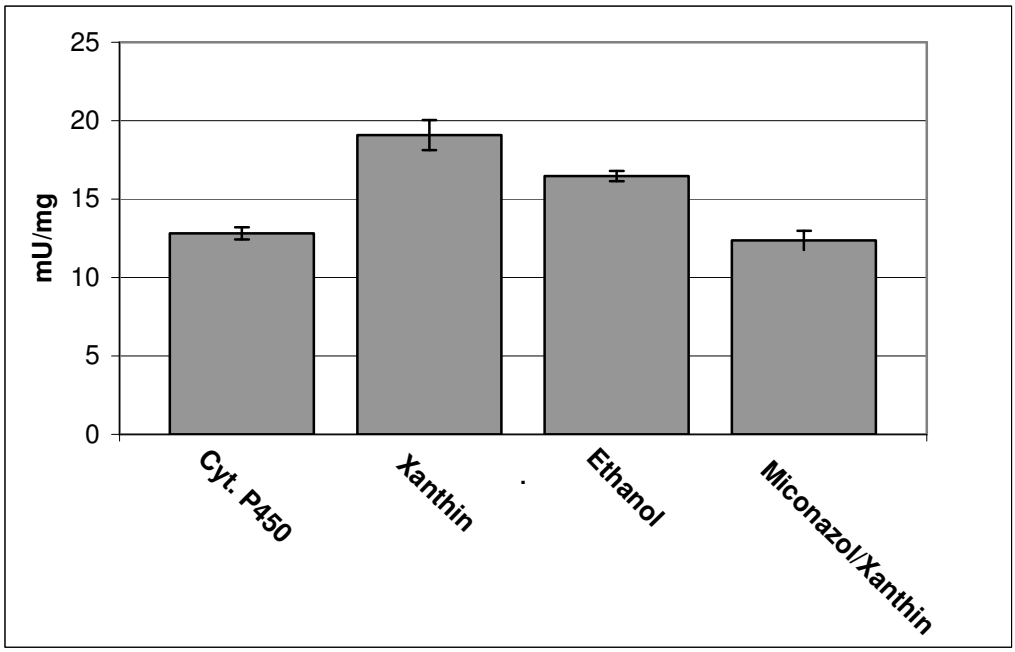


Abbildung 22: Oxidation des Spintraps durch 18nmol Cytochrom P 450 ohne Substratzugabe, mit den Substraten Xanthin (100 µM) und Ethanol (10%) und Inhibitor Miconazol (2 µM) mit Xanthin (100 µM).

3.1.3 Messungen mit AOX und XDH

Eine Trennung der beiden Molybdoenzyme XOR und AOX aus Gewebeproben der Rattenleber war auf Grund der großen Ähnlichkeit sehr schwierig und in dieser Arbeit nicht immer gelungen. Es wurde nach weiteren Wegen gesucht, bei Aktivitätsmessungen die Enzyme voneinander zu trennen. Ziel war es, eine Methode zur Ermittlung der XOR Aktivität in 100-300 mg großen Gewebeproben (Muskel oder Leber) zu entwickeln, die die Durchführung von Messungen von vielen Proben (n = > 300) ermöglicht. Auf Grund der Vorgaben kam eine aufwendige chromatografischeTrennung von XOR und AOX nicht in Frage. Es konnte jedoch eine Lösung über die unterschiedlichen Substratspezifitäten der Enzyme gefunden werden. Da diese jedoch sehr ähnlich sind, gestaltete sich die Auswahl der Substrate schwierig. In die Wahl genommen wurden die Substrate Benzaldehyd und Phenanthridin für AOX und Xanthin für XOR [59].

Verwendung von Benzaldehyd als Substrat

Um Benzaldehyd als mögliches spezifisches Substrat der AOX bewerten zu können, wurden Untersuchungen der Reaktion von Benzaldehyd mit dem Spintrap CPH und Untersuchungen von Benzaldehyd als Substrat für RcXDH durchgeführt (Abbildung

23). Als Elektronenakzeptor diente in jedem Messansatz Sauerstoff. Hierbei zeigte sich eine starke Umsetzung von Benzaldehyd mit XDH mit Oxidation des Spintraps (Säule 3: „100 µM Benzaldehyd“). Jedoch konnte nicht zwingend davon ausgegangen werden, dass es sich ausschließlich um eine Oxidation des Spintraps CPH durch aus dem Metabolismus der RcXDH entstehende Sauerstoffradikale handelt, da Benzaldehyd allein mit Spintrap versetzt (ohne Enzymzugabe) ein eigenes Messsignal hervorrief, welches nur zu 9% durch die Zugabe von SOD reduzierbar war. Dargestellt sind diese Messungen als „BG Benzaldehyd“ bzw. „BG Benzaldehyd/500 U SOD“ in Säule 7 und 8. Werden die Substrate Xanthin und Benzaldehyd verwendet (Säule 4 „je 100 µM X, BA“), zeigte sich in etwa die gleiche Menge an gebildetem CP* wie in der Messung ohne Xanthin (Säule 3). bei Zugabe von SOD sank dieser Wert um 61% ab (Säule 6 „je 100 µM X, BA, 500 U SOD). Da sowohl Benzaldehyd allein als auch eine Umsetzung von Benzaldehyd durch die RcXDH zu einer Oxidation des Spintraps CPH führte, kann durch Benzaldehyd keine Trennung der Enzyme AOX und XOR über die selektive Aktvität erreicht werden. Benzaldehyd wurde daher zu weiteren Versuchen nicht mehr verwendet.

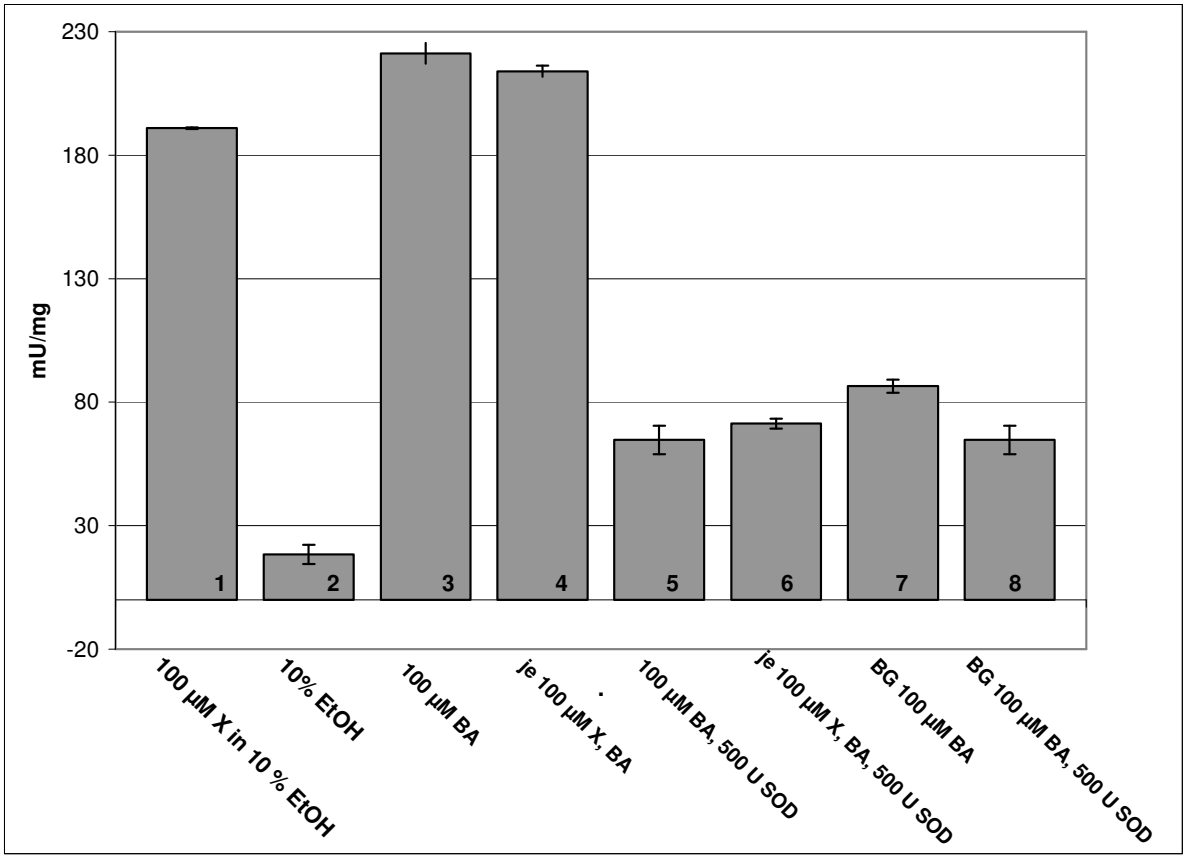


Abbildung 23: Umsetzung von Benzaldehyd und Xanthin durch RcXDH. Verwendete Abkürzungen: X: Xanthin, EtOH: Ethanol, BA: Benzaldehyd, SOD: Superoxiddismutase, BG: Hintergrund (Messungen erfolgten ohne die Zugabe von Enzym).

Verwendung von Phenanthridin und Xanthin als Substrat

Als weitere Substrate zur Trennung der Enzymaktivitäten wurden Xanthin für die RcXDH und Phenanthridin für die AOX untersucht (Abbildung 24). Ebenso wurden die Aktivitäten von AOX mit Xanthin und RcXDH mit Phenanthridin untersucht. Gut zu erkennen war die äußerst geringe Aktivität von AOX mit dem Substrat Xanthin (Säule 3: „AOX/Xanthin“) im Vergleich zu einer 40-fach höheren Aktivität mit Phenanthridin (Säule 4: „AOX/Phenan./EtOH“). RcXDH wies eine 3fach höhere Aktivität mit dem spezifischen Substrat Xanthin (Säule 1: „XDH/Xanthin“) auf als mit Phenanthridin (Säule 2 „XDH/Phenan./EtOH“), jedoch war ein geringer Metabolimus von letzterem möglich. Um dies zu verifizieren, wurden weiterhin sowohl Substrat- als auch Enzymgemische untersucht (Säulen 5-9). Wurde eine Substratmischung von Phenanthridin und Xanthin mit RcXDH vermessen, stieg der Wert auf 36,55 mU/mg an (Säule 5 „XDH/X/Phenan.“) Im Gegensatz dazu, wurde die Aktivität der AOX durch die zusätzliche Zugabe von Xanthin zu Phenanthridin kaum beeinflusst (Säule

6 „AOX/X/Phenan“). Wurden zusätzlich beide Enzyme gemischt und die einzelnen Substrate, bzw. das Substratgemisch hinzugegeben, sank die Aktivität von RcXDH und AOX auf die Hälfte (Säule 7 „XDH/AOX/X“) ab. Bei Verwendung des Substrates Phenanthridin (Säule 8 „XDH/AOX/Phenan.“) ergab sich die gleiche Sauerstoffradikalproduktion verglichen mit der Aktivität ohne die Zugabe von RcXDH (Säule 4 „AOX/Phenan./EtOH“). Wurden beide Enzyme und das Substratgemisch verwendet, resultierte daraus der höchste Messwert von 48,37 mU/mg (Säule 9: „XDH/AOX/X/Phenanthridin“). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden weitere Versuche zur selektiven Trennung der Enzymaktivitäten von XOR und AOX durch die Verwendung von Phenanthridin und Xanthin als Substrate durchgeführt.

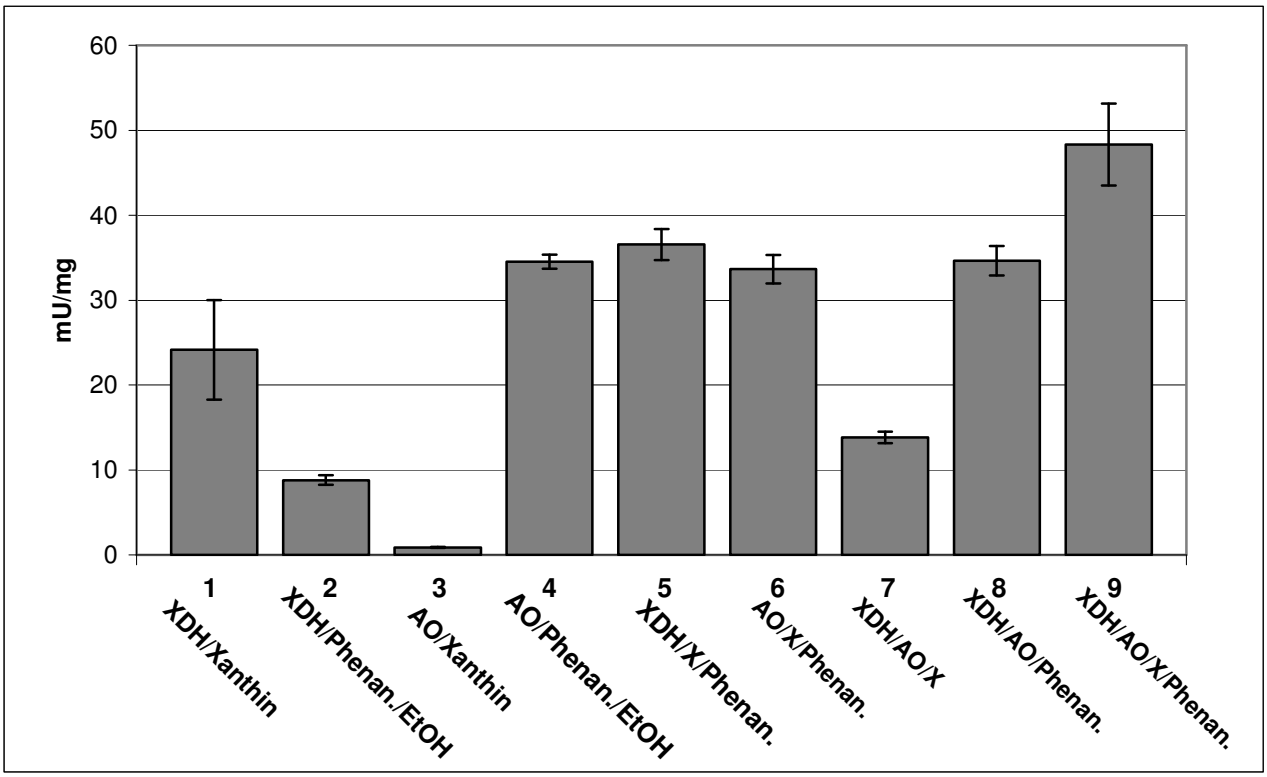


Abbildung 24: Darstellung der Aktivität von RcXDH und AOX mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor mit den Substraten Xanthin (X) und Phenanthridin (Phenan.). Die Konzentration der Substrate betrug jeweils 100 µM.

3.1.4 Trennung von AOX und RcXDH durch Verwendung von unterschiedlichen Substraten

Die im vorherigen Kapitel beschriebene selektive Aktivität der Enzyme RcXDH und AOX der Maus mit den Substraten Xanthin und Phenanthridin macht eine Differenzierung der gebildeten Sauerstoffradikale von entweder AOX oder RcXDH

aus Enzymgemischen möglich. Um dies zu verdeutlichen, wurden in Abbildung 25 Messungen von RcXDH und AOX mit den Substraten Phenanthridin und Xanthin grafisch addiert und mit Messungen eines Substratgemisches von Phenanthridin und Xanthin verglichen. Die Säulen 1, 3 und 5 bilden addierte Einzelmessungen mit Xanthin (hellgraue Säulenfärbung) und Phenanthridin (graue Säulenfärbung) ab, die dunkelgrau eingefärbten Säulen stellen die Messungen mit einem Substratgemisch aus Xanthin und Phenanthridin dar. RcXDH zeigte eine ca. 5% höhere Bildung von Sauerstoffradikalen wenn das Substratgemisch verwendet wurde. Dagegen zeigte AOX eine leicht erniedrigte Aktivität. Bei der Verwendung von Xanthin, Phenanthridin, RcXDH und AOX ergab die Addition der Einzelmessungen einen sehr ähnlichen Wert im Vergleich zur Messung mit dem Substratgemisch. Die Abweichungen lagen im Rahmen der Messgenauigkeit. Somit konnte gezeigt werden, dass die Aktivitätsmessungen von RcXDH und AOX auch aus dem Enzymgemisch heraus durchgeführt werden können, ohne eine Fehlinterpretation der Ergebnisse durch Sauerstoffradikalbildung der AOX bzw. RcXDH zu erhalten.

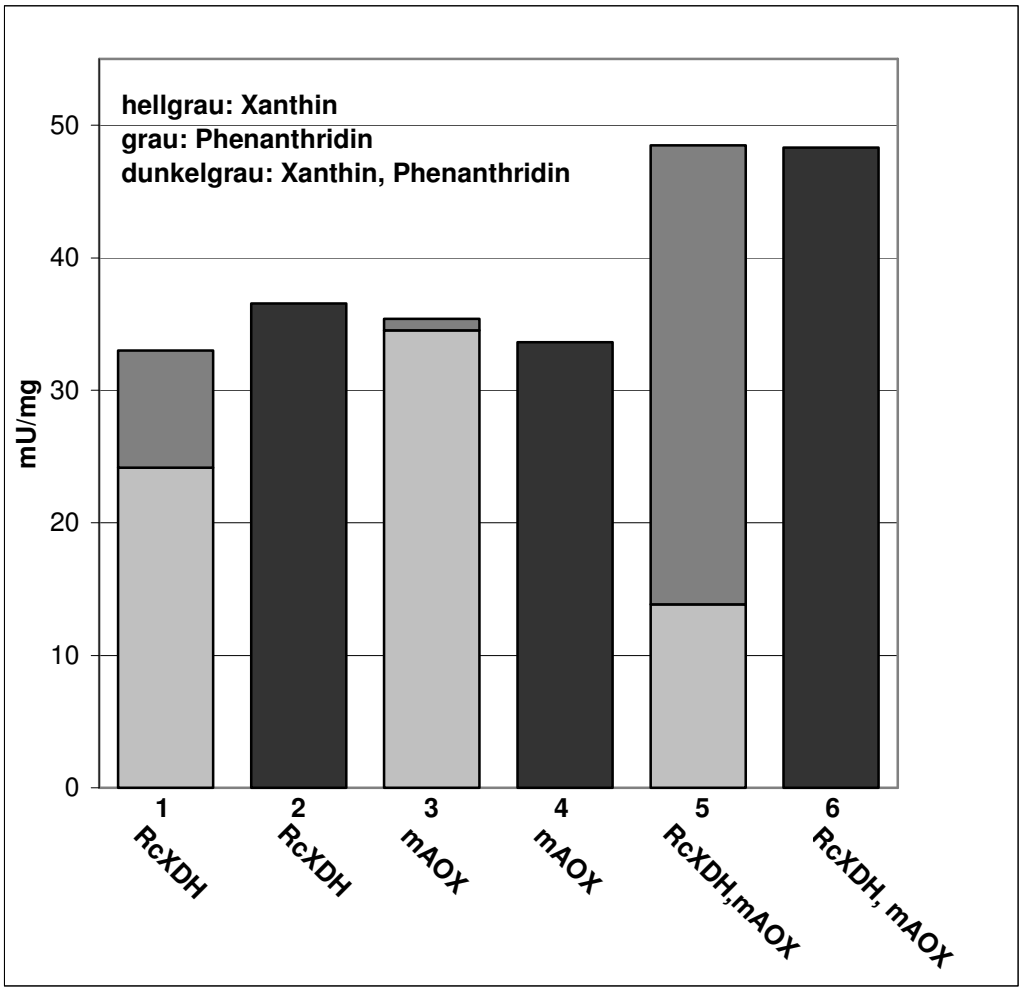


Abbildung 25: Darstellung der Aktivität der RcXDH und AOX mit 50 µM Xanthin, 100 µM Phenanthridin und dem Substratgemisch 50 µM Xanthin und 100 µM Phenanthridin mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor. In hellgrau sind die Messungen mit dem Substrat Xanthin dargestellt, die darauf addierte Einzelmessung mit dem Substrat Phenanthridin in grau. Dunkelgrau gibt den Messwert des Substratgemisches wieder.

3.1.5 Aktivitätsbestimmung der aus Gewebe isolierter XDH

Da die Messungen der Enzymaktivität von XOR mit aus Rattengewebe gereinigter XOR (rXOR) durchgeführt wurden, wurde eine Übertragbarkeit auf Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3 auf Gewebehomogenate der Reinheitsstufe 2 geprüft. Hierzu wurden Gewebeproben aus Rattenmuskel, Rattenlunge und Rattenleber auf ihre XOR Aktivität untersucht.

Zunächst wurde jedoch eine Fehlerbestimmung der Methode durchgeführt. Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, dass die höchste Abweichung bei der Durchführung der nach Bradford durchgeführten Proteinkonzentrationsbestimmung erhalten mit

7,1% erhalten wurde. Als sehr gering ist hingegen der Fehler der Quantifizierung des Radikalmenge mittels der EPR-Spintrappingmethode einzustufen, dieser wurde mit 2,8% ermittelt. Der Gesamtfehler zur Bestimmung von Radikalaktivität aus Geweberproben lag somit bei unter 10%.

Tabelle 1: Bestimmung der Standardabweichung und Fehlerprozent der angewandten Methode zur Bestimmung der Superoxid-Anionen Produktion der XOR aus Gewebe

	Mittelwert	Standard-abweichung	Fehler/%
Proteinbestimmung nach Bradford/µg/ml	14913	1059,09	7,1
EPR-Spektroskopie	43,78	1,21	2,8
Gesamt			**9,9**

In Abbildung 26 ist die Bildung von Sauerstoffradikalen aus verschiedenen Gewebearten der Ratte dargestellt. Es zeigte sich deutlich, dass rXOR bei diesem Messverfahren seine höchste Aktivität/µg Gewebe in der Leber, gefolgt von Muskel und Lunge aufwies. Auf Grund der in der Leber am höchsten gemessenen Aktivität wurden für die weiteren Homogenisierungen zur Reinigung der XOR Leberproben verwendet.

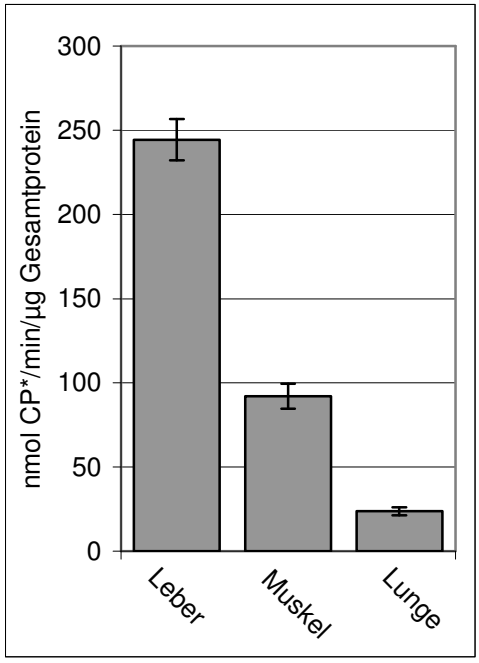


Abbildung 26: Superoxidradikalproduktion von XOR in verschiedenen angereinigten Organen der Ratte. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte per Bradford-Assay. Als Substrat wurden 100 µM Xanthin verwendet, die Inkubationszeit betrug 90sec bei einer Temperatur von 30°C.

Da die rXOR in diesen Proben nur unvollständig gereinigt wurde, muß davon ausgegangen werden, dass sowohl rAOX als auch rXOR in dem Homogenat vorliegen. Die Ergebnisse in Kapitel 3.1.4 zeigten, dass die selektive Aktivität der Enzyme mit den Substraten Xanthin und Phenanthridin genutzt werden konnte, die Aktivität beider Enzyme aus Proteinmischungen zu bestimmen. Diese Beobachtung sollte genutzt werden, um auch in Gewebehomogenaten Aussagen über die enthaltene Aktivität von rXOR und rAOX treffen zu können. In Abbildung 27 wurden Messungen von zwei unterschiedlichen Rattenlebern (Leber 1 und Leber 2) mit den Substraten Xanthin und Phenanthridin gezeigt. Hierbei sind die Säulen 1 und 3 als Additionsergebnis der Einzelmessungen mit den Substraten Xanthin (hellgraue Säulenfärbung) und Phenanthridin (graue Säulenfärbung) zu verstehen. In dunkelgrauer Säulenfärbung ist die Messung mit beiden Substraten gleichzeitig abgebildet. Die Bildung von Sauerstoffradikalen war in den Messungen mit beiden Substraten ca. 10% niedriger als in addierten Messergebnissen der Messungen mit je einem Substrat, dies lag jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit. Somit konnte auch hier von einer Trennung der Enzymaktivitäten über die unterschiedlichen Substrate ausgegangen werden, trotz des Absinkens des Messwertes für Messungen mit dem Substratgemisch.

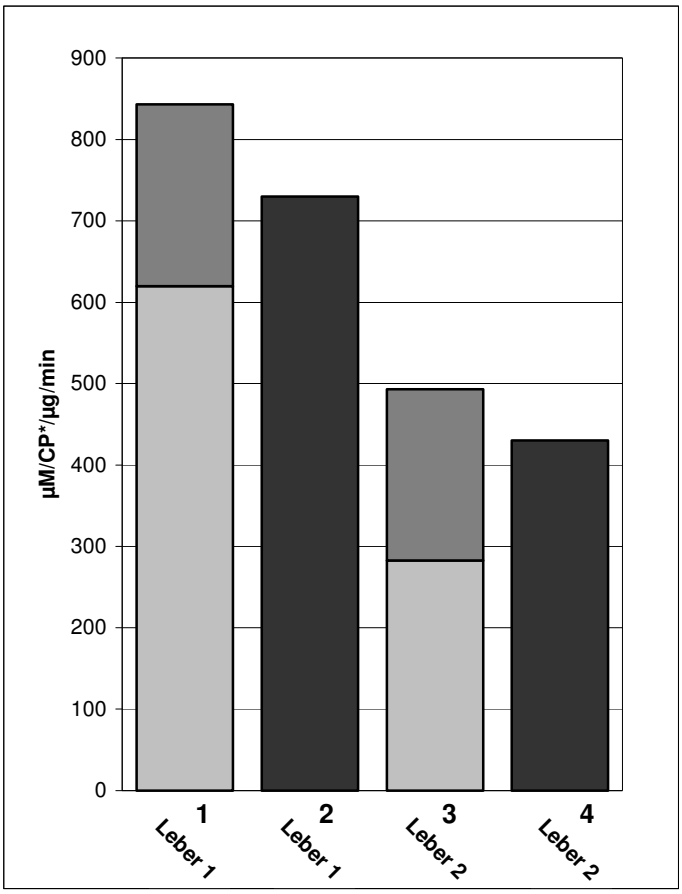


Abbildung 27: Darstellung der Aktivität der XOR aus zwei verschiedenen Rattenlebern (Leber 1 und Leber 2). Als Substrat wurden 50 µM Xanthin, 100 µM Phenanthridin und des Substratgemisch 50 µM Xanthin und 100 µM Phenanthridin mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor benutzt. In hellgrau sind die Messungen mit dem Substrat Xanthin dargestellt, die darauf addierte Einzelmessung mit dem Substrat Phenanthridin in grau. Dunkelgrau gibt den Messwert des Substratgemisches wieder.

3.1.6 XOR-Aktivitätsbestimmung von Rattenlebergewebe der Reinheitsstufe 2

Um störende Einflüsse durch Verunreinigungen zu beseitigen, wurde das XOR Protein aus Rattenleber (rXOR) durch einen Hitzeschritt und eine 60% Ammoniumsulfatfällung weiter gereinigt. Durch die weitere Reinigung stieg die spezifische Aktivität pro µg Gesamtprotein deutlich an.

Untersucht wurden Ratten, die an einem unbehandelten Leberkarzinom litten und deren Kontrollen, gesunde Ratten ohne Tumor. Die XOR wurde aus den Leberproben dieser Tiere isoliert. Hierbei wiesen die Kontrolltiere der unbehandelten Gruppe eine sehr geringe Bildung mit 7,3 +/- 10,4 nmol CP*/µg Gesamtprotein/min auf. Deutlich mehr Sauerstoffradikale mit 43,54 +/- 34,62 wurden von den

unbehandelten Tumortieren gebildet (Abbildung 28). Trotz einer noch vorhandenen großen Standardabweichung konnte mit dieser Methode eine Aktivitätsbestimmung der XOR aus Gewebe vorgenommen werden. Zu beachten ist, dass sich der Fehler aus dem Messfehler und der Variabilität der XOR Aktivität eines jeden Tieres zusammensetzt.

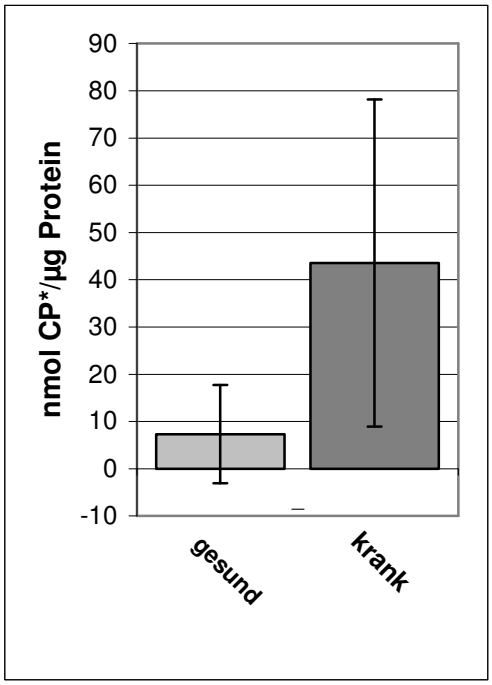


Abbildung 28: Bildung von Sauerstoffradikalen von Leberproben unbehandelten Ratten mit einem Leberzellkarzinom (n=13, dunkelgrau) deren Kontrollen (n=9, hellgrau) in der Reinheitsstufe 2. Als Substrat wurde 100 µM Xanthin verwandt, die Inkubation betrug 90sec bei 30°C.

3.1.7 Aktivitätsbestimmungen von Gewebe der Reinheitsstufe 3a von unbehandelten Tumortieren

Um eine noch höhere spezifische Aktivität der XOR/µg Gesamtprotein zu erreichen, wurde nach der 60% Ammoniumsulfatfällung eine Gelfiltrationschromatografie mit einer Superdex 200 Säule durchgeführt. Benutzt wurde hierzu Lebergewebe der unbehandelten Tumorratten und deren Kontrolltiere. Die Bildung von Sauerstoffradikalen war in Proben der Kontrolltiere mit 171,88 +/- 78,19 nmol CP*/µg Gesamtprotein/min geringer als bei den Tumortieren mit 243,97 +/- 58,08 nmol CP*/µg Gesamtprotein/min (Abbildung 29). Mit diesem weiteren Reinigungsschritt konnte eine erhebliche Verringerung der Standardabweichung erreicht werden,

jedoch blieb eine deutliche Messungenauigkeit bestehen. Dies ist auf die natürliche Variabilität der XOR Aktivität zu begründen.

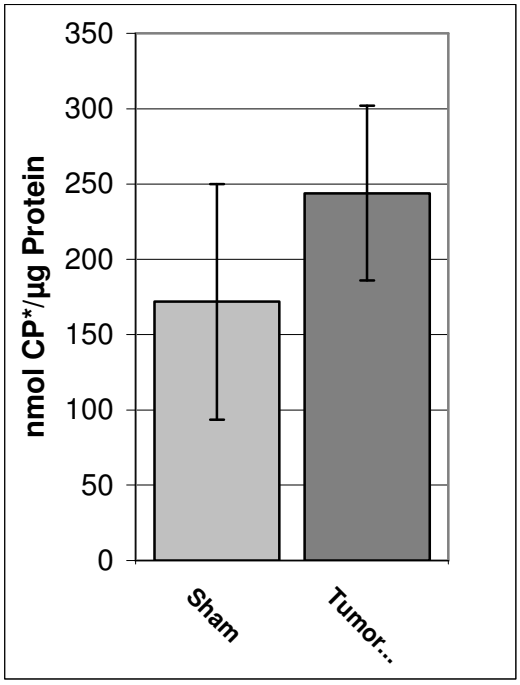


Abbildung 29: Vergleich der Bildung von CP* von unbehandelten Tumortieren (dunkelgrau) und deren Kontrollen (hellgrau) mit der Reinheitsstufe 3. Als Substrat wurde 100 µM Xanthin verwandt, die Inkubation betrug 90sec bei 30°C.

3.1.8 Aktivitätsbestimmung der XOR von unbehandelten und behandelten Tieren mittels nativer PAGE

Um die in den EPR Spintrapping Versuchen erhaltenen Messwerte zu überprüfen, wurde mit Gewebehomogenaten der Reinheitstufe 2 der unbehandelten Ratten und deren Kontrollgruppen eine native PAGE durchgeführt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese 20 min mit 1 mM Xanthin und 50 mM MTT gefärbt, und die Intensität densitometrisch bestimmt und ausgewertet. Die Elektronenaufnahme durch DTT vom FAD führt zu einer Ausbildung eines schwarz-blauen, unlöslichen Farbstoffes, der sich im Gel ablagert. So führt eine höhere Konzentration an Sauerstoffradikalen zu einer intensiveren Färbung. Abbildung 30 zeigt die sehr geringe Färbung der Homogenate der unbehandelten Kontrollgruppe im Vergleich zu den Intensitäten der unbehandelten Tumortiere. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten der EPR Spintrapping Versuchen mit einer höheren Bildung von Sauerstoffradikalen bei tumorkranken Tieren.

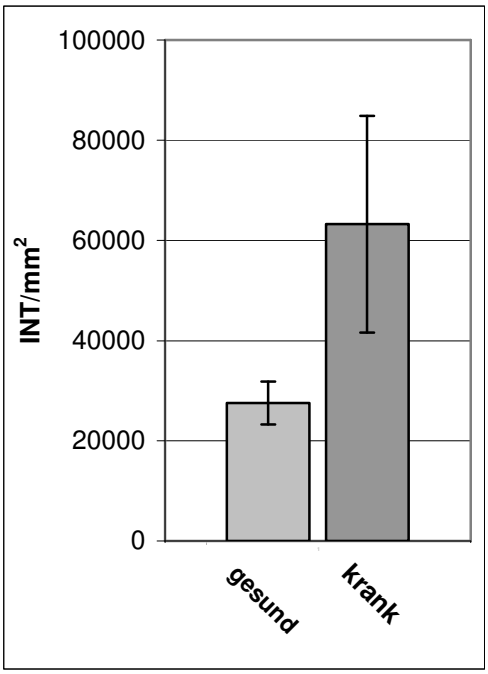


Abbildung 30: Intensität der Gelfärbung mit 100 µM Xanthin/ 100 µM MTT nach 20 min. Die Auswertung erfolgte densitometrisch. In hellgrau sind die Kontrollratten, in dunkelgrau die Ergebnisse der an einem Leberzellkarzinom leidenden Ratten dargestellt.

3.1.9 Quantifizierung der XOR von unbehandelten und behandelten Tieren per Immunblot-Analyse

Zusätzlich sollte die XOR aus den Geweben der unbehandelten und behandelten Ratten mittels Immunoblot-Analyse quantifiziert werden, um eine mögliche höhere Expression nachzuweisen. Hierzu wurde Gewebe der Reinheitsstufe 2 benutzt, die gereinigten Proteine per SDS-PAGE getrennt und mittels Immunoblot-Analyse gegen den XO-Antikörper der Firma Neomarkers quantifiziert (Abbildung 31).

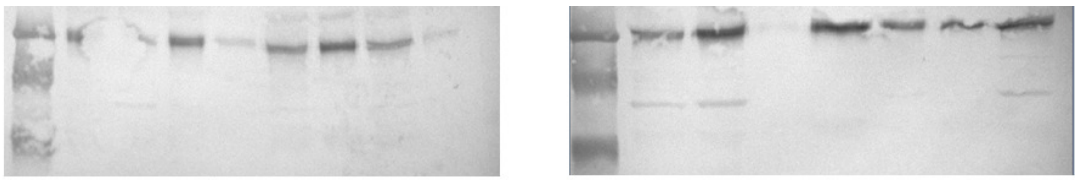


Abbildung 31: Immunoblot-Analyse der Leberproben der Sham- und leberkrebskranken Ratten. Das Blotten erfolgte mit 125 mA über 1 h, als Antikörper wurde der Xanthin-Oxidase Antikörper AB-2, Klon 154,4 der Firma Neomarkers verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit dem Farbstoff NBT unter Verwendung des Färbekits der Firma Promega über 3 min. Die Auswertung erfolgte densitometrisch.

Hierbei wies die Kontrollgruppe eine geringere Menge an XOR auf als die Tumortiere. Die höchste Menge an XOR konnte bei den Tumortieren nachgewiesen

werden (Abbildung 32). Die Quantifizierung der XOR zeigte eine erhöhte Expression der XOR in tumorkranken Ratten, welche mit den gemessenen erhöhten Aktivitäten korreliert.

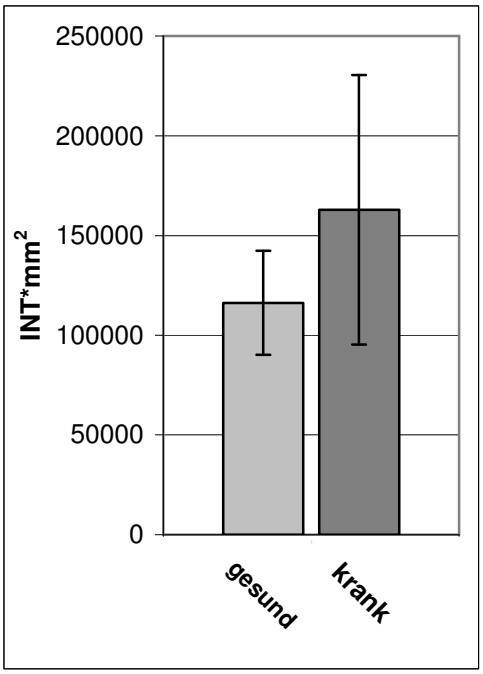


Abbildung 32: Quantifizierung der XOR mittels Westernblot. Als Antikörper wurde derKlon AB-2 gegen XO der Firma Neomarkers verwendet. Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff NBT mit einem Färbekit der Firma Promega über 3 min. Die Auswertung erfolgte densitometrisch über die Menge des oxidierten NBTs. In hellgrau sind die Ergebnisse der gesunden Ratten (n=9), in dunkelgrau die Ergebnisse der kranken Ratten (n=9) gezeigt.

3.1.10 Vergleich der XOR –Aktivitätsmessungen ausgehend von den drei unterschiedlichen Reinheitsstufen mittels EPR Spintrapping

Um die Ergebnisse der Superoxid-Anionbildung der drei verschiedenen Reinheitsstufen miteinander zu vergleichen, wurde der Spearman´sche Rangkorrelationskoeffizient benutzt (Gleichung 18).

Gleichung 18

$$r_s = 1 - \frac{6}{n(n^2-1)} \sum_{i=1}^{n} D_i^{\,2}$$

Der hierbei ermittelte Rangkorrelationskoeffizient gibt eine Aussage über das Abhängigkeitsmaß. Bei r_s =-1 liegt eine inverse Korrelation vor, bei r_s = 1 eine übereinstimmende.

Der Vergleich der Ergebnisse zeigte eine sehr gute Korrelation von 0,9 den Ergebnissen der Reinheitsstufe 2 und 3a. Hingegen korrelieren die Ergebnisse der Reinheitsstufe 1 und 2 nicht miteinander (r_s = 0,1). Da in diesem Gewebe nur eine Reinigung durch Abzentrifugation der Zelltrümmer durchgeführt wurde, ist in diesen Messungen ebenfalls der Messfehler sehr hoch. Auch keine Korrelation konnte in Geweben der Reinheitsstufe 1 zu 3a mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,14 nachgewiesen werden. Da eine Korrelation der Ergebnisse von Stufe 2 und 3a aufzuweisen ist, wird bei den folgenden Messungen mit Proben der Reinheitsstufe 2 gearbeitet. Diese Methode wies zudem die Möglichkeit auf, in kurzer Zeit große Probenmengen bearbeiten zu können, wie es für einen großen Tierversuch notwendig ist.

3.2 Vergleich der XOR Aktivität aus unterschiedlichen Organismen

Um die Aktivität der XOR aus verschiedenen Organismen zu vergleichen, wurde sie aus Rind, Ratte, Huhn, Kuhmilch und aus RcXDH rekombinant aus *E.coli* gereinigt. Für die im Folgenden durchgeführten Versuche war es wichtig, eine Trennung der AOX von der XOR zu erreichen, welche durch den Einsatz einer Hydroxylapatit-Chromatografie mit anschließender Gelchromatografie (Reinheitsstufe 3b) auch gelang.

3.2.1 XOR aus Rinderleber

Nach der Homogenisierung, dem Hitzeschritt und der Ammoniumsulfatfällung der gefrorenen Rinderleber wurde das gelöste Protein auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen und mit ansteigenden Konzentrationen im Stufengradienten eines $NaPP_i$-Puffer, pH 7,8 eluiert.

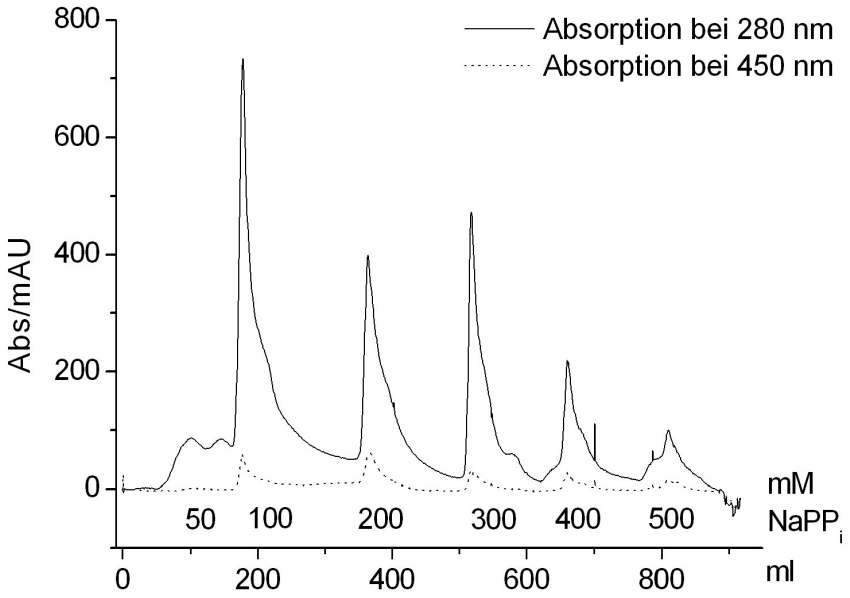


Abbildung 33: Chromatogramm eines Elutionsverlaufes bei Verwendung eines Stufengradientes auf einer Hydroxylapatitsäule. Das Säulenvolumen betrug 120 ml, verwandt wurde ein NaPPi-Puffer in den Konzentrationen 50, 100, 200, 300 und 400 mM mit einem pH von 7,5 in einer Flußrate von 3 ml/min.

In Abbildung 33 ist ein typisches Elutionsprofil abgebildet. Mit jeder stufenweiser Erhöhung des NaPPi-Gradienten wurde Protein von der Säule gelöst und eluiert. Daraus ergab sich ein senkrechter Anstieg der Absorption. Die Säule wurde mit dem jeweiligen Puffer gewaschen bis zum Absinken der Absorption auf unter 50 mAU. Fraktionen wurden in 8 ml Abständen gesammelt und per nativer PAGE auf bXOR (Substrat: Xanthin) und AOX (Substrat: Phenanthridin) hin überprüft. Da beide Isoformen der bXOR in ihrem Metabolismus Sauerstoffradikale produzieren, war eine Unterscheidung der Quelle der entstehenden Sauerstoffradikale wichtig. Hierbei wies die bei 300 mM $NaPP_i$ eluierende Fraktion (500-620 ml) noch Aktivitäten gegenüber Xanthin und Phenanthridin auf, jedoch zeigten später eluierende Fraktionen (400 bzw. 500 mM $NaPP_i$) nur noch eine Aktivität mit Xanthin als Substrat. Die bXOR enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrazentrifugation konzentriert und zur Kontrolle per SDS-PAGE analysiert. Die Konzentrate wurden anschließend auf eine Gelfiltrationssäule geladen (Superdex 200, Äkta basic System) und mit Tris-Puffer pH 7,8 eluiert. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt und per nativer PAGE mit den Substraten Xanthin und Phenanthridin analysiert (Abbildung 34).

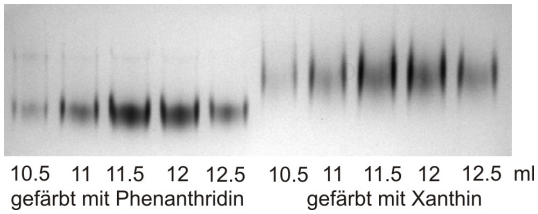


Abbildung 34: Native PAGE der Eluate (in ml) der Gelfiltrationssäule. Analysiert wurde die bei 300 mM $NaPP_i$ eluierende Fraktion der Hydroxylapaptit-Chromatografie. Die Färbung erfolgte mittels MTT und den Substraten 1 mM Phenanthridin als Substrat für die AOX und 1 mM Xanthin als Substrat für die XOR. Die Färbung erfolgte im Dunklen über 20 min.

Die SDS-PAGE Analyse der Fraktionen des 300 mM NaPPi-Eluats der Hydroxylapaptit-Säule zeigte eine noch sehr mit Verunreinigungen versehene Proteinlösung (Fraktionen 11,5 und 12 ml). Im Gegensatz dazu enthielt die per Gelfiltration weiter gereinigte 400 mM $NaPP_i$ Fraktion der Hydroxylapatit-Säule hinreichend sauberes bXOR-Protein (Fraktionen 11 und 11,5 ml).

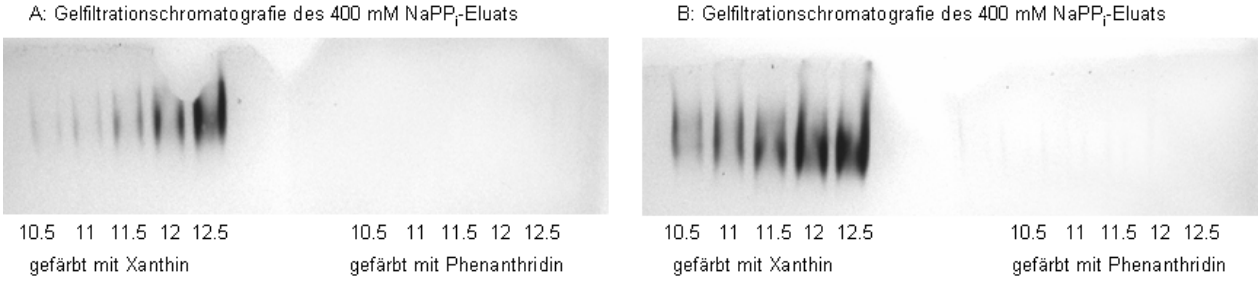


Abbildung 35: Native PAGE der Eluate (in ml) der Gelfiltrationssäule. A: Analysiert wurde die bei 400 mM $NaPP_i$ eluierende Fraktion der Hydroxylapaptit-Chromatografie. B: Analysiert wurde die bei 500 mM $NaPP_i$ eluierende Fraktion der Hydroxylapaptit-Chromatografie. Die Färbung erfolgte mittels MTT und den Substraten 1 mM Phenanthridin als Substrat für die AOX und 1 mM Xanthin als Substrat für die XOR. Die Färbung erfolgte im Dunklen über 20 min.

Mittels massenspektroskopischer Analyse wurde die Bande ~140 kDa als Carbamoyl-Phosphatase identifiziert, die Bande bei ~130 kDa als XOR. Die weiteren Banden enthielten zum Teil Abbauprodukte der XOR, die während der Aufarbeitung entstanden. Die entsprechenden Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

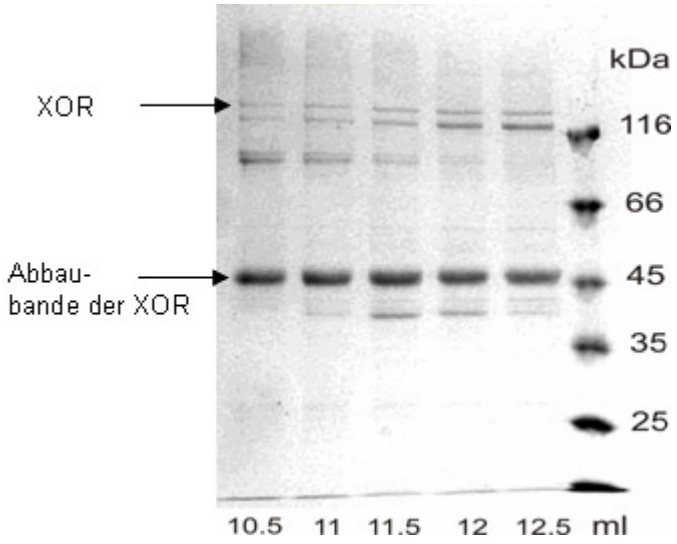


Abbildung 36: SDS-PAGE Analyse der Gelfiltrationsfraktionen des 400 mM NaPPi Eluats der Hydroxylapaptit-Chromatografie. Gekennzeichnet sind die XOR-Bande und die Abbaubande der XOR, welche mittels Massenspektroskopie nachgewiesen wurde. Die Färbung erfolgte mittels Coomassie-Blau.

3.2.2 XOR aus Hühnerleber

Um eine XOR auf ihre Aktivität zu überprüfen, die nur in der Dehydrogenase-Form vorliegt, wurde cXDH aus der Hühnerleber isoliert. Die cXDH aus der Hühnerleber wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben gereinigt. Jedoch gelang bei diesen Proben keine vollständige Trennung von cXDH und AOX, so dass die nachfolgenden Messungen an mit AOX verunreinigter cXDH durchgeführt wurden.

3.2.3 XOR aus Rattenleber

Aus unterschiedlichsten Gewebearten der Ratte wurde rXOR isoliert. Lebergewebe kam in vielfältigen Versuchen zum Einsatz. Zum einen wurde es in Reinheitsstufe 3b vorliegend eingesetzt, um Messungen mit verschiedenen Substraten durchzuführen. Hierzu wurde rXOR analog des in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Verfahrens isoliert. Eine Trennung der Enzyme rXOR und AOX gelang, so dass die folgenden Messungen ohne AOX Verunreinigungen und die daraus resultierenden Sauerstoffradikale durchgeführt werden konnten.

Des Weiteren wurde Rattengewebe unterschiedlicher Reinheitsstufen verwandt, um die rXOR Aktivität der Ratten eines Tierversuches zu bestimmen. Aktivitätsmessungen von Gewebehomogenaten der 1. Reinigungsstufe wurden direkt im Anschluss an die Aufarbeitung vollzogen. rXOR nach der Ammoniumsulfatfällung

(Reinheitsstufe 2) wurden ebenso wie rXOR der Reinigungsstufe 3a bei -80°C gelagert und kurz vor den weiteren Messungen aufgetaut.

Darüber hinaus wurde rXOR in der Reinheitsstufe 3a aus Muskel und Lungengewebe isoliert, um die Aktivität derr XOR mit dem Substrat Xanthin und den Inhibitoren Allo- und Oxypurinol zu untersuchen und mit der Aktivität von Proben aus der Leber zu vergleichen.

3.2.4 Messungen der Sauerstoffradikalproduktion

Um die Bildung von Sauerstoffradikalen von XOR aus verschiedenen Organismen zu vergleichen, wurde XOR aus der Rinder- (bXOR), Ratten- (rXOR) und Hühnerleber (cXDH) gereinigt. Eine reine XO Form wurde aus der Kuhmilch (bXO) von Russ Hille gewonnen und benutzt, ebenso eine reine XDH Form, rekombinant gereinigt aus *E.coli* (RcXDH). Weiterhin sollte die Bildung von Sauerstoffradikalen der beiden Isoformen miteinander verglichen werden um eine Aussage zu treffen, welche Isoformen über die Zeit mehr Sauerstoffradikale bildet.

Alle Messungen wurden mit den Enzymen nach der Reinigung bis zur Reinheitsstufe 3b durchgeführt. Durch die Reduktion mit DTT wurde eine Umwandlung der XO-Form in die XDH-Form bei bXOR und rXOR erreicht, die Proben von cXDH, RcXDH und bXO wurden zu Vergleichszwecken ebenfalls mit DTT reduziert. Die Veränderung des Verhältnisses der XO zur XDH Form wurde durch einen Anstieg des Dehydrogenase/Oxidase Verhältnisses verdeutlicht (siehe

Tabelle 2). Um die Unterschiede der beiden Isoformen in der Bildung von Sauerstoffradikalen zu verdeutlichen, wurden die Experimente sowohl mit Xanthin als Substrat und Sauerstoff als Elektronenakzeptor als auch mit Xanthin als Substrat und NAD als Elektronenakzeptor durchgeführt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Messungen gezeigt.

Tabelle 2: Bestimmung des Dehydrogenase/Oxidase Verhältnisses der isolierten Formen und nach Reduzierung mit DTT.

Dehydrogenase/Oxidase Verhältnis		
Gewebe	isolierte Form	mit DTT reduziert
XO Kuhmilch	0,82	0,88
XOR Rinderleber	0,08	2,58
XOR Rattenleber	0,52	1,29
XDH Hühnerleber	3,00	10,16
R.capsulatus XDH	28,18	24,13

bXO als reine XO-Form produzierte die meisten Sauerstoffradikale über die Zeit mit 388,32 mU/mg und dem Elektronenakzeptor Sauerstoff (Xanthin:O_2). Der in wässriger Lösung gelöste molekulare Sauerstoff fungierte hierbei als Akzeptor. Lag zusätzlich NAD als Elektronenakzeptor vor, sank der Mittelwert leicht ab, blieb jedoch innerhalb der Fehlertoleranz gleich. Konnte NAD von bXOR gebunden werden, wurde NAD bevorzugt als Elektronenakzeptor genutzt. Die Reduktion mit DTT führte ebenso zu einem gleichen Ergebnis mit den Elektronenakzeptoren O_2 und NAD innerhalb der Fehlertoleranzen. Hierbei lag der Mittelwert der Messung mit NAD als Elektronenakzeptor leicht unterhalb des Ergebnisses von bXO ohne vorherige DTT Reduzierung, der Mittelwert des Messwerts mit O_2 als Elektronenakzeptor leicht darüber (Abbildung 37).

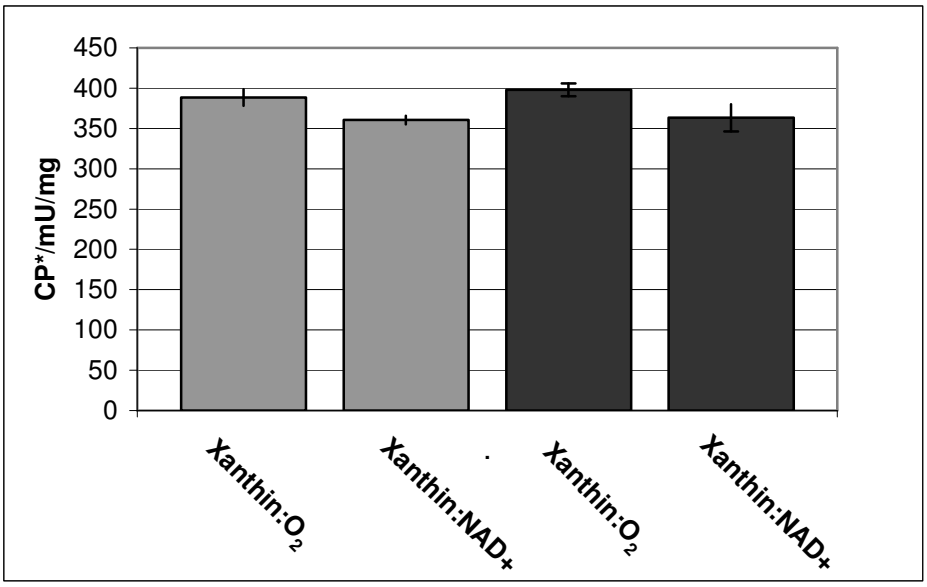


Abbildung 37: Sauerstoffradikalproduktion der XO isoliert aus der Kuhmilch bestimmt per EPR/Spintrapping Methode. Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD und Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Es wurden 100 µM Xanthin und 500 µM NAD verwendet. In hellgrau sind die Messungen mit dem isolierten Protein, in dunkelgrau die Messungen mit DTT behandeltem Protein gezeigt.

Im Gegensatz zur bXO konnte aus den Rinderlebern isolierte bXOR in beiden Isoformen vorliegen. *In vivo* lag die bXOR in der Leber des Rindes zu 80% als bXDH Form vor, während der Isolierung wurde die bXOR jedoch in die bXO–Form umgewandelt und zeigte eine 5-fach geringere Menge an gebildeten Sauerstoffradikalen als die aus der Milch isolierten bXO-Form. Ebenso führte eine Zugabe des Elektronenakzeptors NAD zu einer weiteren Halbierung der gebildeten

Sauerstoffradikale. Reduktion durch DTT führte zu weiterem Absinken der gebildeten Sauerstoffradikalmenge (Abbildung 38).

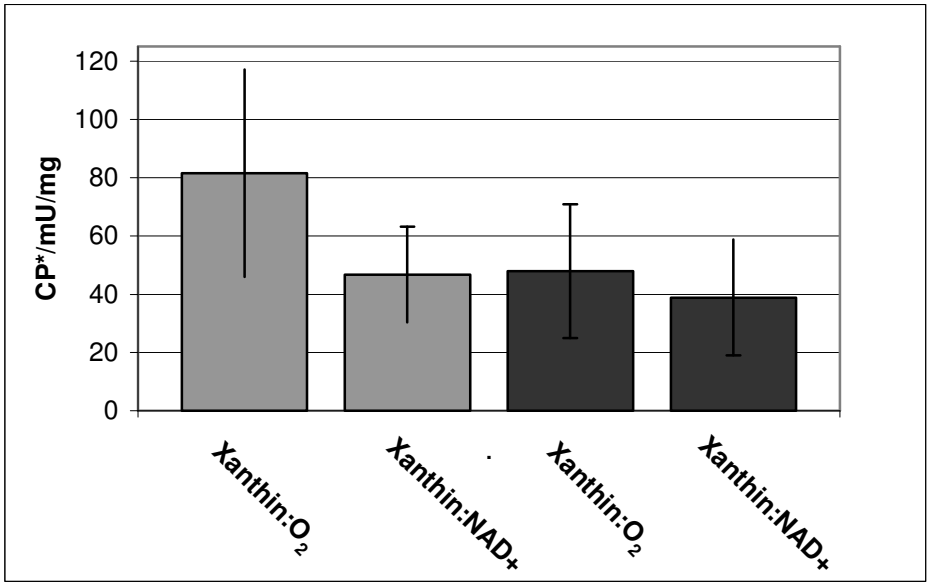


Abbildung 38: Sauerstoffradikalproduktion der XOR isoliert aus der Rinderleber bestimmt per EPR/Spintrapping Methode. Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD und Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Es wurden 100 µM Xanthin und 500 µM NAD verwendet. In hellgrau sind die Messungen mit dem isolierten Protein, in dunkelgrau die Messungen mit DTT behandeltem Protein gezeigt.

Ebenfalls in beiden Isoformen existent ist die rXOR, diese weist jedoch deutlich höhere Mengen an produzierten Sauerstoffradikalen auf als die bXOR. Die isolierte Form bildete 276,52 mU/mg (Xanthin:O2), bzw 137,38 mU/mg (Xanthin:NAD) Sauerstoffradikale, nach Reduktion mit DTT sank der Wert drastisch ab (Abbildung 39).

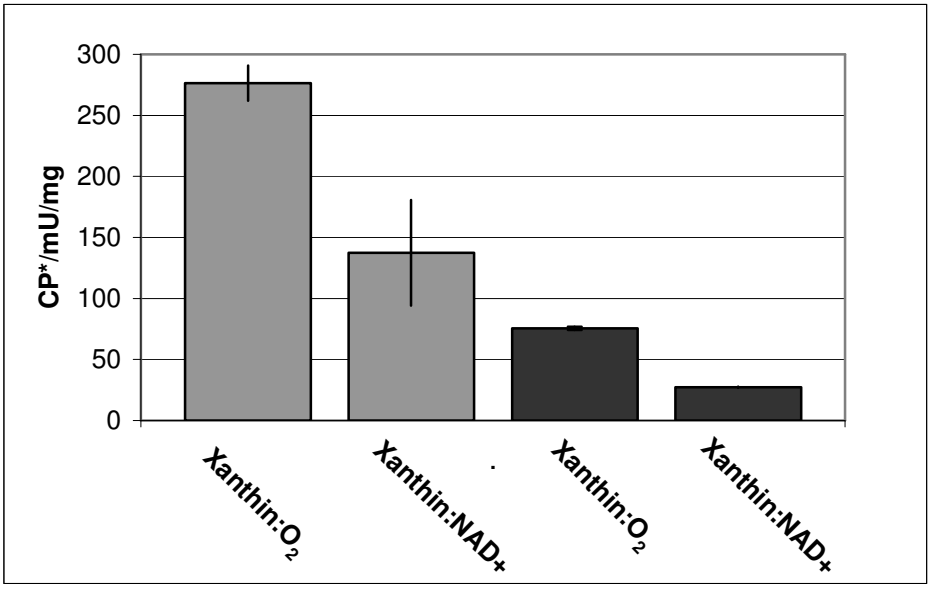


Abbildung 39: Sauerstoffradikalproduktion der XOR isoliert aus der Rattenleber bestimmt per EPR/Spintrapping Methode. Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD und Sauerstoff als Elektronenakzeptor. In hellgrau sind die Messungen mit dem isolierten Protein, in dunkelgrau die Messungen mit DTT behandeltem Protein gezeigt.

Die als reine XDH Form vorliegende cXDH zeigte eine Bildung von 101,17 mU/mg (Xanthin:O_2), bzw. 30,68 mU/mg (Xanthin:NAD) Sauerstoffradikalen. Nach Reduktion der Proben mit DTT blieb die gebildete Menge an CP* innerhalb der Fehlertoleranz gleich (Abbildung 40).

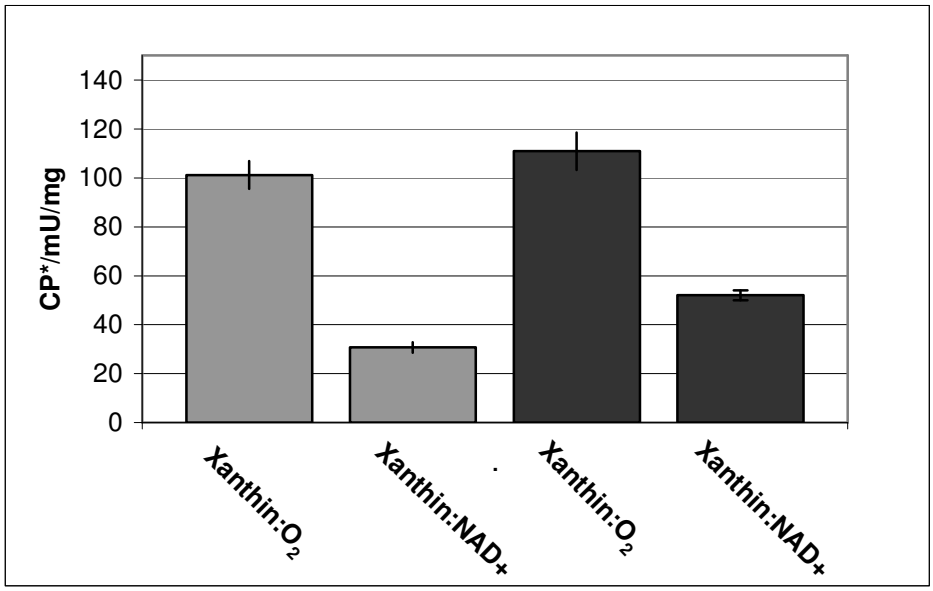


Abbildung 40: Sauerstoffradikalproduktion der XDH isoliert aus der Hühnerleber bestimmt per EPR/Spintrapping Methode. Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD und Sauerstoff als Elektronenakzeptor Es wurden 100 µM Xanthin und 500 µM NAD verwendet. In hellgrau sind die Messungen mit dem isolierten Protein, in dunkelgrau die Messungen mit DTT behandeltem Protein gezeigt.

Zum Vergleich der reinen cXDH-Form wurden die Messungen ebenfalls mit RcXDH durchgeführt. Die Sauerstoffradikalproduktion mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor betrug 75,01 mU/mg (isolierte Form), nach Reduktion mit DTT blieben die Ergebnisse unverändert. Die Produktion von Sauerstoffradikalen sank deutlich ab nach der Zugabe des Elektronakzeptors NAD (Abbildung 41).

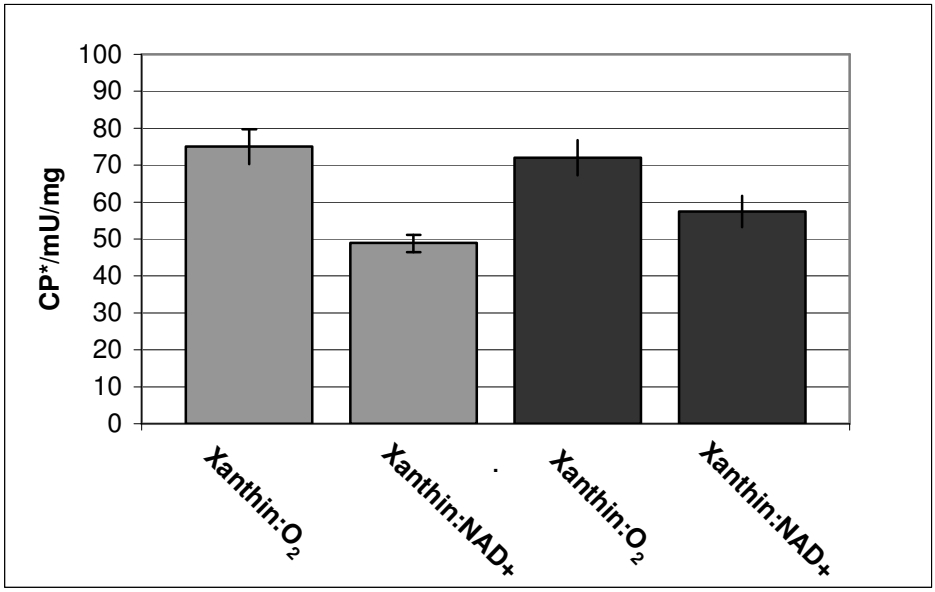


Abbildung 41: Sauerstoffradikalproduktion der XDH isoliert aus der *R. capsulatus* bestimmt per EPR/Spintrapping Methode. Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD und Sauerstoff als Elektronenakzeptor. In hellgrau sind die Messungen mit dem isolierten Protein, in dunkelgrau die Messungen mit DTT behandeltem Protein gezeigt.

In Tabelle 3 wird eine Übersicht der Ergebnisse in einer Tabelle angegeben.

Tabelle 3: Messwerte der Sauerstoffradikalproduktion mit Standabweichung isolierter XOR aus Lebern von verschiedenen Organismen per EPR/Spintrapping-Methode.

	gebildete $O_2^{\cdot-}$/mU/mg			
	isolierte Form		mit DTT reduziert	
	Xanthine:O_2	Xanthine:NAD^+	Xanthine:O_2	Xanthine:NAD^+
XO Kuhmilch	388,32 +/- 10,27	360,49 +/- 5,48	397,94 +/- 7,83	363,34 +/- 16,93
XOR Rinderleber	81,56 +/- 35,57	46,75 +/- 16,44	47,92 +/- 23,00	38,86 +/- 19,91
XOR Rattenleber	276,52 +/- 14,43	137,38 +/- 43,27	75,53 +/- 1,31	27,22 +/- 0,51
XDH Hühnerleber	101,17 +/- 5,68	30,68 +/- 2,13	110,87 +/- 7,68	52,00 +/- 2,07
R.capsulatus XDH	75,02 +/- 4,71	48,97 +/- 2,50	72,02 +/- 4,76	57,45 +/- 4,28

Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD als Elektronenakzeptor. Es wurden 100 µM Xanthin und 500 µM NAD verwendet. Die Bestimmung der Messwerte erfolgte von mindestens 3 unterschiedlichen Leberproben, die Messungen wurden dreimal durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die XO-Form mehr Radikale über die Zeit produziert als die jeweilige XDH-Form. Bei einer Reduktion durch DTT wiesen die nicht umwandelbaren XOR Formen des Huhns, der Kuhmilch und des Bakteriums *R.capsulatus* keine Veränderung der produzierten Sauerstoffradikale auf. Nach der Reduktion lag bei den umwandelbaren Formen isoliert aus der Leber des Rindes und der Ratte das Verhältnis stärker auf der Seite der Dehydrogenase, erkennbar durch

ein größeren Wert des Dehydrogenase/Oxidase Verhältnisses als auch gleichzeitig durch ein stärkeres Absinken der Sauerstoffradikalproduktion bei Zugabe des Elektronenakzeptors NAD als bei der nicht reduzierten Form.

3.2.5 Messung der XOR-Aktivität mittels Reduktion von oxidiertem Cytochrom C und Vergleich der Ergebnisse mit der Spintrapping-Methode

Um die Ergebnisse der Spintrap-Methode mit einem etablierten Verfahren der Superoxid-Anion Bildung zu vergleichen, wurde die XOR Aktivität der in Kapitel 3.2.4 benutzten Proben mittels Reduktion von Cytochrom C bestimmt (Tabelle 4). Da eine direkte Reduktion von Cytochrom C durch DTT möglich war, konnte hierbei nur die isolierte Form untersucht werden. Es zeigte sich, dass die bestimmte Aktivität der XO aus der Kuhmilch doppelt so hoch war als mit der Spintrapping-Methode, jedoch mit dem Elektronenakzeptor NAD abnahm. Stark erhört war die detektiere Menge an Superoxid-Anionen durch die XOR aus Rinderleber, die Aktivität mit dem Elektronenakzeptor NAD nahm zu. Innerhalb des Messfehlers gleich erwiesen sich die bestimmten Aktivitäten der XOR aus Rattenleber und der XDH des Bakteriums *R. capsulatus*. Eine um ca 50% geringere Superoxid-Anionproduktion zeigte sich bei der XDH aus der Hühnerleber.

Tabelle 4: Bestimmung der gebildeten Superoxid-Anionen durch XOR.

	gebildete $O_2^{\cdot-}$ / mU/mg	
	Xanthin	Xanthine/NAD
XO Kuhmilch	642.02 +/- 34.94	499.51 +/- 27.20
XOR Rinderleber	279.21 +/- 32.29	613.39 +/- 2.07
XOR Rattenleber	234.61 +/- 11.42	225.00 +/- 12.24
XDH Hühnerleber	50.88 +/- 11.62	10.46 +/- 0.36
R.capsulatus XDH	89.30 +/- 14.23	39.49 +/- 6.50

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch das Cytochrom-C Verfahren.

3.2.6 Bildung von Superoxid-Anionen der *deflavo* XOR

Weiterhin wurde die Sauerstoffradikalproduktion von *deflavo* Enzym-Preparationen der cXDH und bXO untersucht. Zuvor wurden durch eine milde Denaturierung des FAD Kofaktors aus dem Enzym entfernt. Wie in Abbildung 42 gezeigt, sank die Aktivität der *deflavo* cXDH um 42% der nativen Enzymaktivität mit Xanthin:O_2, bzw 56% der nativen Enzymaktivität mit Xanthin:NAD ab.

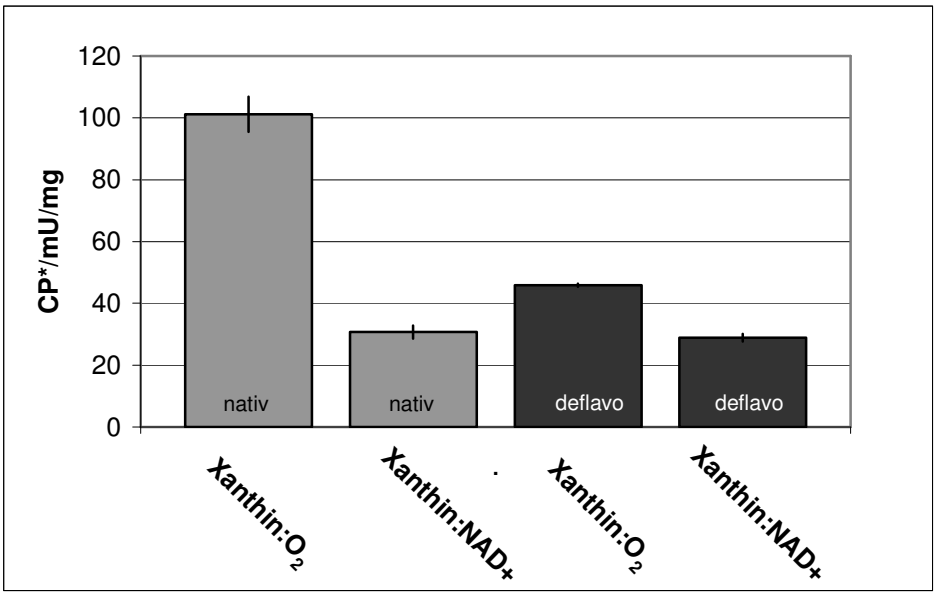


Abbildung 42: Sauerstoffradikalproduktion der XDH isoliert aus der Hühnerleber in der nativen und deflavo-Form bestimmt per EPR/Spintrapping Methode. Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD als Elektronenakzeptor. In hellgrau sind die Messungen mit dem isolierten Protein, in dunkelgrau die Messungen des deflavo Protein gezeigt.

Der Flavin-Gehalt der bXO wurde um 65% reduziert, mit einer Absenkung der gebildeten Sauerstoffradikale um 88%. Hierdurch konnte bestätigt werden, dass der Elektronentransfer auf den molekularen Sauerstoff über den FAD-Kofaktor durchgeführt wird (Abbildung 43).

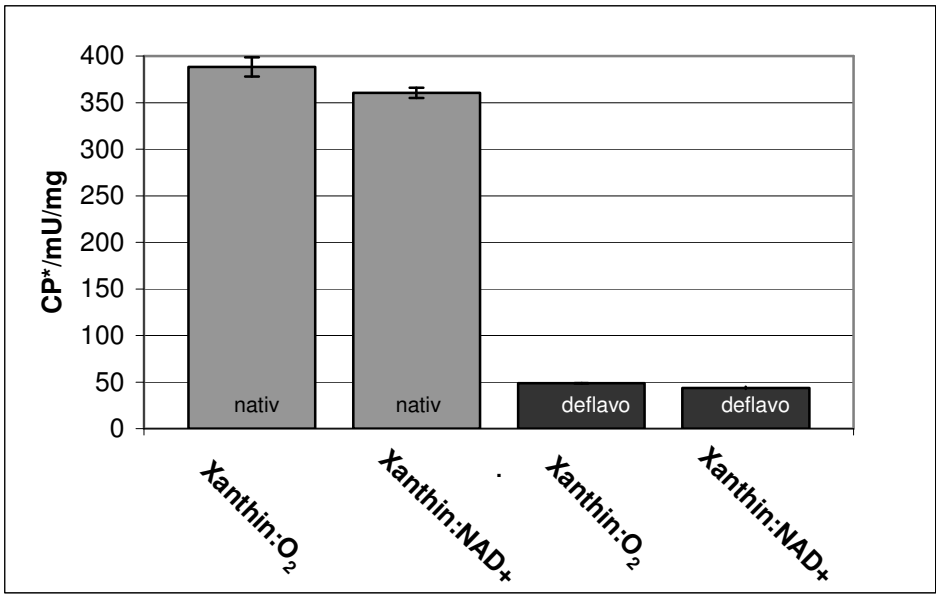


Abbildung 43: Sauerstoffradikalproduktion der XO isoliert aus der Kuhmilch in der nativen und deflavo-Form bestimmt per EPR/Spintrapping Methode. Bei den Messwerten Xanthin:O_2 fungiert Sauerstoff, bei Xanthin:NAD NAD als Elektronenakzeptor. In hellgrau sind die Messungen mit dem isolierten Protein, in dunkelgrau die Messungen des deflavo Protein gezeigt.

In Tabelle 5 sind die Messwerte der Experimente in einer Übersicht dargestellt.

Tabelle 5: Experimente mit zuvor deflavinierter XO aus der Kuhmilch und XDH aus der Hühnerleber zur Bestimmung der Bildung von Sauerstoffradikalen.

	gebildete $O_2^{-\cdot}$/mU/mg	
	Xanthine/O_2	Xanthine/ NAD^+
deflavo XO Kuhmilch	48,70 +/- 0,04	43,70 +/- 1,16
deflavo XDH Hühnerleber	45,97 +/- 0,52	28,90 +/- 1,24

Verwendet wurden hierbei 50 µM Xanthin und 500 µM NAD. Der FAD-Gehalt wurde mittels HPLC bestimmt und betrug bei deflavo XO der Kuhmilch 23% der nativen XO. In den Proben der XDH der Hühnerleber war kein FAD mehr nachzuweisen.

3.2.7 Bildung von Superoxid-Anionen mit dem Substrat NADH

XO und XDH-Formen unterscheiden sich weiterhin in ihrer Aktivität gegenüber dem Substrat NADH [102]. NADH bindet wie NAD an dem FAD-Kofaktor, als Elektronenakzeptor liegt molekularer Sauerstoff vor. bXO wurde nicht durch das Substrat NADH reduziert und zeigte somit auch nur eine geringe Bildung von Sauerstoffradikalen im Vergleich mit dem Substrat Xanthin:O_2. cXDH oxidierte NADH

mit gleichzeitiger Bildung von Sauerstoffradikalen von 45,81 mU/mg. RcXDH zeigte eine 3-fach höhere Aktivität gegenüber NADH:O_2 im Vergleich zum Substrat Xanthin:O_2. Deflavo bXO bildete 13% der Radikalmenge im Vergleich zu dem nativen Enzym, die Sauerstoffradikalproduktion der *deflavo* cXDH ging um über 50% im Vergleich zum nativen Enzym zurück. Durch die gesunkenen Messergebnisse mit *deflavo* XDH und *deflavo* bXO konnte bestätigt werden, dass $O_2^{\bullet-}$ durch das Flavin-Semiquinon gebildet werden.

Tabelle 6: Bestimmung der gebildeten Superoxidradikale mit NADH als Substrat und Sauerstoff als Elektronenakzeptor mit verschiedenen XORs.

	gebildete $O_2^{\cdot-}$/mU/mg		
	NADH/O_2		
	NADH		
deflavo XO Kuhmilch	8,99	+/-	0,71
XO Kuhmilch	68,85	+/-	12,34
deflavo XDH Hühnerleber	31,40	+/-	0,09
XDH Hühnerleber	45,81	+/-	0,27
R. capsulatus XDH	136,18	+/-	3,46

3.2.8 EPR Untersuchungen an Varianten der RcXDH

Um den Elektronenfluß von der Substratbindungsseite des Mocos zur FAD Seite zu untersuchen, wurden sechs unterschiedliche Varianten der RcXDH mittels EPR untersucht. Die beiden [2Fe2S] –Cluster werden von je 4 Cysteinresten durch Ligandenbildung über die Schwefelreste stabilisiert. Um festzustellen, über welche Eisenatome in den Clustern die Elektronen übertragen werden, wurde jeweils ein Cystein mittels Ziel-gerichteter Mutagenese durch ein Serin ausgetauscht. Die Ligandenbildung wurde hierdurch gestört, um die konformellen Änderungen des Enzyms zu untersuchen. Dazu wurde der Wildtyp (WT), die Varianten des FeSI XDH C134S, XDH C136S und die Varianten der Liganden des FeSII XDH C39S, XDH C44S, XDH C63S und XDH C47S untersucht. Die Variationen der Liganden des FeSI XDH C103S und XDH C106S konnten nicht exprimiert werden und dadurch nicht spektroskopisch charakterisiert werden. In Tabelle 7 sind die per Simulation mit dem Programm EasySpin ermittelte Signalwerte zu erkennen. Im Folgenden werden die erhaltenen Spektren näher vorgestellt.

Tabelle 7: Simulationsparameter der WT RcXDH und Varianten:

	Cluster	g-Werte			Linienbreite [mT]	Verhältnis FeSI/FeSII	Eisengehalt/ %
		g_x	g_y	g_z			
veröffentlichte Werte der XDH [a]	FeSI	2.016	1.926	1.924	-	-	-
	FeSII	2.085	1.921	1.907	5.5		
RcXDH [b]	FeSI [b]	2.017	1.921	1.921	2.8	1:1	95%
	FeSII [b]	2.070	1.970	1.900	4.0		
C39S[c]	FeSI	2.017	1.927	1.915	1.9	1:0,5	85%
	FeSII	2.030	1.970	1.900	4.0		
C44S	FeSI	2.015	1.925	1.914	1.9	1:0,5	
	FeSII	2.030	1.970	1.886	4.0		
C47S	FeSI	2.017	1.928	1.914	2.0	1:1	95%
	FeSII	2.002	1.976	1.959	1.0		
C63S	FeSI	2.016	1.926	1.914	1.9	1:0,2	66%
	FeSII	2.030	1.971	1.900	4.0		
C134S Monomer	FeSI	2.017	1.922	1.901	1.9	0,05:1	70%
	FeSII[d]	2.035	1.942	1.880	4.0		
C134S Dimer	FeSI	2.017	1.922	1.901	1.9	0,5:1	85%
	FeSII[e]	2.075	1.945	1.895	5.5		
C_A134A/C_A136A	FeSI	2.008	1.931	1.931	1.8	0,02:1	62%
	FeSII[f]	2.033	1.940	1.890	4.0		

[a] XDH wild-type, Referenz [101]. [b] Ermittelte Parameter in dieser Arbeit, Fehlerabschätzung für WT RcXDH sind ± 0,004 für FeSI und ± 0,008 für FeSII. g_y des FeSII Signals liegt mit einem größeren Fehler vor durch Überlappung des Mo(V) Signals. [c] g-strain wurde bestimmt in der Simulation mit 0,025, 0,025 und 0,05 für g_x, g_y und g_z. [d] g-strain wurde mittels Simulation bestimmt mit 0,01, 0,02 und 0,04 für g_x, g_y und g_z. [e] g-strain wurde bestimmt in der Simulation mit 0,02, 0,0 und 0,02 für g_x, g_y und g_z. [f] g-strain wurde bestimmt in der Simulation mit 0,015, 0,02 und 0,05 für g_x, g_y und g_z.

3.2.9 EPR Untersuchungen des WT

Zunächst wurde der WT der RcXDH nach Reduktion mit 20-fachem Überschuss an Dithionit untersucht. Die Ergebnisse wurden zur Überprüfung der Methode mit literaturbekannten Daten verglichen.

In

Abbildung 44 sind die EPR Spektren der FeS-Cluster mittels Natriumdithionit reduzierter WT RcXDH (Spur a) sowie die Simulationen der Einzelkomponenten mit Ausnahme des Molybdän-Signals (FeSI, FeSII, FAD; Spuren b-e) gezeigt. Das Spektrum des WT RcXDH wies Signale von reduziertem Kofaktor FAD (Spur e) und von verbleibendem Mo(V) des Kofaktors Moco auf. Weiterhin konnten die Signale von zwei reduzierten $[2Fe2S]^+$ Clustern (FeSI und FeSII) beobachtet werden, die charakteristisch für Enzyme der Xanthin-Oxidase Familie sind. Die Signale des FeSI-

Clusters weisen einen axialen g-Tensor mit g_x = 2,017 und $g_y = g_z$ = 1,921 auf. Sie haben eine starke Ähnlichkeit mit den Signalen anderer [2Fe2S]-Cluster enthaltender Proteine und sind auch bei hohen Temperaturen sichtbar (z.B. 60 K,

Abbildung 44, Spur c). Der FeSII-Cluster zeigte rhombische Signale mit 2,07, 1,97 und 1,90 mit einer sehr großen Linienbreite von 4,0 mT und war nur bei sehr niedrigen Temperaturen unterhalb von 20 K sichtbar. g-Werte und Linienbreiten wurden bestimmt durch die Simulation der kombinierten EPR Spektren mittels *EasySpin 2.6.1* [99]. Es wurde von einer literaturbekannten Darstellung ausgegangen, allerdings wurde hierbei eine Variante ohne den Moco-Kofaktor ausgewertet [101]. Die in dieser Arbeit erhaltenen Signale des WT der RcXDH stimmten mit Ausnahme von leicht größeren Linienbreiten der beiden $[2Fe2S]^+$-Cluster mit denen der Literatur überein. Die doppelt integrierten Spektren der FeSI und FeSII-Signals (Spuren C und D) zeigten ein Verhältnis von 1:1, so dass von einem Vorliegen beider Cluster im gesamten Protein ausgegangen werden kann. Das FAD-Semiquinon wurde simuliert mit einem isotropen g-Faktor von 2,001 und einer Linienbreite von 3,9 mT. Diese Linienbreite war größer als die von gewöhnlichen Flavinen (näherungsweise 1,9 mT) [103]. Jedoch wurde bei höheren Temperaturen (80K) eine Verringerung der Linienbreite auf 2,1 mT beobachtet. Die Signale des Moco wurden in der Simulation nicht berücksichtigt. Die hier erhaltenden Ergebnisse aus der Simulation stimmten mit literaturbekannten Daten überein, zudem lagen beide Cluster im selben Verhältnis vor. Es konnte somit von einem vollständigen Einbau der beiden [2Fe2S]-Cluster unter den gegebenen Kulturbedingungen ausgegangen werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden für die Auswertung der Varianten als Referenz benutzt.

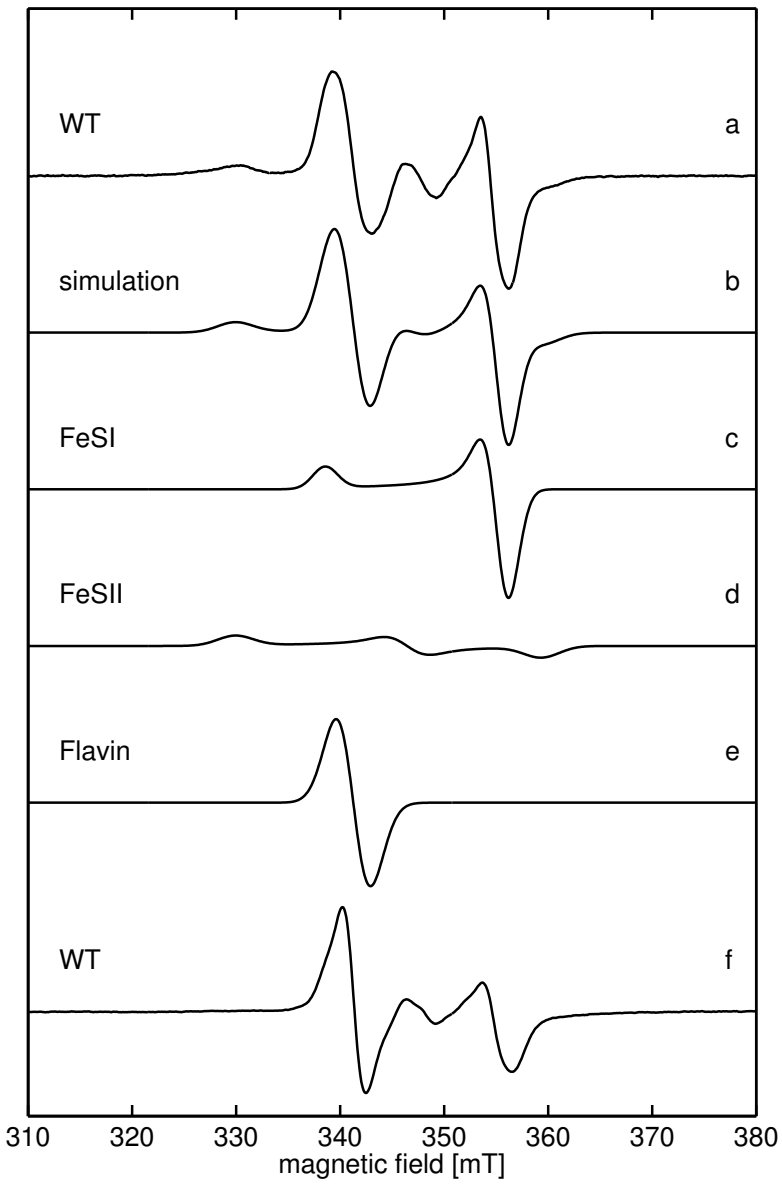


Abbildung 44: EPR Spektren des RcXDH Wildtyps: *a:* Experimentelles Spektrum des WT RcXDH (reduziert bis zum Farbumschlag mit 20-fachem Überschuss Dithionit) bei 20 K. *b*: Simulation des vollständigen WT RcXDH Spektrums durch Addition der Einzelkomponenten, welche in c-e gezeigt werden, das Signal des Mocos (Mo^{V}) wurde ignoriert. *c*: Simulation des FeSI mit einer isotropen Gauss-Linienbreiten von 2,8 mT und g-Werten von $g_{x,y,z}$ = 2,017, 1,921, 1,921. *d*: Simulation des FeSII mit g-Werten von $g_{x,y,z}$ = 2,070, 1,971, 1,900 und einer Linienbreite von 4 mT. *e:* Simulation des Flavin-Semiquinons mit einem isotropen g-Wert von g_{iso} = 2,001 und einer Linienbreite von 3,9 mT. *f*: Experimentelles Spektrum des WT der RcXDH bei 60 K ohne Ausbildung des FeSII Signals. Messparameter: 40 µW microwave power (20K), 160 µW microwave power (60K); 1 mT Modulationsamplitude, 12,5 kHz Modulationsfrequenz.

3.2.10 EPR Spektren der Varianten der Liganden im FeSI Cluster RcXDH

Die EPR Spektren der Varianten C134S und C136S unterscheiden sich vom Wildtyp in der Resonanzposition und Linienbreite (Abbiildung 45). Die Variante C134S konnte als Monomer und als Dimer gereinigt werden (Spur *a* und *c*). Sowohl im Monomer als auch im Dimer verhielten sich die EPR-Parameter des FeSI Cluster gleich und zeigten bei gleicher Linienbreite eine rhombische Struktur. Die FeSII-Cluster wiesen ebenfalls eine rhombische Struktur bei einer sehr großen Linienbreite auf Grund der Heterogenität auf. Das FeSII-Cluster des Monomers lag Hochfeld-verschoben vor. Die relative Intensität des FeSI-Clusters des Monomers sank im Vergleich zum WT ab, eine noch stärkere Absenkung des Verhältnisses auf 1:0,05 war bei der Dimer-Variante zu beobachten. Im Einklang hierzu wurde ein abgesunkener Eisengehalt im Dimer als auch im Monomer gemessen, ein niedriger Wert wurde im Dimer erhalten. Überraschenderweise konnten Signale des FeSI-Clusters im Dimer erhalten werden, jedoch nicht im Monomer. Die Varianten an den Positionen 103 und 106 waren nicht stabil. Bei der Variante C_A134A/C_A136A (Abbildung 45, Spur e), liegen die g-Werte des FeSII-Clusters enger beieinander und zeigen eine stark vergrößerte Linienbreite. Die Signale des FeSI Clusters der C_A134A/C_A136A Variante sind nur schwach verschoben und behalten die axiale Symmetrie bei, jedoch kann nur ein sehr geringer Anteil (<2%) an FeSI-Cluster detektiert werden (Abbildung 45, Spur a), in Übereinstimmung mit dem sehr geringen Eisengehalt von 62%, der per ICP-OES für diese Variante bestimmt wurde (Tabelle 7). Die Variante C136S zeigte keine eindeutigen Signale von FeS-Clustern. (Abbildung 45). Eine geringe Signalintensität des FAD-Semiquinons und des Mo(V) konnte beobachtet werden.

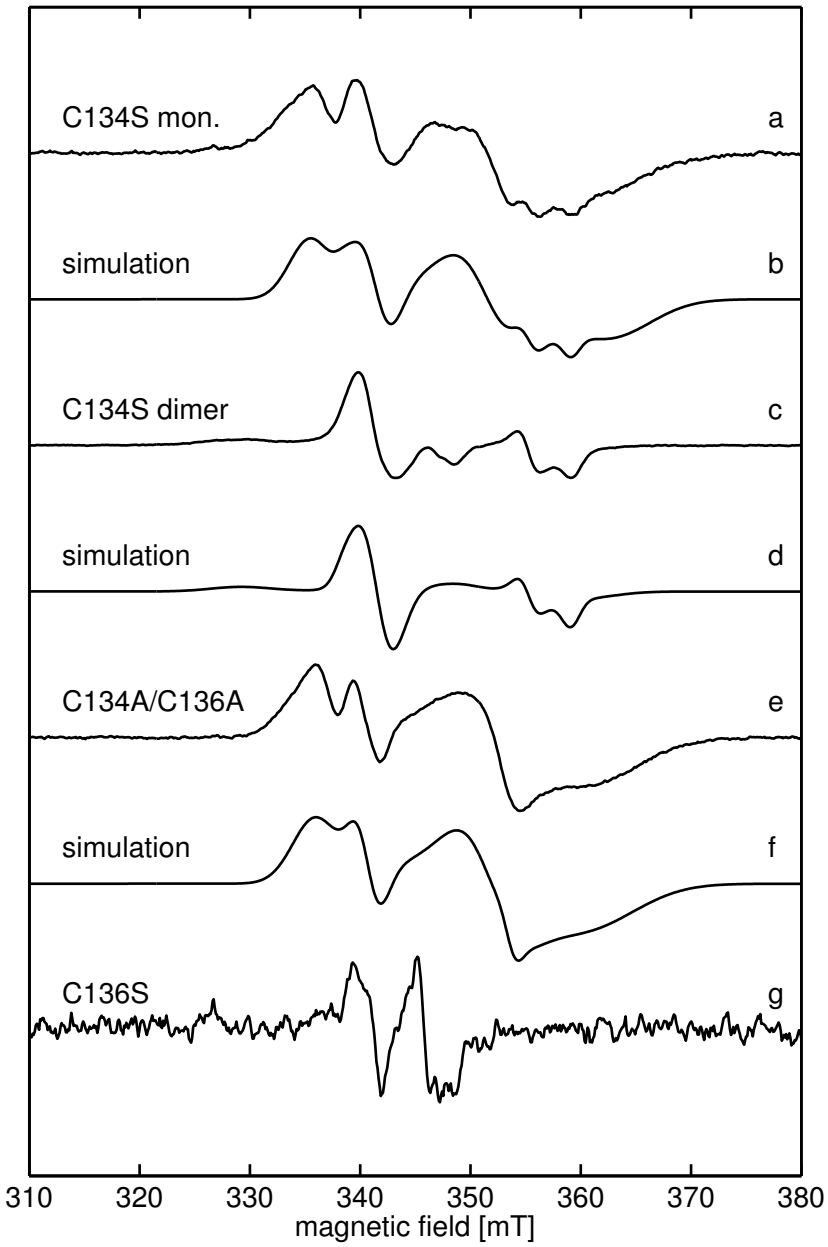


Abbildung 45: EPR Spektren der FeSI und FeSII Zentren der XDH-C134S Variante, Spur a: gereinigt als Monomer, Spur b Simulation der XDH-C134S-Monomer-Variante. Das Verhältnis der FeSI/FeSII-Zentren ist 1:16. Spur c: experimentelles Spektrum der XDH-C134S-Variante, gereinigt als Dimer. Spur d: Simulation der XDH-C134S-Dimer Variante. Das Verhältnis der FeSI/FeSII-Zentren ist 1:2. Spur e: experimentelles Spektrum XDH-C_A134A/C_A136A Variante. Spur f: Simulation der XDH-C_A134A/C_A136A Variante, das Verhältnis der FeSI/FeSII-Zentren ist 1:74. Spur g: Experimentelles Spektrum der XDH-C136S-Variante. Eine Simualtion konnte nicht durchgeführt werden. Messparameter: 1 mW microwave power; 1 mT Modulationsamplitude, 12,5 kHz Modulationsfrequenz, Temperatur: 20K.

3.2.11 EPR Signale der Varianten der Liganden im FeSII Cluster

Die Varianten des FeSII Clusters zeigten in der Reinigung eine hinreichend hohe Stabilität zur Charakterisierung per EPR. Die drei Varianten C39S, C44S und C63S zeigten Ähnlichkeiten in den ermittelten Signalen. Im Gegensatz zu dem Wildtyp wiesen diese drei bei verringerter Linienbreite eine schwach rhombische Struktur des FeSI-Clusters auf. Die Signale des FeSII-Clusters wiesen einen Hochfeld-verschobenen g_x-Wert bei gleich bleibender Lage der g_y- und g_z-Werte im Vergleich zum WT auf. Bei einem Eisengehalt von 85% zeigte sich ein verändertes Verhältnis der FeSI/FeSII-Cluster von 2:1. Die Linienbreite war gleich des WT.

Auch die Variante C44S zeigte bei verringerter Linienbreite eine rhombische Struktur des FeSI-Clusters. Die per Simulation erhaltene Lage der EPR-Signale wies große Ähnlichkeit zum WT auf. Jedoch zeigten die EPR-Signale des FeSII-Clusters eine hochfeld-Verschiebung der g_x- und g_z-Werte bei gleich bleibendem g_y-Wert auf. Es konnte ein Verhältnis der FeSI/FeSII-Cluster von 2:1 beobachtet werden.

Bei einem sehr geringen Eisengehalt zeigte die Variante C63S sehr ähnliche Werte der beobachteten EPR-Signale wie die Variante C39S. Jedoch zeigte das Verhältnis der FeSI/FeSII-Cluster mit 1:0,2 einen sehr geringen Anteil von gebundenen Eisen im FeSII-Cluster auf.

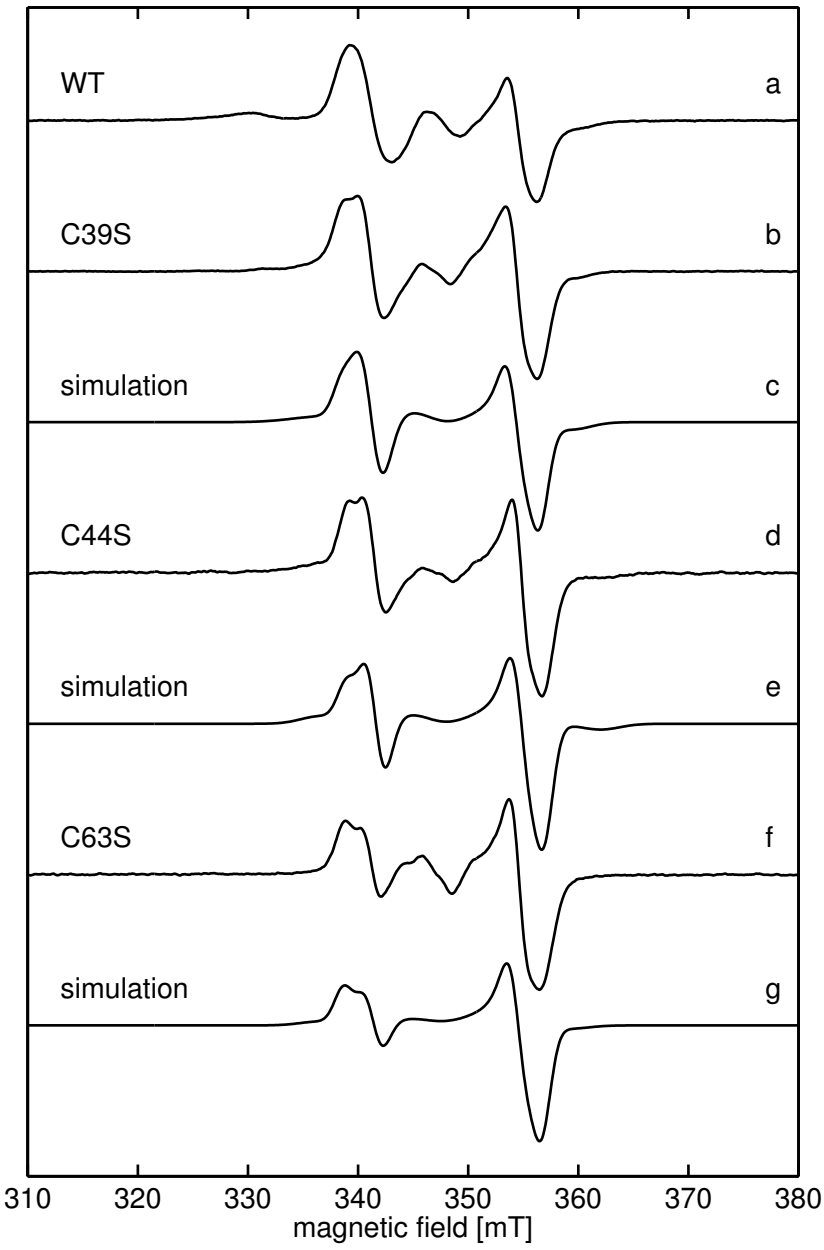


Abbildung 46: EPR Spektren der Varianten ligandiert an das FeSI. Spur a: EPR Spektrum der FeSI und FeSII-Zentren des Wildtyps. Spur b: Experimentelles Spektrum der Variante XDH-C39S. Spur c: Simulation der XDH-C39S-Variante, das Verhältnis der FeSI/FeSII-Zentren ist 2:1. Spur d: Experimentelles Spektrum der XDH-C44S-Variante. Spur e: Simulation der XDH-C44S-Variante, das Verhältnis der FeSI/FeSII-Zentren ist 2:1. Spur f: Experimentelles Spektrum der XDH-C63S-Variante. Spur g: Simulation der XDH-C63S-Variante, das Verhältnis der FeSI/FeSII-Zentren ist 5:1. Messparameter: 1 mW microwave power; 1 mT Modulationsamplitude, 12,5 kHz Modulationsfrequenz, Temperatur: 20K.

3.2.12 EPR Signale der Variante C47S

Hingegen zu den in Kapitel 3.2.11 beschriebenen Varianten zeigt die Variante C47S eine stark veränderte EPR-Charakteristik. Die Resonanzpositionen der Signale des FeSI-Cluster ähnelten sehr den Resonanzpositionen der Varianten desselben Clusters. Die Linienbreite war leicht erhöht. Im Gegensatz dazu wiesen die Signale des FeSII-Clusters große Unterschiede auf. Sie zeigen eine sehr geringer Linienbreite und die Anisotropie des g-Tensors ist gering. Der Gesamteisengehalt von 95% spiegelte sich auch in dem Verhältnis von 1:1 der FeSI/FeSII-Cluster wieder.

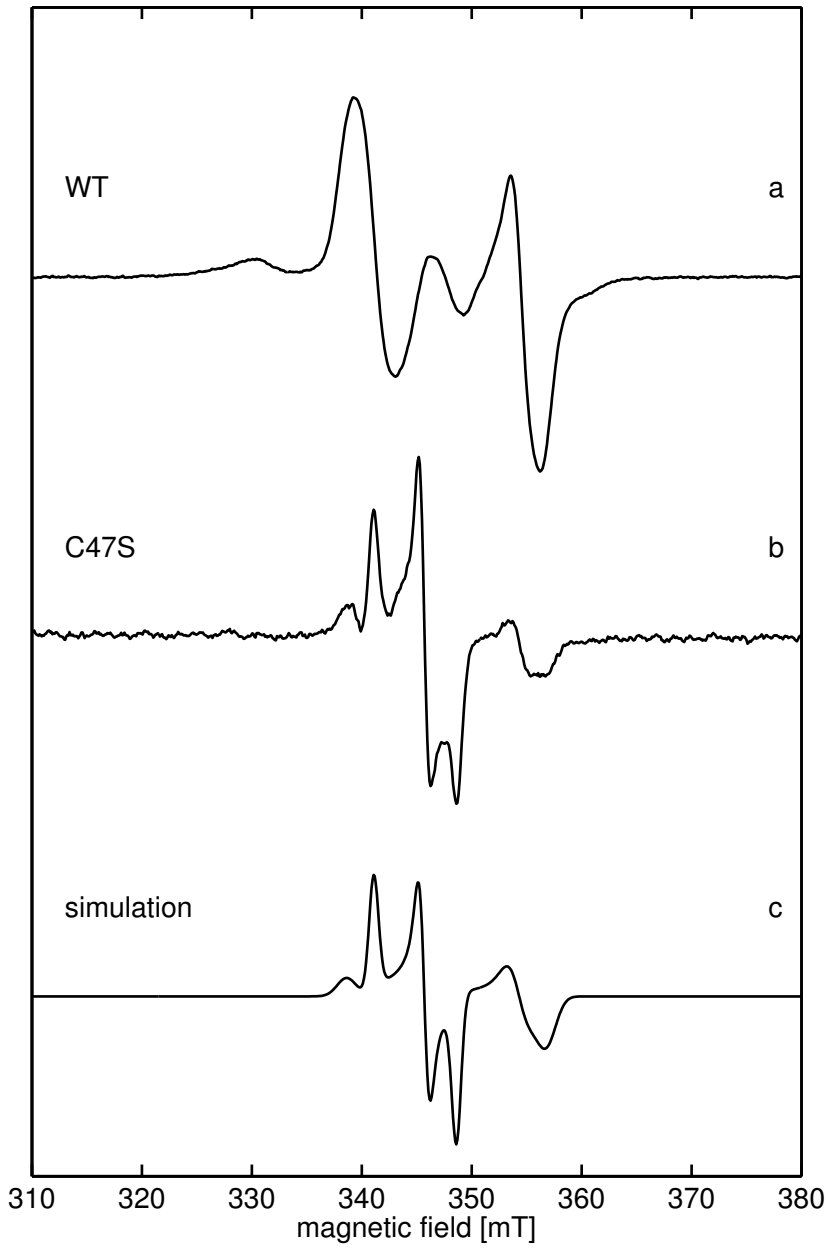


Abbildung 47: EPR Spektren der Variante XDH-C47S. Spur *a*: EPR Spektrum der FeSI und FeSII-Zentren des Wildtyps. Spur *b*: Experimentelles Spektrum der Variante XDH-C47S. Spur *c*: Simulation der XDH-C47S-Variante, das Verhältnis der FeSI/FeSII-Zentren ist 1:1. Messparameter: 1 mW microwave power; 1 mT Modulationsamplitude, 12,5 kHz Modulationsfrequenz, Temperatur: 20K.

3.2.13 Aktivitätsmessung der RcXDH-Varianten mit der Spintrap-Methode

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Superoxid-Anion Bildung der RcXDH-Varianten mit der Spintrapping-Methode dargestellt. Die Aktivität des WT wurde als Referenz bestimmt. Die Messungen wurden mit 100 µM Xanthin, bzw 100 µM Xanthin und 500 µM NAD durchgeführt. Der Wildtyp wies mit beiden Substraten die höchste Aktivität auf, wobei die Aktivität mit NAD als Elektronenakzeptor um 35% sank. Die Varianten den FeSI-Clusters zeigte alle eine ähnliche Aktivität, die ca. 20% der WT Aktivität betrug. Wurde der Elektronakzeptor NAD zugegeben, sanken die Messwerte mit Ausnahme des Dimers der C134S-Variante nicht ab. Eine 20% Aktivität konnte auch bei der FeSII-Cluster Variante C39S nachgewiesen werden. Die Varianten C44S und C47S zeigte mit ~11% eine niedrigere Aktivität. Die Superoxid-Anionbildung der Varianten C39S und C47S war mit dem Elektronenakzeptor NAD niedriger als mit O_2 als Elektronenakzeptor. Die niedrigste Aktivität mit Xanthin als Substrat und Sauerstoff und NAD als Elektronenakzeptor wies die Variante C134A/C136A auf. Die Variante C63S stand für Aktvitätsmessungen nicht zur Verfügung.

Tabelle 8: Bestimmung der Superoxid-Anionbildung der RcXDH-Varianten mit der Spintrap-Methode

	gebildete $O_2^{\cdot-}$/mU/mg					
	Xanthin:O_2			Xanthin:NAD		
WT	75,02	+/-	4,71	48,97	+/-	2,50
C39S	15,36	+/-	0,46	12,31	+/-	0,37
C44S	8,99	+/-	0,27	11,03	+/-	0,33
C47S	7,33	+/-	0,22	5,52	+/-	0,17
C63S	nd	+/-		nd	+/-	
C134S Monomer	12,18	+/-	0,37	12,49	+/-	0,08
C134S Dimer	14,84	+/-	0,45	2,65	+/-	0,37
C136S	13,82	+/-	0,41	14,97	+/-	0,45
C134A/C136A	3,31	+/-	0,10	4,54	+/-	0,14

3.3 Auswertung des Tierversuches: Auswirkungen eines induzierten Leberzellkarzinoms mittels AH-130 Hepatoma Zellen bei Ratten

In einem Tierversuch wurden die Auswirkungen eines Leberzellkarzinoms auf die Entwicklung des Körpergewichtes, Körperzusammensetzung, Futteraufnahme, physikalische Aktivität der Tiere und die der Sauerstoffradikalproduktion der XOR aus

Leberproben untersucht. Die Tiere wurden in fünf Gruppen eingeteilt, von jeder Gruppe wurden Daten von Kontrolltieren aufgenommen. Den Kontrolltieren wurde anstatt der Karzinomzellen Kochsalzlösung intrapearitonal injiziert. Gruppe 1 wurde keiner weiteren Behandlung unterzogen und nur der Krankheitsverlauf beobachtet. Gruppe 2 und 3 wurden mit dem Xanthinoxidoreduktase Inhibitor Oxypurinol behandelt. Gruppe 2 mit 4 mg/kg Körpergewicht/Tag und Gruppe 3 mit 40 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die gleiche Dosierung erhielten die Gruppen 4 und 5 mit dem Xanthinoxidoreduktase Inhibitor Allopurinol

3.3.1 Körperzusammensetzung, Futteraufnahme und physikalische Aktivität der Tiere

Veterinärmedizinische Doktoranden der Arbeitsgruppe Anker nahmen Daten zur Aktivität der Tiere und zu Entwicklung des Körpergewichtes und der Körperzusammensetzung auf. Die aufgenommen Daten sind im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen zu sehen und in Tabelle 9 abgebildet. Der Gewichtsverlust des Körpergewichtes von mit 4 mg/kg Körpergewicht/Tag Oxypurinol behandelten Gruppen war signifikant geringer als der der Kontrollgruppe. Eine ebenso signifikante aber leicht größere Gewichtsabnahme des Körpergewichtes war bei den Gruppen zu erkennen, die mit 40 mg/kg Körpergewicht/Tag Oxypurinol und 40 mg/kg Körpergewicht/Tag Allopurinol behandelt wurden. Ebenso verhielt sich die Gewichtsentwicklung von den Anteilen des Körperfettes und der Muskelmasse. Die Futteraufnahme war bei den Tieren, die mit 4 mg/kg Körpergewicht/Tag Oxypurinol bzw. 40 mg/kg Körpergewicht/Tag Allopurinol behandelt wurden signifikant größer. Zur weiteren Beurteilung der Lebensqualität wurden Daten über die spontane Aktivität der Tiere aufgenommen. Hier war die Aktivität der mit 4 mg/kg Körpergewicht/Tag Oxypurinol behandelten Gruppe signifikant größer als die der anderen Gruppen. Somit konnte gesagt werden, dass eine Inhibition der XOR Gewichtsverlust vermeidet, die Futteraufnahme und die spontane Aktivität der Tiere ansteigt. Die geringere Dosis des Inhibitors Oxypurinol zeigte hier ein höheres Nutzen auf als die höhere Dosis, was eine inverse Dosisantwort aufzeigt.

Tabelle 9: Veränderung der Gewichtszunahme und der Körperzusammensetzung aller im Versuch eingeschlossenen Tiere.

	Tumor (n=49)	Oxy 4 mg/kg/d (n=11)	Oxy 40 mg/kg/d (n=12)	Allo 40 mg/kg/d (n=11)
Δ Körpergewicht/g	-50,2 ± 2,2	-15,4 ± 14,2***	-45,3 ± 11,8	-26,4 ± 17,1*
Δ Fett/g	-11,2 ± 0,4	-6,8 ± 2,6**	-14,4 ± 1,9*	-8,1 ± 2,9
Δ Muskelmasse/ g	-37,1 ± 2,0	-10,6 ± 10,4***	-32,4 ± 9,6	-19,9 ± 12,6*
Futteraufnahme/ g/Tag	4,1 ± 0,6	13,0 ± 2,9***	5,8 ± 2,2	9,8 ± 3,2**
Aktivität [counts/Tag]	29209 ± 2270	48343 ± 7724**	31777 ± 6738	40046 ± 6854

***: p<0,05; **: p<0,01, ***: p<0,001 Verbesserung gegen die unbehandelten Tumortiere.**

3.3.2 Produktion von Sauerstoffradikalen durch XOR

Um die Entwicklung der Daten aus Kapitel 3.3.1 mit der Belastung des Organismus durch Sauerstoffradikale zu vergleichen, wurden von einem Teil der Tiere die XOR Aktivität mittels der EPR-Spintrappingmethode bestimmt. In Abbildung 48 sind Balkendiagramme der Aktivitätsmessungen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen aufgetragen, in Tabelle 10 die Messwerte der einzelnen Tiere und die Berechnung der Mittelwerte, des Standardfehlers und der Standardabweichung. Hierbei wurden die entstehenden Sauerstoffradikale von je 10 µg Gesamtprotein gemessen. Es reagiert jeweils ein Superoxidradikal mit CP zu CP*. Die Darstellung erfolgt berechnet auf 1 µg Protein.

Deutlich zu erkennen war eine stark erhöhte Bildung von CP* bei den Tieren der Gruppe 1 von durchschnittlich 171 +/- 52,05 nmol CP*/µg Gesamtprotein bei gleichzeitig einer signifikant niedrigeren Bildung von CP* Radikalen der Kontrollgruppe mit 4,87 +/- 2,45 nmol CP*/µg Gesamtprotein. Alle Behandlungsgruppen wiesen eine signifkant geringere Bildung von Carboxyproxylradikalen auf als die unbehandelte Gruppe. Die mit 4 mg Oxypurinol/kg Körpergewicht/Tag behandelten Tiere der Gruppe 2 wiesen gegenüber den Tieren der Gruppe 3 (40 mg Oxypurinol/kg Körpergewicht/Tag) eine leicht höhere Bildung von CP* auf. Die bestimmten Werte lagen bei 25,38 +/- 6,58 nmol CP*/µg Gesamtprotein für Gruppe 2 gegen 17,05 +/- 8,30 nmol CP*/µg Gesamtprotein für Gruppe 3. Die mit Oxypurinol behandelten Kontrollgruppen zeigten gegenüber der Vergleichgruppen 2 und 3 eine niedrigere, im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 eine leicht erhöhte Bildung von CP*-Radikalen (Kontrollgruppe 2: 11,18 +/- 3,68 nmol CP*/µg Gesamtprotein; Kontrollgruppe 3: 7,28 +/- 1,60 nmol

CP*/µg Gesamtprotein). Zu Vergleichszwecken wurden mit denselben Dosierungen die Gruppen 4 und 5 mit Allopurinol behandelt.

Die Gruppe 5, behandelt mit 40 mg Allopurinol/kg Körpergewicht/Tag, zeigt mit 31,01 +/- 12,67 nmol CP*/µg Gesamtprotein eine leicht größere Bildung von CP* als die mit derselben Dosierung Oxypurinol behandelte Gruppe 3. Wurden die Tiere mit nur 4 mg/kg Körpergewicht/ Tag Allopurinol behandelt, stieg die gebildete Menge an CP* weiter an auf 38,24 +/- 5,67 nmol CP*/µg Gesamtprotein.

Es konnte so gezeigt werden, dass die Gabe der Inhibitoren Allopurinol und Oxypurinol die von XOR ausgehende Sauerstoffradikalbildung signifikant senkt. In allen Gruppen wurden mehr Sauerstoffradikale durch die tumorkranken Tiere im Vergleich zu deren Kontrollgruppen gebildet. Die deutlichste Absenkung der Radikalmenge durch XOR ist bei der Gabe von hohen Oxypurinol-Konzentrationen zu erkennen, gefolgt von der niedrigeren Oxypurinol-Konzentration.

Tabelle 10: Ergebnisse der EPR-Spintrapmethode der 5 Behandlungsgruppen und deren Kontrollgruppen.

	Sham	Tumortiere	Sham 4mg/kgKG/d Oxypurinol	Tumortiere 4mg/kgKG/d Oxypurinol	Sham 40mg/kgKG/d Oxypurinol	Tumortiere 40mg/kgKG/d Oxypurinol	Sham 4mg/kgKG/d Allopurinol	Tumortiere 4mg/kgKG/d Allopurinol	Sham 40mg/kgKG/d Allopurinol	Tumortiere 40mg/kgKG/d Allopurinol
Gruppe	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
n	9	14	4	9	4	7	nd	9	4	8
MW	**3,23****	**169,49**	**9,91**	**25,60$^{\#\#}$**	**6,73**	**17,26$^{\#}$**	**nd**	**38,23$^{\#}$**	**4,30**	**31,23$^{\#}$**
SD	2,97	196,41	8,23	19,50	3,60	21,82	nd	16,04	0,26	35,66
SE	**0,99**	**52,49**	**4,12**	**6,50**	**1,80**	**8,25**	**nd**	**5,67**	**0,13**	**12,61**

Dargestellt nmol/µg Gewebe gebildete Nitroxylradikale CP*. Hierbei reagiert ein Superoxidradikal mit dem Spintrap CPH zum CP*. MW Mittelwert, SD Standardabweichung, SE Standardfehler. **: p = 0,01, $^{\#\#}$: p = 0,03, $^{\#}$: p = 0,05 Verbesserung gegenüber den unbehandelten Tumortieren. Die Signifikanzebenen wurden mittels ANOVA bestimmt.

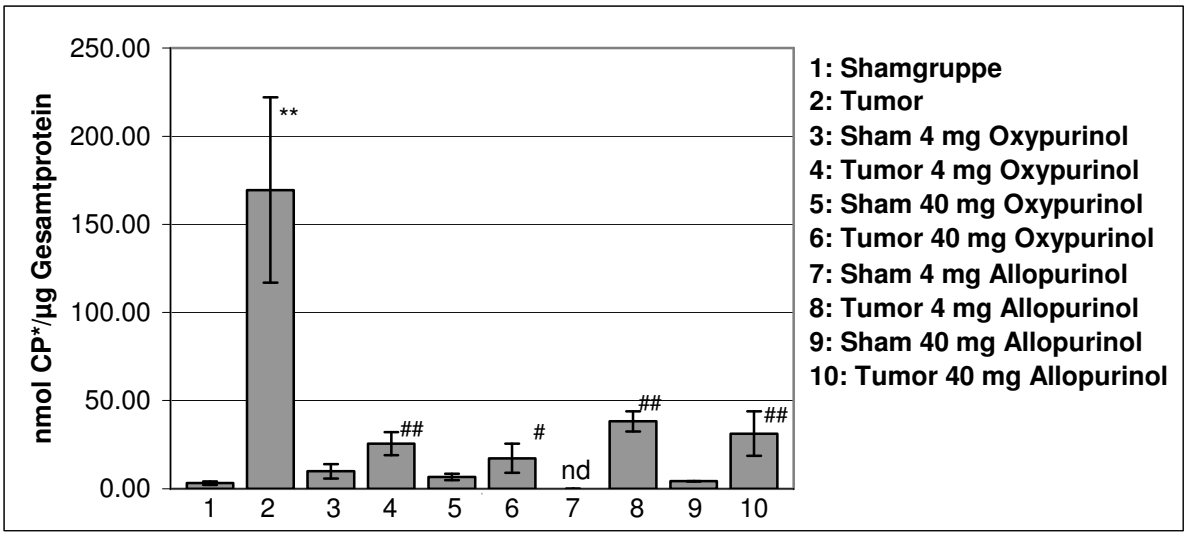


Abbildung 48: Balkendiagramm der Ratten des Tumortierversuches, die Sauerstoffradikalproduktion/µg Protein korreliert mit der Menge an gebildeten CP*-Radikalen

KG: Körpergewicht.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung einer Reinigungsmethode zur Aktivitätsbestimmung der XOR

Die XOR wurde aus verschiedenen Organismen isoliert. Hierbei wurden Methoden miteinander kombiniert, die auf unterschiedlichen Prinzipien der Reinigung beruhen. Ziel war, mit möglichst wenigen, kurzen Arbeitsschritten eine Reinigung mit geringen Proteinverlusten zu entwickeln, die eine Messung der XOR Aktivität per EPR ermöglicht.

4.1.1 XOR Aktivitätsbestimmungen mit XOR der Reinheitsstufe 1

Der zuerst durchgeführte Zentrifugationsschritt diente der Abtrennung von Zelltrümmern, Zellkernen, Plasma- und Kernmembranen, Mitochondrien, Peroxisomen und Lyosomen [104,105]. Auf Grund der Zentrifugalkraft setzen sich Bestandteile des Homogenats mit einer höheren Dichte als Niederschlag ab, wohingegen die XOR im Überstand gelöst vorliegt. Die Reinheitsstufe wird mit 1 bezeichnet und entspricht mit leichten Variationen der zur XOR-Messung von Landmesser et al. verwendeten Gewebeaufarbeitung [92].

XOR-Aktivitätsmessungen mit Gewebeaufarbeitungen in Reinheitsstufe 1 führten in dieser Arbeit jedoch zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Die detektierte Konzentration an CP* sank mit der Zugabe von Substrat ab (siehe Kapitel 3.1.1, Abbildung 18). Da nur eine Zentrifugation des Homogenates durchgeführt wurde, liegen weiterhin Enzyme des antioxidativen Systems und zusätzliche ROS produzierende Enzyme vor (siehe Kapitel 1.2.1 und 1.2.2) [106,107,108,109]. Als Quellen für ROS werden von McNally et al. NAD(P)H-Oxidasen, Cytochrom P450, Mitochondrien und endotheliale NOS beschrieben [110]. Durch die zuvor durchgeführte Zentrifugation bei 30.000 g wurden jedoch die Mitochondrien und die Membran-gebundene NAD(P)H-Oxidase [111] abgetrennt, so dass als mögliche Quelle von ROS insbesondere Cytochrom P450 und Cytochrom enthaltendes Hämoglobin zu berücksichtigen sind [112]. Untersuchungen an isoliertem Cytochrom P450 in Kapitel 0 zeigten eine Bildung von $O_2^{-\bullet}$ ohne Substratzusatz und mit Xanthin als Substrat. Verschiedene Autoren beschreiben eine Bildung von $O_2^{-\bullet}$ durch Cytochrom P450 ohne Substratzugabe [113,114], da hier die freiwerdenden

Elektronen ausgehend von einem oxo-Fe(IV)-porphyrin-π-Kationradikal auf molekularen Sauerstoff anstatt auf das zu reduzierende Substrat übertragen werden [115,116,117]. Die verstärkte $O_2^{-\bullet}$ Bildung ohne Substrat ist eine mögliche Erklärung der Abschwächung des Messsignals nach Substratzugabe. Weiterhin unterstützt wird diese Aussage durch im weiteren Verlauf durchgeführte Experimente mit gereinigter XOR und Zugabe von abgetrenntem Hämoglobin enthaltenden Fraktionen, die das Signal stark absinken ließen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Ebenfalls in dem Homogenat der Reinheitsstufe 1 enthalten sind antioxidative Proteine wie z.B. Superoxiddismutase, die in $O_2^{-\bullet}$ zu Wasserstoffperoxid und Wasser neutralisieren (siehe Kapitel 1.2.1). Diese Reaktion verläuft schneller als die Bildung des Spinadduktes CP* [118]. Zu dem antioxidativen System zugehörig sind niedermolekulare Substanzen mit Radikalfängereigenschaften wie Vitamin C oder das Produkt der XOR-Reaktion Harnsäure [119]. Niedermolekulare Substanzen können nicht durch Zentrifugation abgetrennt werden. Dikalov et al. zeigten eine Verringerung der Spinadduktbildung bei gleichzeitigem Vorliegen von Vitamin C [120], so dass eine Entfernung von niedermolekularen Substanzen, die zudem zeitgleich als Substrate fungieren können, nötig ist.

4.1.2 Untersuchung von Verunreinigungen

Das Homogenat in der Reinheitsstufe 1 war auf Grund der oben aufgeführten Begründungen nicht zur XOR Bestimmung geeignet. Um die Auswirkung von antioxidativen Systemen und ROS produzierenden Enzymen zu untersuchen, wurde auf die RcXDH zurückgegriffen. Die RcXDH kann rekombinant aus *E. coli* gereinigt werden und steht daher in großen Mengen zur Verfügung. Auf Grund der hohen Homologie und Ähnlichkeit im Verhalten kann RcXDH als Modellsystem eingesetzt werden [55].

4.1.3 Messungen am Modellsystem RcXHD

Aktivitätsbestimmungen der RcXDH mit diversen Substraten schlossen sich zunächst an wie Experimente mit einigen ausgewählten Enzymen, die mögliche radikalbildende oder antioxidative Eigenschaften aufweisen können. Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, stellen Enzyme mit Cytochromen eine mögliche Verunreinigung dar. Als Vertreter der Proteine, die Cytochrom-Strukturen enthalten wurde gereinigtes Cytochrom P450 näher untersucht. Ebenfalls ausgewählt wurde Katalase, als ein

Enzym mit einem Häm-Cofaktor. Katalse kommt in Geweben in großen Mengen vor und ist am Abbau von Wasserstoffperoxid beteiligt (siehe Kapitel 1.2.1). Zudem wurden Untersuchungen mit verschiedenen Inhibitoren der XOR, Allpurinol und Oxypurinol, durchgeführt. Da während der Reinigung der XOR aus Gewebe eine Trennung der XOR von einem weiteren Molybdoenzym, der Aldehydoxidase (AOX) schwierig ist [102], wurde die Bildung von ROS mit unterschiedlichen Substraten von der AOX untersucht. Hierdurch konnte die Aktivität der beiden Molybdoenzyme XOR und AOX durch Vewendung spezifischer Substrate getrennt voneinander bestimmt werden.

Allgemeine Untersuchungen der RcXDH: die Reaktion mit Xanthin und deren Inhibierung

Die Aktvität von RcXDH wurde mit dem Substrat Xanthin und den spezifischen Inhibitoren der Moco-Bindungsseite Allopurinol und Oxypurinol bestimmt [121]. RcXDH zeigte eine konzentrations- und temperaturabhängige Bildung von ROS mit dem Substrat Xanthin. Als Inhibitoren wurden Allopurinol und Oxypurinol untersucht (siehe Kapitel 1.1). Hier zeigte sich die erwartetete ca. 50%tige Inhibierung der Superoxid-Anionproduktion des Enzyms, jedoch wies Oxypurinol eine um 10% bessere Inhibierung als Allopurinol auf (siehe Abbildung 19). Die bessere Inhibierung durch Oxypurinol wurde ebenso von Sanders et al. beschrieben [47]. Allopurinol bindet als kompetetiver Inhibitor an die oxidierte Form des Molybdäns des Mocos [121]. Bei der folgenden Elektronenübertragung auf das Molybdän wird Allopurinol zu Oxypurinol unter gleichzeitiger Bildung von Superoxid-Anionen oxidiert [49, 122, 123]. Oxypurinol bindet als Inhibitor an die reduzierte Form des Molybdäns [124]. Eine Umsetzung von Oxypurinol ist nicht möglich, so dass die höhere Bildung von Superoxid-Anionen durch Umsetzung von Allopurinol zu Oxypurinol zu erklären ist [125].

Als ein weiterer direkter Inhibitor wurde KCN untersucht. KCN bildet mit dem terminalen Schwefelliganden des Molybdäns eine Thiosulfatverbindung unter Desulfurierung des Mocos aus [126]. Dies resultiert in einer 50%tiger Inaktivierung der RcXDH (siehe Abbildung 19).

Das Enzym Superoxiddismutase ist kein Inhibitor der RcXDH. Sie reagiert jedoch in einer sehr schnellen Dismutationsreaktion 2 x 10^9 M/s) mit Superoxid-Anionen unter

Bildung von Sauerstoff und H_2O_2 (siehe Kapitel 1.2.1) [127] und führt zu einer fast vollständigen Inhibition des Messsignals (siehe Abbildung 19).

4.1.4 Katalase und Cytochrom P450

Hämproteine liegen in Gewebeproben zu einem hohen Anteil vor [129]. Da sie eine hohe Stabilität aufweisen und sehr hitzeunempfindlich sind, sind sie mögliche Verunreinigungen in den Gewebehomogenaten [129]. Als Beispiele wurden Katalase und Cytochrom P 450 ausgewählt. Katalase ist direkt am antioxidativen System beteiligt und weist auf Grund der enthaltenden Hämgruppe eine Möglichkeit der direkten Elektronenübertragung auf Sauerstoff auf [128]. Durch die Reaktionsprodukte können radikalische Spezies durch die Fenton/Haber-Weiss-Reaktion gebildet werden (siehe Kapitel 1.2.2). Experimente ergaben, dass das Enzym Katalase keine direkte Reaktion mit dem Spintrap CPH zu CP* aufweist (siehe Abbildung 21). Wird jedoch das Substrate H_2O_2 hinzugegeben, kann eine hohe Bildung von CP* nachgewiesen werden. Katalase wird durch Substanzen inhibiert, die Wechselwirkungen mit der freien Koordinationsstelle des Zentralatoms des Häms, Eisen, eingehen [129]. Werden diese Inhibitoren, wie z.B. Cyanide oder Mercaptoethanol benutzt, erfolgt jedoch auch eine Inhibition der XOR [129].

Als ein weiterer Vertreter der Hämproteine wurde das Enzym Cytochrom P450 untersucht. Cytochrom P450 wies eine Bildung von CP* ohne jegliche Zugabe von Substraten auf, so dass von einer Elektronübertragung ausgehend von der Hämgruppe auf im Wasser gelösten Sauerstoff ausgegangen werden musste (siehe Abbildung 22) [127]. Diese Reaktion war nicht durch den spezifischen Inhibitor Miconazol inhibierbar. Ebenso wies Cythochrom P450 sogar eine erhöhte Bildung des CP*-Radikal unter Zugabe des Substrates Xanthin auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Abtrennung von Häm-Proteinen notwendig ist, um keine ROS Generierung durch Häm-Proteine zu erhalten. Somit sind die Untersuchungen von verschiedenen Autoren [92] mit Gewebeaufarbeitungen ähnlich der hier verwandten Reinheitsstufe 1 als zweifelhaft zu bewerten. Durch die nicht abgetrennten Häm-Proteine, antioxidativen Systeme, Edukten und Produkten kann keine zuverlässige Messung der XOR-Aktivität erfolgen.

4.1.5 Trennung von AOX und RcXDH

Das Molybdoenzym AOX weist eine sehr große Gemeinsamkeit mit der XOR in der Metabolisierung von Substraten unter gleichzeitiger Bildung von $O_2^{-\bullet}$ auf [130], somit kann AOX die Aktivitätsmessungen der RcXDH verfälschen. Die Maus-AOX wurde ebenfalls rekombinant aus *E. coli* gereinigt. Ziel der Experimente war, jeweils ein spezifisches Substrat für AOX und XOR zu finden. Hierzu wurde zunächst das als sehr spezifisch für Aktivitätsmessungen der AOX benutzte Substrat Benzaldehyd getestet. AOX sowohl als RcXDH bildeten mit Benzaldehyd als Substrat $O_2^{-\bullet}$ (siehe Abbildung 23). Weiterhin wies Benzaldehyd überraschenderweise eine direkte Reaktion mit dem Spintrap CPH zu CP* auf. Diese Reaktion konnte nicht durch SOD inhibiert werden, so dass es sich um eine direkte chemische Reaktion von Benzaldehyd mit dem Spintrap CPH handelte (siehe Abbildung 23). Diese Ergebnisse schlossen Benzaldehyd für weitere Experimente aus. Um weitere direkte Reaktionen des Substrates mit dem Spintrap zu vermeiden, wurde als nächstes für die AOX ein Substrat mit einem Puringrundgerüst ausgesucht. Xanthin zeigte keine direkte Reaktion mit Spintrap CPH und gehört ebenso zu den Purinverbindungen. AOX zeigte eine sehr starke Bildung von $O_2^{-\bullet}$ mit Phenanthridin, jedoch wies auch RcXDH eine sehr leichte Bildung von $O_2^{-\bullet}$ auf (siehe Abbildung 24), dieses wurde zuvor von Kundu et al. beschrieben [131]. Im Vergleich dazu zeigte die AOX nur ein äußerst geringes Messsignal mit dem Substrat Xanthin. Um zu überprüfen, ob trotz der geringen Aktivitäten der AOX mit Xanthin und der RcXDH mit Phenanthridin eine Bestimmung der detektierten $O_2^{-\bullet}$ ausgehend von einem der beiden Enzyme in einem Gemisch möglich ist, wurden zunächst Messungen mit je einem Enzym und beiden Substraten durchgeführt. Die Messungen mit je einem Substrat wurden grafisch addiert und mit dem Messergebnis des Substratgemisches verglichen (Abbildung 25). Es zeigte sich sowohl für AOX und RcXDH als auch für das Enzymgemisch, dass eine Konzentrationsbestimmung der Enzyme AOX und RcXDH durch eine Anwendung der spezifischen Substrate Xanthin und Phenanthridin mittels EPR möglich ist.

Die durchgeführten allgemeinen Experimente mit den Modellsystemen der RcXDH und der AOX zeigten die Notwendigkeit einer besseren Reinigung der XOR aus Gewebe zur Bestimmung der $O_2^{-\bullet}$ Bildung per EPR auf. Insbesondere die Abtrennung von niedermolekularen Substanzen wie Substraten und antioxidativen Vitaminen und die Abtrennung von Häm-enthaltenden Proteinen schienen wichtig. Dies stand

jedoch im Widerspruch zu dem Ziel, eine schnelle, effiziente Methode zu entwickeln, um die Messungen von vielen Proben (n > 500) in kürzester Zeit zu ermöglichen. Im Folgenden werden drei verschiedene Reinheitsstufen erarbeitet, die nachfolgend verglichen werden, um die nötige Reinheit zu bestimmen.

Reinheitsstufe 2

Um hitzeempfindliche Proteine aus dem Gewebehomogenat auszuschließen, wurde ein Hitzeschritt durchgeführt. Hierbei ist auf eine reproduzierbare Temperatur/Zeit-Kurve zu achten, die durch den Einsatz von immer gleichen Volumina erreicht wird [132]. Der verbleibende Überstand wurde einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Ammoniumsulfatfällungen sind auf Grund ihrer hohen Verluste, hohem Zeitaufwand und geringem Reinigungsfaktor nicht das Mittel der Wahl [133,134], jedoch wird hierdurch eine Stabilisierung des Proteins erreicht [132]. Im Anschluß wurde das Protein mit einer Sephadex G25 Säule chromatografisch von verbleibendem Ammoniumsulfat und niedermolekularen Substanzen mittels Größenausschlußverfahren getrennt. Der bis zu diesem Zeitpunkt eingesetzte Material- und Zeitaufwand entsprach dem der gesuchten effektiven Methode. Jedoch musste davon ausgegangen werden, dass die als störend definierten Verunreinigungen der Häm-enthaltenden Proteine wie Katalase auf Grund der Hitzeunempfindlichkeit und ähnliches Aussalzungsverhalten wie XOR noch in der Proteinlösung vorhanden waren. Um die Auswirkungen nochmals zu untersuchen und sicherzustellen, welche Reinheitsstufe zur XOR-Aktivitätsmessung per EPR nötig ist, wurde das Protein weiter gereinigt. Als Orientierung diente hierbei eine Methode nach Maia et al. [91].

Reinheitsstufe 3a und 3b

Das gelöste Protein nach der Ammoniumsulfatfällung wurde in zwei unterschiedlichen Wegen weiter behandelt. In einer Variante wurde abschließend eine Gelfiltrationschromatografie durchgeführt (Reinheitsstufe 3a), in der anderen zuvor eine Hydroxylapatit-Chromatografie. Das Produkt der Hydroxylapatitchromatografie wurde ebenfalls abschließend mittels analytischer Gelfiltration gereinigt (Reinheitsstufe 3b).

Die Auswahl der Hydroxylapatitmatrix erfolgte auf Grund ihrer hohen Beladungsmöglichkeit und der Abtrennung von niedermolekularen Substanzen durch

die fehlende Bindung an das inorganische Material [135,136]. Insbesondere die Entfernung des Produktes des XOR Metabolismus Harnsäure ist wichtig, da Harnsäure radikalfangende Eigenschaften besitzt [137]. Durch die unterschiedliche Oberflächenstruktur der AOX und XDH konnten die beiden Enzyme mittels HA voneinander getrennt werden, diese Trennung wurde von Maia et al. zuvor beschrieben [91]. Um sicherzustellen, dass auch kleinere Hämproteine entfernt wurden, wurden die entsprechenden, in der nativen PAGE Aktivität zeigenden Fraktionen mittels einer analytischen Gelfiltration weiter gereinigt. Hierdurch konnten noch enthaltene Hämproteine auf Grund ihres geringeren Molekulargewichtes abgetrennt werden. Wurde keine Hydroxylapatitchromatografie vor der Gelchromatografie durchgeführt, wurden in diesem Schritt ebenfalls noch enthaltene Substrate oder Produkte (z.B. Xanthin oder Harnsäure) entfernt.

Für die Messungen der XOR Aktivität von Proben aus Tierversuchen mit großer n-Zahl wurde XOR aus Rattenleber in den Reinheitsstufen 1-3a gereinigt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Zu Bestimmung der $O_2^{-\bullet}$ Bildung der Isoformen XO und XDH von XOR aus unterschiedlichen Organismen wurde die Stufe 3b verwendet. Hier kam es auf möglichst sauberes XOR-Protein und eine Abtrennung der AOX von der XOR an, der Zeitfaktor der Reinigung spielte keine Rolle.

4.1.6 Messungen in Gewebe

Es wurden sowohl von 9 tumorkranken als auch von 9 gesunden Ratten die Lebern entnommen und in den Reinheitsstufen 1, 2 und 3a aufgearbeitet. Die Aktivtät wurde mittels der Spintrap-Methode per EPR gemessen und die erhaltenen Aktivitäten verglichen. Hierbei konnte mit der Spearman´schen Rangkorrelation bewiesen werden, dass eine gute Korrelation der Messergebnisse zwischen den Reinheitsstufen 2 und 3a vorhanden ist. Keine Korrelation konnte für die Messungen mit Gewebe der Reinheitsstufe 1 und 3a, bzw 1 und 2 gefunden werden.

Die gefundenen Korrelationen zeigen eine zwingende Notwendigkeit zur Aufreinigung bis zur Reinheitsstufe 2 mit den angewandten Methoden des Hitzeschrittes und der Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Reinigung über eine Sephadex Säule. Die Auswirkungen der im vorherigen Kapitel beschriebenen Verunreinigungen durch Hämproteine sind zu vernachlässigen, das sie in jeder Probe vorliegen und Probengruppen miteineinander verglichen werden sollen. Somit konnte eine Methode zur schnellen und einfachen Reinigung der XOR aus

Rattenleberproben gefunden werden, mit der die Bildung von Sauerstoffradikalen mittels EPR bestimmt werden kann. Im Gegensatz zu den Messungen mit Gewebe der Reinheitsstufe 1 treten in dieser Reinheitsstufe keine Verfälschungen der Ergebnisse durch Edukte, Produkte oder Enzyme des antioxidativen Systemes auf, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben. Von Spiekermann et al. wurde eine ähnliche Reinheitsstufe zur Bestimmung der XOR Aktivität in Aorta-Gewebe benutzt [92]. Bei diesen Ergebnissen kann nicht davon ausgegangen werden, nur die Aktivität der XOR mittels der Spintrapping-Experimente bestimmt zu haben, da keine Abtrennung von anitoxidativen Enzymen oder ROS-produzierender Enzyme erfolgte. Auch Marti et al. nutzen eine ähnliche Reinheitsstufe im Vergleich zu der hier beschriebenen Reinheitsstufe 1 [138]. Die Aktivität der XOR wurde per UV/VIS Spektroskopie bestimmt. Jedoch muß auch hier davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Bestimmung der XOR Formen durch noch vorliegende Edukte, Produkte und weiterer Enzyme einen hohen Fehlergrad aufweisen. Im Gegensatz dazu wurde von Maia et al. hochaufgereinigte XOR aus Rattenlebergewebe auf die XOR-Aktivität hin untersucht [91,102]. Durch die Kombination einer Vielzahl von chromatografischer Reinigungsschritten wurde hier zwar hochaufgereinigte XOR erhalten, jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch zum Vergleich von Aktivitäten von XOR-Proben aus unterschiedlichen Geweben eine Abtrennung von verbleibenden Häm-Proteinen in der Reinheitsstufe 2 nicht notwendig ist. Die von Maia et al. entwickelte Methode war für die Aktivitätsbestimmungen von Proben aus Tierversuchen nicht die optimale Methode, da die angewandten Reinigungsschritte keine Aufarbeitung von sehr vielen Proben in einer kurzen Zeitspanne ermöglichten.

Mit den in Kapitel 3.1.5 beschriebenene Versuchen ließ sich zeigen, dass in der Rattenleber die höchste Aktivität im Vergleich zu Rattenlunge und Rattenmuskel isolierter XOR gefunden werden konnte (siehe Abbildung 26). Auch Park et al. weisen in ihren Versuchen eine sehr hohe Aktivität der XOR in der Leber nach [11]. Ebenso beschreiben Sarnesto et al. eine sehr hohe Konzentration von XOR in der humanen Leber, jedoch ist die gemessene Konzentration im Dünndarm höher [139].

Die in Kapitel 4.1.5 durchgeführten Versuche zur Trennung von AOX und XOR mittels der eingesetzen Substrate wurde für Gewebeproben der Reinheitsstufe 2 wiederholt. Da diese Probe nicht mit Hydroxylapaptit-Chromatografie gereinigt wurde, liegen die Enzyme AOX und XOR beide in der Probe vor. Dieses wurde durch native PAGE bestätigt. Die Addition der Einzelmessungen mit je einem Substrat ergab leicht

höhere Werte als die Messungen mit dem Substratgemisch (siehe Abbildung 27). Möglichweise wird ebenso durch die Bildung von mehr Radikalen durch zwei Substrate eine Produktinhibition erreicht. Auch hier konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass das Vorliegen der AOX in Gewebeproben die Ermittlung der XOR-Aktivität nicht verfälscht. Eine aufwendige Trennung wie von Maia et al. [91] und Kundu et al. [131] beschrieben der Enzyme AOX und XOR ist zur Bestimmung der XOR-Aktivität nicht notwendig.

4.2 Untersuchungen der Elektronenakzeptoren der Isoformen XO und XDH von unterschiedlichen Organismen

In der Literatur wird die Bildung von $O_2^{-\bullet}$ durch die beiden Isoformen der XOR kontrovers diskutiert. Die eukaryotische XOR liegt *in vivo* als XDH-Form und wird durch Konformationsänderungen in die XO-Form umgewandelt [21]. In einer Mehrzahl der Veröffentlichungen wird eine größere Produktion von $O_2^{-\bullet}$ durch die XDH-Form pro Mol O_2 beschrieben [26, 35]. Diese beziehen sich jedoch ausschließlich auf die Bezugsgröße $O_2^{-\bullet}$/Mol O_2. Auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der XO-Form und der XDH-Form mit Sauerstoff wird jedoch ebenso von einer höheren Konzentration an gebildeten $O_2^{-\bullet}$ durch die XO-Form in Bezug auf die Zeit berichtet [26, 131]. Um eine Untersuchung der gebildeten $O_2^{-\bullet}$ in Bezug auf die Zeit der beiden Isoformen durchzuführen, wurde XOR aus Leberproben der Ratte, des Huhn und des Rindes bis zur Reinheitsstufe 3b gereinigt. Nach der Reinigung liegt die XOR aus den Organismen der Ratte und des Rindes als umwandelbare XO-Form vor [19,24]. Dieses konnte durch die Ermittlung des Dehydrogenase/Oxidase Verhältnisses bestätigt werden.

XO aus Kuhmilch (bXO)

Um die $O_2^{-\bullet}$ Bildung einer reinen Oxidase mit den Elektronenakzeptoren NAD und O_2 zu bestimmen, wurde XO aus der Kuhmilch (bXO) benutzt. Eine Veränderung des Dehydrogenase/Oxidase Verhältnisses konnte durch eine DTT-Behandlung nicht erreicht werden (siehe Tabelle 2). Wie erwartet, war die Bildung von $O_2^{-\bullet}$ von der isolierten und mit DTT behandelten bXO mit O_2 als Elektronenakzeptor gleich, da eine Umwandlung der bXO in bXDH bei einer Reinigung ohne DTT Zusatz nicht möglich ist (siehe Abbildung 37) [140]. Ebenso war die Menge an gebildeten $O_2^{-\bullet}$ mit dem Elektronenakzeptor NAD vergleichbar, da bXO keine Bindungsstelle für NAD

aufweist [26,35]. Die Elektronen werden vom FAD auf molekularen Sauerstoff übertragen. Es wird diskutiert, ob die Elektronenübertragung auf NAD aus konformellen Gründen oder auf Grund des veränderten Redoxpotentials des FAD nicht möglich ist. Die Umwandlung der bXO-Form geht mit einer Erniedrigung des mittleren Redoxpotentials des FAD um rund 180 mV auf –255 mV einher [6]. Somit ist eine Reduktion des NAD nicht möglich, da das Redoxpotential des NAD/NADH-Paares -335mV beträgt [6]. Jedoch zeigten Untersuchungen von Harris et al., dass auch bei Benutzung von NAD-Analogen mit einem höheren Redoxotential keine Elektronenübertragung erfolgt [141]. Die Fähigkeit Elektronen auf Pyridin-Nucleotide zu übertragen ist auf Grund der Konformation gegeben und unabhängig vom Redoxpotentials des FADs.

XOR aus Rinder- und Rattenleber

Ein Vergleich der $O_2^{-\bullet}$ Bildung von aus Rinderleber isolierter XOR mit XO aus der Kuhmilch ergab einen geringeren Gehalt an gebildeten $O_2^{-\bullet}$ mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor sowohl von der isolierten als auch mit DTT reduzierten Fraktion (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39). XOR aus der Rinder- und Rattenleber liegt in einer frischen Probe als XDH-Form vor, jedoch erfolgt eine Umwandlung zur XO Form während der Reinigungsprozedur [19,24]. Während der Umwandlung verändert der variable Loop seine Konformation, daraus resultiert eine Änderung der elektrostatischen Umgebung des FADs [3]. Die XDH-Form wird hierbei durch ausgebildete Salzbrücken des Loops mit dem Proteinrückgrat, die XO-Form durch Wechselwirkung mit dem wässrigen Lösungsmittel stabilisiert [3]. In Abbildung 49 ist die Folge der Loopverschiebung grafisch dargestellt. Es ist keine Bindungstasche des NADs am FAD vorhanden und nur O_2 kann durch einen Tunnel zum FAD vordringen.

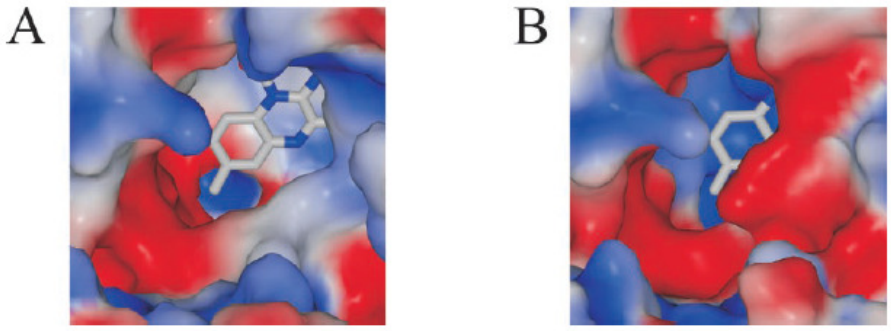


Abbildung 49: Darstellung der Bindungsregion des FADs. In Teil A ist die Bindungstasche der XDH des NAD-Molekül zu erkennen, in Teil B die durch die Verschiebung des Loops ausgelöste konformationelle Änderung der Bindungstasche mit dem Tunnel für das kleiner O_2-Molekül. Das FAD-Molekül ist als capped-cylinders dargestellt, elektronegative Regionen in blau, elektropositive Regionen des Enzyms in rot [modifiziert nach 3].

Eine Umwandlung der XDH zur XO-Form kann nach Nishino[23] und Waud [25] eine bis zu 10fache Steigerung der Oxidase-Aktivität beinhalten. Von Maia et al. wurde eine Absenkung der Oxidase-Aktivität um 80% durch DTT Behandlung beschrieben [91]. In dieser Arbeit wurde nur eine Verringerung der $O_2^{-\bullet}$-Produktion über die Zeit von ~ 50% bei Proben der Rinderleber und ~ 60% bei Proben der Rattenleber erhalten. Wurde der Elektronenakzeptor NAD hinzugegeben, sank der Gehalt an produzierten $O_2^{-\bullet}$ bei den Proben der Rattenleber um 51% in der isolierten Form. Durch die Umwandlung des Enzyms durch DTT konnte der Gehalt der XDH-Form erhöht werden, die $O_2^{-\bullet}$ Produktion sank mit NAD als Elektronenakzeptor um 64%. Bei den Proben der Rinderleber konnten auf Grund des hohen Messfehlers keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Bei allen Bestimmungen der Aktivitäten wurden Leberteile unterschiedlicher Tiere verwandt. Dies führte auf Grund der hohen natürlichen Schwankung der XOR-Aktivität zu einem hohen Fehler, der jedoch nicht auf der Methodik sondern auf der Individualität der Tiere begründet war. Diese Ergebnisse zeigen, dass auf das Bezugssystem der Zeit mehr $O_2^{-\bullet}$durch die XO-Form der XOR gebildet werden als durch die XDH-Form. Zwar liegt das Semiquinon in der XDH-Form stabilisiert vor (siehe Kapitel 1.1) [145], jedoch führen Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten der Reaktionen der Isoformen zu einer höheren Bildung von Superoxid-Anionen durch die XO.

Untersuchungen der XDH aus der Hühnerleber und *R. capsulatus*

Die Messungen mit dem Substrat Xanthin und den Elektronenakzeptoren O_2 und NAD wurden mit cXDH und RcXDH wiederholt. Sowohl cXDH als RcXDH zeigten eine stark abgesunkene Bildung von $O_2^{-\bullet}$, wenn NAD als Elektronenakzeptor vorlag (siehe Abbildung 40). Eine Reduktion mit DTT führte zu keiner Verminderung der $O_2^{-\bullet}$ Bildung im Vergleich zur isolierten Form, unabhängig davon, ob O_2 oder NAD als Elektronenakzeptoren vorlagen. Ebenso wie in der cXDH ist bei der RcXDH keine Umwandlung in die XO-Form möglich [30]. Bei der RcXDH liegen Veränderungen in der Aminosäuresequenz vor. Cystein 535 ist durch eine Prolin in der Untereinheit A und das korrespondierende Cystein 992 gegen eine Leupeptin 421 in der Untereinheit B ersetzt. Durch veränderte Zusammensetzung der Untereinheiten werden keine Linkerpeptide ausgebildet [55]. Trotz der thermodynamisch besseren Stabilisierung des FAD-Semiquinons [56] und des 18% höheren Elektronenflusses auf O_2 bei der XDH-Form [142] sinkt die Menge an produzierten $O_2^{-\bullet}$ um über 50% ab, lag der Elektronenakzeptor NAD zusätzlich zum gelösten Sauerstoff vor. Schon Linder et al. zeigten eine stark verminderte O_2 Bindung an den FAD Kofaktor, wenn NAD in der Probe vorhanden ist [17]. Zusätzlich führt eine Bindung von NAD an den FAD Kofaktor zu einer Veränderung des Redoxpotentiales von FADH/$FADH_2$ zu einem höheren Potenzial. Hierdurch ist das Flavin instabiler und kann mit NAD in einem 2-Elektronenprozeß reagieren [35]. Interessanterweise erhöhte sich die Bildung der $O_2^{-\bullet}$ um 15-17% nach der Behandlung mit DTT, was möglichweise auf die Stabilisierung des Enzyms durch die reduzierenden Bedingungen zurückzuführen ist. In der RcXDH ist das Redoxpotenzial des FAD-Semiquinons ist negativer (-484 mV) als in der cXDH (-410 mV) [6], so dass die Reaktion der RcXDH schneller als die der cXDH verläuft.

Untersuchungen zum Elektronenfluß am FAD

Der Elektronfluß vom FAD auf Substrate wurde durch Messungen von *deflavo*-Preperationen des Enzyms und mit dem Substrat NADH weiter untersucht. *Deflavo*-XOR wurde von der XO aus der Kuhmilch und der XDH aus der Hühnerleber dargestellt [95] und enthielten 23% (bXO) bzw kein FAD nach HPLC-Analyse. Die Darstellung von *deflavo*-RcXDH gelang nicht. Erwartungsgemäß sank in beiden Proben die Bildung von $O_2^{-\bullet}$ ab (siehe Abbildung 42 und Abbildung 43). Dies bestätigt die Annahme eines Elektronentransfers ausgehend von FAD auf O_2 [91].

Interessanterweise verminderte sich die Bildung von $O_2^{-\bullet}$ in den Proben der cXDH nur um 60%. Hier ist sowohl eine Elektronenübertragung durch mögliche Verunreinigungen oder eine von Olson et al. beschriebener Elektronentransfer unabhängig von der Konzentration von FAD im Verhältnis zur Proteinkonzentration [43] als Begründung zu sehen.

Nach Hille et al. besitzt die XDH eine Fähigkeit zur Oxidation von NADH mit gleichzeitiger Reduktion des Enzyms [45]. Hierbei dient NAD als Elektronenakzeptor der Oxidation des Xanthins wohingegen NADH unter Elektronenabgabe auf das Enzym reduziert wird [143]. Die Elektronenübertragung von NADH auf die XO-Form findet nur in sehr geringen Raten statt [91]. Hierbei spielen Veränderungen an der Moco-Bindungsstelle keine Rolle [144]. Untersuchungen der bXO, *deflavo*-bXO, cXDH, *deflavo*-cXDH und RcXDH zeigten eine deutliche Bildung von $O_2^{-\bullet}$ der XDH-Formen. Die Menge an gebildeten $O_2^{-\bullet}$ war bei der RcXDH um den Faktor 2 höher als mit Xanthin als Substrat. cXDH zeigte eine 50% Bildung von $O_2^{-\bullet}$ im Vergleich zu Xanthin als reduzierendes Substrat. Auf Grund der unterschiedlichen Redoxpotentiale der beiden Dehydrogenasen ist es möglich, dass durch die größere Potenzialdifferenz der RcXDH eine schnellere Reaktion erfolgt, die in der Zeit zu einer größeren Menge an gebildeten Superoxid-Anionen führt. Da in der Literatur die Abdissoziation des Substrates vom FAD als geschwindikeitslimitierender Schritt dargestellt wird, kann von einer schnellen Elektronenübertragung ausgegangen werden [145].

bXO wies nur eine 18% Menge von gebildeten $O_2^{-\bullet}$ im Vergleich zu dem Substrat Xanthin auf. Nur bei der XDH-Form liegt eine Bindungsstelle für NAD(H) vor, dies führt zu einer Bildung von $O_2^{-\bullet}$ mit NADH als reduzierendem Substrat. Ein Vergleich der $O_2^{-\bullet}$ Bildung von NADH und Xanthin als Substrate zeigt auf, dass NADH besser durch die XDH-Form von NADH reduziert wird.

Modell des Elektronenflußes durch die XO und die XDH-Form

Die XDH-Form eukaryotischer und bakterieller XOR-Proteine weist eine Bindungsstelle für NAD und für O_2 auf. Die Elektronenübertragung findet jedoch bevorzugt auf NAD statt (Abbildung 50). Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten einen verstärkten Elektronenfluß auf NAD bei gleichzeitigem Vorliegen von O_2. Dieses wurde auch von Saito et al. veröffentlicht [35].

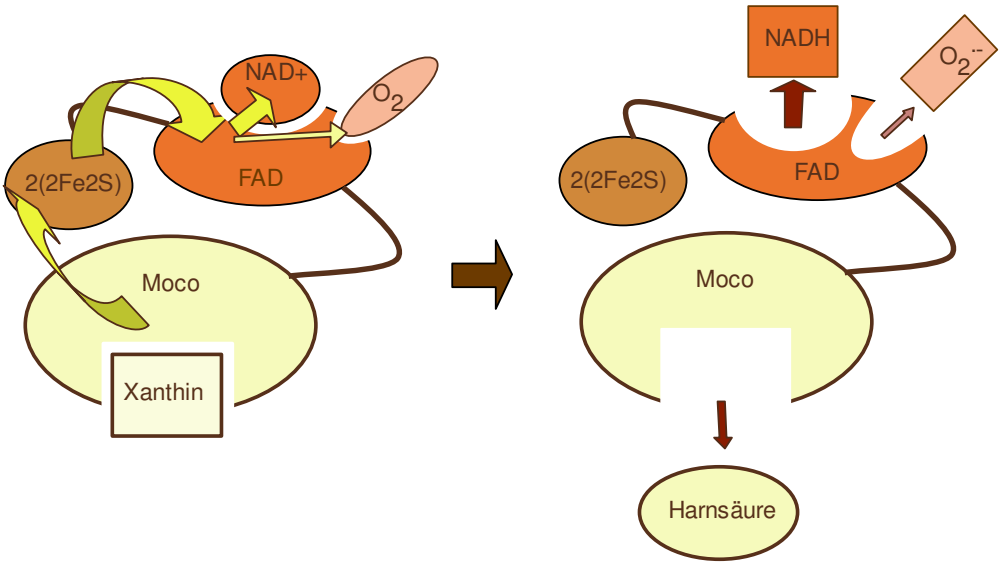


Abbildung 50: Darstellung des Elektronenflußes in der XDH-Form. In der links zu sehenden Darstellung liegen sowohl Elektronendonator (Xanthin) als auch der Elektronenakzeptor (NAD, bzw O_2) gebunden vor, der Elektronenfluß ist in gelben Pfeilen dargestellt. In der rechten Darstellung sind die Produkte abdissoziiert.

Jedoch wird von Saito et al. eine höhere Produktion von $O_2^{-\bullet}$ /mol O_2 durch die XDH-Form als durch die XO-Form beschrieben. In dieser Arbeit wurde als Bezugsgröße nicht Mol O_2 sondern die Zeitachse gewählt und eine höhere Bildung von $O_2^{-\bullet}$ durch die XO-Form bestimmt. In

Abbildung 51 ist jedoch zu erkennen, dass der Elektronenfluß in der XO-Form ausschließlich auf O_2 verläuft, da keine Bindungsstelle für NAD zur Verfügung steht. Da die Reaktionsgeschwindigkeiten für O_2 mit der XO-Form höher ist als für die XDH-Form, ist die Produktion von $O_2^{-\bullet}$ über die Zeit in der XO-Form höher [26,131].

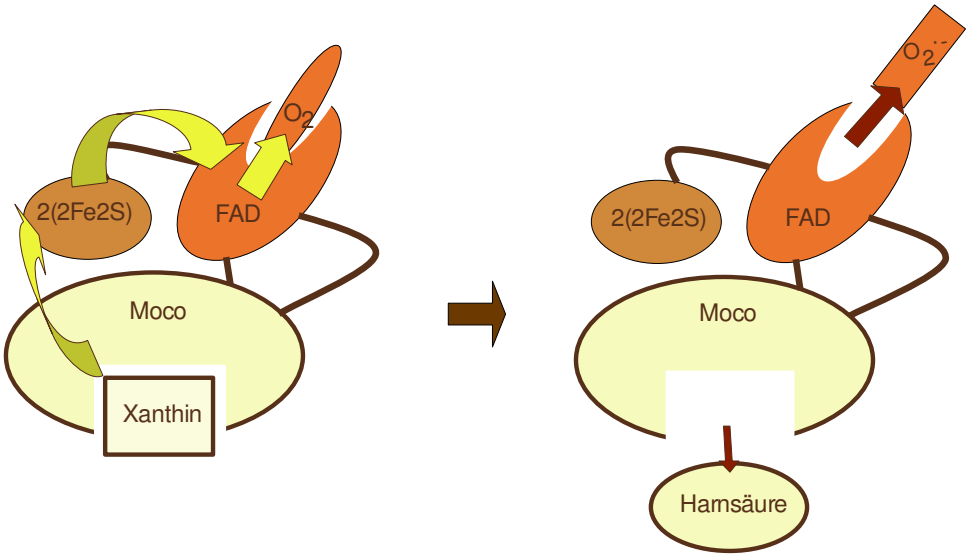


Abbildung 51: Darstellung des Elektronenflußes in der XO-Form. In der links zu sehenden Darstellung liegen sowohl Elektronendonator (Xanthin) als auch der Elektronenakzeptor (NAD, bzw O2) gebunden vor, der Elektronenfluß ist in gelben Pfeilen dargestellt. In der rechten Darstellung sind die Produkte abdissoziiert.

Durch die Stabilisierung der Semiquinon-Form des FAD in der XDH-Form können jedoch auch durch den Metabolismus der XDH $O_2^{-\bullet}$ entstehen [143]. Dieses wurde an gereinigten Proteinen in dieser Arbeit auch gezeigt. *In vivo* spielt die Bildung von $O_2^{-\bullet}$ durch die XDH vermutlich eine geringere Rolle, da durch das Vorliegen von NAD die Bindungsstelle von NAD blockiert wird und keine Elektronenübertragung auf O_2 stattfindet [17].

Vergleich der EPR-Spintrap-Methode mit der etablierten Cytochrom-C-Methodik

Um die Messergebnisse der neuen Spintrap-Methode mit einer etablierten Methode zu vergleichen, wurde ein Teil der Messungen mit dem Reduktionsverfahren von Cytochrom C wiederholt. Oxidiertes Cytocherom C reagiert mit den produzierten $O_2^{-\bullet}$ zu reduziertem Cytochrom C mit gleichzeitiger Änderung der Absorption bei 550 nm [146]. Jedoch musste festgestellt werden, dass die Ergebnisse nur zum Teil korrelieren (siehe Abbildung 41). Liegt die XOR auf der Seite der XO-Form, sind mit der Cytochrom-C Methodik mit Ausnahme der rXOR höheren Werte bestimmt worden. Die reinen Dehydrogenase wiesen ähnliche, bzw leicht niedrigere Werte auf. Cytochrom C kann durch $O_2^{-\bullet}$, Hydroxylradikale oder NO reduziert werden [147], eine Oxidation ist möglich durch die Spezies H_2O_2 und $ONOO^{*-}$ [148]. Zwar ist die

Reaktion von Cytochrom C mit $O_2^{-\bullet}$ schneller als die spontane Dismutation [149], jedoch ist eine schwache Bindung von Cytochrom C an die XDH mit direktem Elektronentransfer auf das Enzym möglich [51]. Auf Grund dieser vielfältigen Fehlerquellen wurde in dieser Arbeit auf das Spintrapping System mit EPR zurückgegriffen und der Spintrap CPH ausgewählt. Mittels EPR können freie Radikale in geringester Konzentration direkt sichtbar gemacht werden [150,151] und insbesondere die Spintrapping Technik ermöglicht eine Detektion von schwachen Signalen [131, 152]. In der Spintrapping Technik reagiert eine chemische Verbindung („Spin-Trap“) mit einem instabilen freien Radikal kovalent unter Ausbildung eines stabilen Radikals [153]. Meist werden Nitrone oder Nitroso-Verbindungen benutzt mit Ausbildung eines Nitroxids [154]. Ein häufig benutzter Spin-Trap ist DMPO, jedoch weist er eine geringe Effektivität auf [155] und das gebildete Produkt bei gleichem Vorliegen von reduzierenden Stoffen nicht stabil [156]. Daher wird in dieser Arbeit auf das cyclische Hydroxylamin CPH zurückgegriffen. CPH wird als effektiver Radikalfänger beschrieben [157,158] und weist eine 100mal schnellere Reaktion mit $O_2^{-\bullet}$ auf als DMPO [159]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Menge an gebildeten $O_2^{-\bullet}$ gleich der Menge des detektierten Spin-Traps ist [159].

4.3 Untersuchungen des Elektronenflußes durch das Enzym anhand von EPR Spektren an dem WT der RcXDH und Varianten

Um den Elektronenfluß von der Moco-Seite bis zum FAD entlang der [2Fe2S]-Cluster genauer zu untersuchen, wurden EPR-Spektren der RcXDH aufgenommen. Zuvor veröffentlichte Arbeiten an anderen Organismen mit Varianten der ligandierenden Cysteine der [2Fe2S]-Cluster zeigten, dass das Fe1 in beiden [2Fe2S]-Clustern reduzierbar ist und durch die Mutationen Veränderungen der elektronischen Eigenschaften der FeSI und FeSII Cluster hervorgerufen werden [163,164]. Nach der Reduktion des Moco werden die Elektronen zum FAD transportiert, um die katalytische Aktivität wieder herzustellen. Unklar ist hierbei, ob beide oder wenn nur ein Cluster welches für den Elektronentransport durch das Protein hindurch notwendig sind. Nishino et al. postulierten nach Röntgenstrukturanalyse einen Elektronenfluß ausgehend vom Mo zu FeSI zu FeSII zum FAD [160].

Durch die EPR Spektren kann die räumliche Struktur der FeS-Cluster untersucht werden, da Veränderungen der Resonanzpositionen und der Symmetrie

Rückschlüsse auf die Konformation des Enzyms zulassen. Benutzt wurden neben des WT der RcXDH Varianten der ligandierenden Cystein Aminosäuren der [2Fe2S]-Cluster. Die Spektren des WT enthielten Signale zweier charakteristischer [2Fe2S]-Cluster (FeSI und FeSII) (siehe

Abbildung 44) [161]. Hierbei ähnelten die Eigenschaften des FeSI sehr denen von anderen Proteinen, die ein [Fe_2S_2] Cluster enthalten, wie auch den [2Fe2S] von Ferrodoxinen, die aus Pflanzen isoliert werden können [162]. Das Signal konnte oberhalb von 40K detektiert werden mit einem mittleren g-Wert von ~1,95. Die EPR Eigenschaften des FeSII sind hiervon jedoch sehr unterschiedlich. So konnten die Signale erst bei sehr niedrigen Temperaturen von < 20K erhalten werden und wiesen eine ungewöhnlich hohe Linienbreite mit einem durchschnittlichen g-Wert von 2,0 auf. EPR Signale anderer XOR zeigen eine eher axiale Symmetrie des FeSI im Vergleich zur rhombischen Symmetrie eukaryotischer XOR, der durchschnittliche g-Wert zeigt jedoch kaum Unterschiede (rXO: g_{av} = 1,95). Im Gegensatz dazu wiesen die EPR Signale des FeSII zwar die gleiche Symmetrie auf, jedoch veränderte sich die Lage des durchschnittlichen g-Wertes von 1,980 der RcXDH zu 2,001 der rXO [163].

Die Varianten der RcXDH wurden sowohl in ihren EPR-Eigenschaften als auch in ihrer Aktivität verglichen. Die Aktivität wurde per EPR-Spintrapping Methode anhand der produzierten Sauerstoffradikale ermittelt (siehe Tabelle 8)Tabelle 8: Bestimmung der Superoxid-Anionbildung der RcXDH-Varianten mit der Spintrap-Methode. In Abbildung 52 sind die Kofaktoren der RcXDH in einem schematischen Modell abgebildet. Die Cysteine 136, 134, 106 und 103 ligandieren das FeSI, die Cysteine 63, 47, 44 und 39 das FeSII. Durch Austausch eines jedens Cysteins gegen ein Serin wurde die Stabilität des Clusters ohne den jeweiligen Cystein-Liganden untersucht. Diese Ergebnisse wurde ebenso mit den von Kappl et al. [163] und Iwasaki et al. [164] erhaltenen EPR Eigenschaften der XOR von Quinaldin-4-Oxidase (Qox) und der rXOR verglichen.

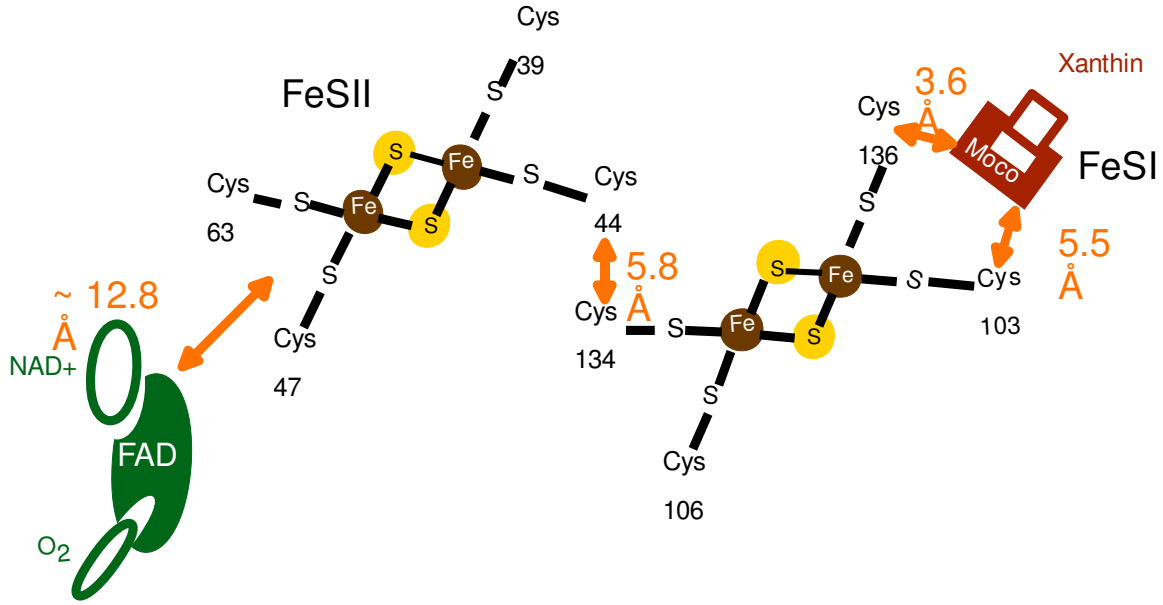


Abbildung 52: Schematisches Modell der Kofaktoren der RcXDH mit den Cystein-Liganden der Eisen-Schwefel-Cluster und den Kofaktoren. In rot dargestellt ist der Moco in grün FAD.

4.3.1 Untersuchungen am Redoxsystem FeSI

Die Cysteinliganden des FeSI befinden sich an der Moco zugewandten Seite (siehe Abbildung 52). Variationen an diesem FeSI-Center beeinträchtigen die Stabilität und Konformation der RcXDH stark. Die Variante C134S konnten in einer dimeren Form (Assemblierung einer α- und β-Untereinheit) und einer tetrameren Form mittels analytischer Gelfiltration gereinigt werden. Das Vorliegen zweier Formen deutet auf eine Änderung der Konformation hin, durch die eine Assemblierung der Untereinheiten schwieriger möglich ist. Per EPR wurden die Verhältnisse der FeSI und FeSII Cluster bestimmt (siehe

Abbildung 45). Bei der Variante C134S (αβ-Dimer) lag das Verhältnis der beiden Cluster sehr stark auf der Seite des FeSII (0,05:1). Korrelierend hierzu wurde ein sehr geringer Eisengehalt analysiert. Die als Tetramer ($(\alpha\beta)_2$-Tetramer) assemblierte Variante zeigte hingegen sowohl einen höheren Gesamteisengehalt als auch ein größeres Verhältnis (0,5:1) der FeSI/FeSII Cluster. Ebenso konnte eine höhere Aktivität gemessen werden, die mit 20% der Wildtypaktivität angegeben werden konnte. In beiden Formen lag das FeSI-Cluster jedoch nicht mehr in einer axialer, sondern in einer rhombischen Symmetrie vor. Von der Variante C136S konnten keine Signale der zwei [2Fe2S]-Cluster erhalten werden. Für beide Varianten sank die Aktivität mit NAD und O_2 als Elektronenakzeptor stark ab. Die beiden Varianten

C106S und C103S fielen während der Reinigung aus und konnten daher nicht weiter charakterisiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen den stabilisierenden Effekt der Cysteinliganden für die Konformation des FeSI. Auch Kappl et al. und Iwasaki et al. beschrieben einen stabilsierenden Effekt der Cysteinliganden des FeSI für die Struktur und Aktivität der XOR [163,164]. Jedoch konnten bei dem Qox-Enzym die Varianten 117 und 152 (entspricht den Positionen 103 und 134 der RcXDH) nicht gereinigt werden. Auch Iwasaki et al. gelang die Reinigung der Variante 112 der XOR der Ratte (entspricht 103 der RcXDH) nicht [163]. Hingegen war eine Reinigung der Variante der Ratte C120 (entspricht C106 der RcXDH) möglich. Die EPR-Spektren wiesen eine sehr hohe Linienbreite des FeSII auf und unterschiedliche Wechselwirkungen zum FeSI. Dies weist auf eine veränderte Struktur des FeSI hin. Stark veränderte EPR-Eigenschaften zeigte auch die Variante C154 der XOR der Ratte (entspricht C136 der RcXDH) [163].

Zusätzlich zu diesen Messungen wurde die Variante C134A/C136A untersucht (siehe Abbildung 45). So sank der Gesamteisengehalt auf 62% mit einem Verhältnis der FeSI/FeSII Cluster von 0,02:1. Die EPR-Signale des FeSII wiesen stärkere rhombische Eigenschaften als die Variante C134S auf. Die Ahnlichkeit der EPR-Eigenschaften der Zweifachvariante mit der als Dimer- gereinigten C134S Variante lässt vermuten, dass auch die Zweifachvariante als Dimer vorliegt. Der Vergleich der Aktivitätsbestimmungen mit den Elektronenakzeptoren O_2 und NAD zeigte bis auf die als Tetramer gereinigte C134S-Variante eine gleiche, zum Teil auch höhere, Superoxid-Bildung mit NAD als Akzeptor (siehe Tabelle 8). Dies ist möglichweise auf das Vorliegen der Varianten als Dimer zurückzuführen, wodurch eine Elektronenübertragung auf NAD nicht mehr möglich ist. Sowohl die EPR-Experimente als auch die Quantifizierung des Gesamteisengehaltes und die Aktivitätsbestimmung bestätigten die Annahme der sehr wichtigen Ligandierung durch Cystein-Liganden des FeSI-Clusters.

4.3.2 Untersuchungen am Redoxsystem FeSII

Ebenso wurden die Varianten C63S, C47S, C44S und C39S untersucht. Alle vier Varianten zeigten eine genügend hohe Stabilität zur Reinigung und Charakterisierung auf. Die Veränderungen der Cysteinliganden des FeSII führten zwar zu einer sinkenden Aktivität (siehe Tabelle 8), jedoch waren in allen Varianten die einzelnen Cluster nachweisbar.

Sehr ähnliche EPR-Eigenschaften wiesen die Varianten C63S, C44S und C39S auf (siehe Abbildung 46). Es zeigte sich bei allen Varianten eine rhombische Symmetrie beider Zentren, wobei die rhombische Symmetrie des FeSII im Vergleich zum WT deutlich zunahm. Auf eine veränderte Struktur im Vergleich zum WT deutet das ≥ 1 Verhältnis der FeSI/FeSII-Cluster hin. Stärkere Modifikationen der Variante C39S wurden von Kappl et al. unter Verwendung der entsprechenden Qox-Variante gezeigt. Hier konnten keine Signale des FeSII-Clusters detektiert werden. Vergleichende Ergebnisse zur RcXDH mit einer geringen Modifikation des FeSII wurden mit der entsprechenden Variante der XOR der Ratte (C43) gezeigt. Ebenfalls stärkere Veränderungen der EPR-Eigenschaften der Variante C44S wurden mit der entsprechenden C45 Variante der Qox erhalten. Dieser Ligand befindet sich nur in 5,8 A Entfernung zum ersten Liganden des FeSI-Clusters und C45 weist zugleich eine Zerstörung des FeSI-Signals auf. Diese starken Änderungen konnten in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Korrelierend zu einem FeSI/FeSII Verhältnis von 1:0,5 wies die Variante C63S einen sehr geringen Gesamteisengehalt von 66% auf. Experimente an der entsprechenden Variante der Qox (C60) zeigen ebenfalls ein Vorliegen beider Cluster, jedoch betrug das Verhältnis beider Cluster 0,58:0,42 und war somit ähnlich [164]. C63 scheint somit nicht nur als Ligand des FeSII-Clusters wichtig zu sein, sondern ist auch notwendig für den Einbau des FeSII-Clusters. Die in nächster räumlicher Nähe zum FAD-Kofaktor vorliegende Variante C47S wies eine stark rhombischie Symmetrie beider Cluster bei einer zugleich schmaleren Linienbreite auf. Besonders das FeSII-Cluster zeigte sehr stark veränderte g-Werte, die auf eine veränderte Bindungsgeometrie hindeuten. Obwohl der Gesamteisengehalt und das Clusterverhältnis gleich dem WT waren, zeigte sich eine 90% erniedrigte Aktivität mit beiden Elektronenakzeptoren.

4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Elektronentransportkette von der Moco-Seite zum FAD-Kofaktor

In dieser Arbeit wurde der Elektronentransport zwischen den aktiven Seiten der RcXDH, der Substratbindungsseite am Moco bis zur Reduktion des Elektronenakzeptors am FAD-Kofaktor betrachtet. Ausgehend vom Moco werden die Elektronen über die [2Fe2S]-Cluster zum FAD transportiert. Hierbei werden die Cysteinliganden der zwei [2Fe2S]-Cluster über Wasserstoffbrückenbindungen zum Proteinrückgrat stabilisiert [55]. Die Entfernung des FeSI-Clusters zum

Molybdänatom beträgt 14,6A, jedoch ist das Sγ-Atom des Cys136 nur 3,6A vom Molybdän entfernt (siehe Abbildung 52). Die durchschnittliche Entfernung der paramagnetischen Zentren beträgt 14A [3], wobei ein Fe des FeSII nur 7,8Å vom 7α-Methylatom des FADs entfernt ist. Die EPR-Daten deuten zusammen mit den Aktivitätsbestimmungen darauf hin, dass beide Cluster am Elektronentransport beteiligt sind. Anhand der Experimente lässt sich keines der je zwei Eisenatome vom Elektronentransport ausschließen. Obwohl das FeSI-Cluster einen höheren Einfluß auf die Stabilität der Konformation hat, wirken sich auch Veränderungen im FeSII-Cluster durch eine deutliche Erniedrigung der Aktvität aus. Durch Veränderungen der Liganden des Clusters lagen diese nicht mehr so stabil vor oder in anderen Konformationen. Interessanterweise sind die Kofaktoren der RcXDH nicht in der Reihenfolge vom höchsten zum niedrigsten Redoxpotential angeordnet, wie es in der bXO der Fall ist [165,166]. Auch Iwasaki et al. beobachtete den Einfluss des FeSI-Clusters auf die Stabilität des Enzyms. So konnte die Variante C115 der rXOR (entspricht C106 der RcXDH) nicht erhalten werden, dies entspricht den hier dargestellten Ergebnissen. Jedoch konnte eine Variante der rXOR an der Stelle C112 (entspricht C103 der RcXDH) erhalten, eine Reinigung der entsprechenden RcXDH-Variante C103 war nicht möglich. Auch Kappl et al. stellten einen wichtigen Effekt des FeSI-Clusters für die Stabilität des Proteins fest. Hier konnte wie bei der RcXDH die Variante C117 (entspricht C103 der RcXDH) nicht erhalten werden. Weiterhin war eine Reinigung der Variante C152 (entspricht C134 der RcXDH) nicht möglich. Beide Autoren beschreiben ebenso den wichtigen Effekt des FeSII-Clusters auf die Aktivität des Enzyms. Modifizierungen des FeSII führten in allen drei Organismen zu einer starken Heterogenität des FeSII-Signals. Es kann somit von einer Konformationsänderung des Proteins ausgegangen werden.Insbesondere eine Modifizierung der Cysteine, die in nächster Nähe zu dem FeSI-Cluster (rXOR C48, Qox C45, RcXDH C44) und dem FAD lagen (rXOR C51, Qox C48, RcXDH C47) führten zu starken Veränderungen der Signale und einem Absinken der Aktivität des Enzyms, dies deutet auf einen erschwerten Elektronentransport durch das Protein hin. Unterschiedliche Wege des Elektronentransportes werden postuliert. Da sich der FeSI-Cluster mit dem höchsten Redoxpotential direkt neben der Moco mit dem niedrigsten Redoxpotential befindet, ist ein Elektronentransport ausschließlich durch die Redoxpotentiale angetrieben nicht möglich. Allerdings kann durch eine Aufstauung von Elektronen die Barriere des hohen Redoxpotentials des FeSII-

Clusters überwunden werden. Ein wahrscheinlicherer möglicher Mechanismus des Elektronentransportes ist ein Tunnelprozess der Elektronen durch das Enzym, der auf Grund der geringen Abstände der Redoxzentren stattfinden kann. Auf Grund von fehlenden Wechselwirkungen ist ein Transportprozeß entlang von Bindungen über den gesamten Transportweg nicht möglich. Es konnten nur Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem 2-Aminosubstituenten des Pterin im Moco und der Sγ des Cysteins 136 (bXOR) nachgewiesen werden [167].

Der Erhalt der Konformation des Enzyms ist für den Elektronentransport von großer Bedeutung. Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und den veröffentlichten Daten von Iwasaki et al. und Kappl et al. konnte jedoch kein Cluster und auch kein Eisenatom eines Cluster vom Elektronentransport ausgeschlossen werden. Bestätigt werden konnte die Wichtigkeit des FeSI-Cluster für die Konformation und die des FeSII-Clusters für die Aktivität des Enzyms.

4.5 Medizinischer Teil

XOR ist *in vivo* am Purinmetabolismus beteiligt und katalysiert den Metabolismus von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure und $O_2^{-\bullet}$, bzw NADH (siehe Kapitel 1.1). Das Produkt Harnsäure wird über Nieren mit dem Urin ausgeschieden. Jedoch kann Harnsäure ebenso wie $O_2^{-\bullet}$ im Organismus eine Immunantwort auslösen, die über die Aktivierung des Immunsystems in einer veränderten Stoffwechsellage mit erhöhtem Katabolismus resultiert [168]. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz konnte bereits eine Korrelation des Harnsäurespiegels im Blut mit der Überlebenszeit und verbessertem Allgemeinbefinden gezeigt werden [169,170,171]. Jedoch wurde in diesen Studien die XOR Aktivität nur indirekt über die sich im Plasma oder Vollblut befindliche Konzentration an Harnsäure gemessen.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die die direkte Messung der XOR aus Gewebeproben mittels der produzierten Sauerstoffradikale ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei Tumorerkrankungen die XOR Aktivität signifikant steigt, jedoch mit den XOR-Inhibitoren Allopurinol und Oxypurinol signifikant gesenkt werden konnte und eine Korrelation der XOR Aktivität mit dem Körpergewicht der Tiere, der Fettmasse, der Muskelmasse, der Futteraufnahme pro Tag und der Aktivität der Tiere gegeben ist (siehe Kapitel 3.3).

Die von der XOR produzierten Produkte Harnsäure und Superoxid-Anionen führen beide, wenn auch über unterschiedliche Signalwege, zu einer Aktivierung des Immunsystems mit gleichzeitiger Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie NFκB, TNF-α, INF γ und den Interleukinen Il-1 und Il-6 [172]. Harnsäure wirkt direkt auf die Aktivität als „danger signal“ ein [88]. Zusätzlich wird die Expression der XOR durch proinflammatorischen Mediatoren erhöht [173]. Vergleichende Messungen von gesunden und tumorkranken Tieren ergab eine signifikant erhöhte Bildung von Superoxidradikalen, die ebenso mit einer starken Verminderung des Körpergewichtes, einer Abnahme der Fett- und Muskelmasse einherging. Eine erhöhte Expression der XOR konnte mittels Westernblot-Analyse bei tumorkranken Tieren nachgewiesen werden. Superoxid-Anionen lösen durch ihre Beteiligung an der Membranlyse eine Ausschüttung von Akuten Phase Proteinen (APP) aus, die ebenfalls die Zytokinproduktion erhöhen [174]. Die Bildung von weiteren radikalischen Spezies wie ONOO* und OH* -Radikalen wird durch die Reaktion von Superoxid-Anionen mit Nebengruppenmetallionen (Fenton/Haber-Weiss-Reaktion [175]) beschleunigt und führt durch entstehende Gewebeschädigungen zu einer chronischen Inflammation [127]. Diese chronische Inflammation löst ebenso die Ausschüttung von APP aus [174]. Eine erhöhte Zytokinmenge aktiviert den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg und führt zu einem vermehrten Abbau der Skelettmuskulatur und Veränderungen im Fett- und Kohlehydratstoffwechsel [176,177]. Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der Körperzusammensetzung und im Verhalten durch eine erhöhte Aktivität der XOR zurückzuführen war, wurden die Tiere mit unterschiedlichen Dosen der XOR Inhibitoren Allopurinol und Oxypurinol behandelt. Allopurinol liegt in einer 10fach längeren Halbwertszeit im Plasma vor. Aus der Spezies Allopurinol wird durch Oxidation an der Moco-Seite des Enzyms die eigentlich aktive Spezies Oxypurinol bei gleichzeitiger Superoxid-Anionbildung gebildet (siehe Kapitel 1.1). Allopurinol konkurriert hierbei mit Xanthin um die Bindungsstelle, bei Oxypurinol liegt eine nicht-kompetetive Hemmung vor [121]. Diese Theorie schlägt sich auch in den Ergebnissen der Bestimmung der Superoxid-Anionproduktion nieder. So werden von der Tiergruppe, die mit einer hohen Dosis Oxypurinol behandelt wurde, die wenigsten Superoxidanionen gebildet. Jedoch zeigte sich in allen weiteren Daten eine reverse Dosisantwort, so blieben die Tiere leichter und nahmen weniger Futter zu sich und bewegten sich sehr wenig. Dies ist durch die lange biologische Halbwertszeit und einer somit erfolgten Akkumulation

von Oxypurinol im Organismus zu erklären [178]. So wurde bei der Anwendung einer 10fach niedrigeren Dosis an Oxypurinol zwar eine leicht höhere, aber nicht signifikant höhere Menge an Superoxid-Anionen detektiert, jedoch zeigen die Tiere signifikant verbesserte Gewichtsentwicklungen, Futteraufnahmen und eine höhere spontane Aktivität. Zwei Gruppen von Tieren wurde jeweils mit derselben Dosis Allopurinol behandelt. Diese Tiergruppen wiesen zwar eine niedrigere Superoxid-Produktion als die unbehandelten Tumortiere auf, jedoch lag die Konzentration höher als die der beiden Oxypurinol-Behandlungen. Eine Verringerung der Allopurinol-Dosis führte zu einer höheren Produktion an Superoxidradikalen. Der Grund hierfür kann sowohl die Produktion von Superoxid-Anionen durch die Umsetzung von Allopurinol zu Oxpurinol sein als auch die schlechtere Halbwertszeit von Allopurinol im Plasma [178]. Durch die unterschiedliche Art der Bindung der Inhibitoren an den Moco kann eine weitere Erklärung der besseren Inhibition gegeben werden. So konkurriert der Inhibitor Allopurinol mit dem Substrat Xanthin, vorliegend in physiologischen Konzentrationen um die Bindungstelle am reduzierten Enzym, wohingegen Oxypurinol am oxidierten Enzym bindet und keine Konkurrenzsituation um die Bindungsstelle existiert [178]. Kontrovers diskutiert werden in der Literatur die Gründe für eine mögliche Senkung des oxidativen Stresses durch Allopurinol und Oxypurinol. So kann eine Erklärung der inhibierende, direkte Effekt auf die XOR sein [179]. Wern et al. und Moorehouse et al. beschreiben Allpurinol als direkten Radikalfänger für Superoxidanionen [180,181]. Auch hierdurch könnte die Belastung des Organismus gesenkt werden. Oxypurinol werden bessere Radikalfängereigenschaften zugeschrieben als Allopurinol. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen weisen jedoch auf einen höheren Anteil der direkten Wirkung der Inhibitoren auf das Enzym hin. Die angefertigten Messungen werden durch die Probenvorbereitung nur mit dem Substrat Xanthin und ohne gleichzeitiges Vorliegen von Plasma, welches möglichweise Spuren der verabreichten Inhibitoren enthalten könnte, durchgeführt. Eine direkte Inhibition *in vivo* führt zu einer Senkung sowohl des Harnsäure als auch der Superoxid-Anion Konzentration. Eine indirekte Inhibition würde nur zu einer Senkung der Superoxid-Anion Konzentration und nicht der Harnsäure-Konzentration führen. Wäre die Harnsäurekonzentration jedoch erhöht, würde die Immunantwort zu einer höheren Expression von XOR führen und in den durchgeführten Messungen wäre kein Unterschied von behandelten versus unbehandelte Tiere zu erkennen. Möglicherweise wäre die Superoxid-Anion Bildung

leicht erniedrigt, da die durch diese ausgelösten Effekte ausblieben. Jedoch können hierdurch keine signifikanten Änderungen erklärt werden.

5 Literaturverzeichnis

[1] J. A. Pateman, D. J. Cove, B.M. Rever, D. B. Roberts, Nature 1964, 201, 58-60 “A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase.”

[2] T. A. Krenitsky, T. Spector, W. W. Hall, Arch. Biochem. Biophys. 1986, 247, 108-119 “Xanthine oxidase from human liver: purification and charaterization.”

[3] C. Enroth, B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino, E. F. Pai, PNAS 2000, 97, 10723-10728 “Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure based mechanism of conversion.”

[4] T. Nishino, T. Nishino, JBC 1989, 264, 5468-5473 “The nictotinamide adenine dinucleotide-binding site of chicken liver xanthine dehydrogenase.”

[5] A. G. Porras, G. Palmer, JBC 1982, 257, 11617-11626 “The room temperature potentiometry of xanthine oxidase: pH-dependent redox behaviour of the flavin, molybdenum and iron sulfur centers. “

[6] J. Hunt, V. Massey, W. R. Dunham, R. H. Sanders, JBC 1993, 268, 18685-18691 “Redox potentials of milk xanthine dehydrogenase.”

[7] S. Abadeh, J. Killacky, M. Benboubetra, R. Harrison, Biochim. Biophys. Acta 1992, 1117, 25-32 “Purification and partial characterization of xanthine oxidase from human milk.”

[8] B. L. J. Godber, G. Schwarz, R. R. Mendel, D. J. Lowe, R: C. Bray, R: Eisenthal, R. Harrison, Biochem. J. 2005, 388, 501-508 „Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-suphur centres.“

[9] C. Vorbach, A. Scriven, M. R. Capecchi, Genes Dev. 2002, 16, 3223-3235 „The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland.”

[10] C. Vorbach, M. R. Capecchi, J. M. Penninger, Bio Esseays, 2006, 28, 606-616 “Evolution of the mammary gland from the innate immune system?”

[11] D. A. Parks, D. N. Granger, Acta Physiol. Scand. 1986, Xanthine oxidase: biochemistry, distribution, and physiology.”

[12] J. W. de Jong, R. G. Schömaker, R. de Jonge, P. Bernocchi, E. Keijzer, R. Harrison, H. S. Sharma, C. Ceconi, J. Mol. Cell. Cardiol. 2000, 32, 2083-2089 “Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart.”

[13] M. Muxfeldt, W. Schaper, Basic Res. Cardiol. 1987, 82, 486-492 “The activity of xanthine oxidase in heart of pigs, guinea pigs, rabbits, rats, and humans.”

[14] S. Abadeh, P. C. Case, R. Harrison, Biochem. Soc. Trans. 1993, 21, 99S “Purification of xanthine oxidase from human heart.”

[15] T. P. Cappola, D. A. Kass, G. S. Nelson, R. D. Berger, G. O. Rosas, Z. A. Kobeissi, E. Marban, J. M. Hare, Circulation 2001, 104, 2407-2411 “Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.”

[16] L. J. Eddy, J. R. Stewart, H. P. Jones, T. D. Engerson, J. M. McCord, J. M. Downey, Am. J. Physiol. 1987, 253, H709-H711 “Free radical-producing enzyme, xanthine oxidase, is undectable in human hearts.”

[17] N. Linder, J. Rapola, K. O. Raivio, Laboratory Invest. 1999, 79, 967-974 “Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues.”

[18] E. Della Corte, G. Gozetti, F. Novello, F. Stirpe, Biochim. Biophys. Acta 1969, 191, 164-166 “Properties of the xanthine oxidase from human liver.”

[19] F. Stirpe, E. Della Corte, JBC 1969, 244, 3855-3863 “The regulation of rat liver xanthine oxidase – conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O).”

[20] W. R. Waud, K. V. Rajagopalan, Arch. Biochem. 1976, 172, 354-364 „Purification and properties of the NAD^+-dependent /Type D) and O_2-dependent (Type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase.“

[21] E. Della Corte, F. Stirpe, Biochem. J., 1968, 108, 349-351, “The regulation of xanthine oxidase in rat liver: Modification of the enzyme activity of rat liver supernatant on storage at -20°C.”

[22] T. Nishino, K. Okamoto, Y. Kawaguchi, H. Hori, T. Matsumura, B. T. Eger, E. F. Pai, T. Nishino, JBC 2005, 280, 24888-24891 “Mechanism of the Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase.”

[23] T. Nishino, T. Nishino, JBC 1997, 272, 29859-29864 “The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene.”

[24] E. Della Corte, F. Stirpe, Biochem. J. 1972, 126, 739-745 „The regulation of rat liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme.”

[25] W. R. Waud, K. V. Rajagopalan, Arch. Biochem. Biophys. 1976, 172, 365-379 “The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD-dependent form (type D) to an O_2-dependent type (type O).”

[26] J. Hunt, V. Massey, JBC 1992, 267, 21479-21485 “Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase.”

[27] M. Nakamura, I. Yamazaki, J. Biochem. 1982, 92, 1279-1286 „Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form.”

[28] J.M. McCord, N. Engl. J. Med. 1985, 312, 159-163 “Oxygen.derived free radicals in postischemic tissue injury.”

[29] T. Nishino, I. Tamura, Adv. Exp. Med. Biol. 1991, 309A, 327-337 “The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury.”

[30] A. Saito, T. Nishino, K. Noda, Y. Amada, T. Nishino, JBC 1995, 270, 2818-2826 “The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase: cDNA cloning and the domain structure.”

[31] J. H. Kim, R. Hille, JBC 1993, 268, 44-51 “The reductive half-reaction of xanthine oxidase with xanthine: observation of a spectral intermediate attributable to the molybdenum center in the reaction of enzyme with xanthine.”

[32] R. B. McWhirter, R. Hille, JBC 1991, 266, 23724-23731 “The reductive-half reaction of xanthine oxidase: spectral intermediates in the hydroxylation of 2-hydroxy-6-methylpurine.”

[33] N. Usuda, M. K. Reddy, T. Hashimoto, M. S. Rao, J. K. Reddy, Laboratory Invest., 1988, 58, 100-111 “Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes.”

[34] C. K. Mathews, K. E. Van Holde (1996), Nucleotide metabolism. In Biochemistry, 2nd edn, 793. Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, CA, USA.

[35] T. Saito, T. Nishino, JBC 1989, 264, 10015-10022 “Differences in redox and kinetic properties between NAD-dependent and O_2-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase.”

[36] Y. Kuwabara, T. Nishino, K. Okamoto, T. Matsumara, B. T. Eger, E. F. Pai, T. Nishino, PNAS 2003, 100, 8170-8175 „ Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine dehydrogenase.”

[37] M. J. Barber, R. C. Bray, R. Cammack, M. P. Coughlan, Biochem. J. 1977, 163, 279-289 “Oxidation-reduction potentials of turkey liver xanthine dehydrogenase and the origins of oxidase and dehydrogenase behaviour in molybdenum hydoxylases.”

[38] A. G. Porras, G. Palmer, JBC 1982, 257, 11617-11626 “The room temperature potentiometry of xanthine oxidase. pH-dependent redox behavior of the flavin, molybdenum, and iron-sulfur centers ”

[39] T. Nishino, T. Nishino, L. M. Schopfer, V. Massey, JBC 1989, 264, 2518-2527 “The reactivity of chicken liver xanthine dehydrogenase with molecular oxygen.”

[40] M. Xia, R. Dempski, R. Hille, JBC 1999, 274, 3323-3330 “The reductive half-reaction of xanthine oxidase-reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytic labile oxygen.”

[41] R. F. Anderson, R. Hille, V. Massey, JBC 1986, 261, 15870-15876 “The radical chemistry of milk xanthine oxidase as studied by radiation chemistry techniques.”

[42] R. Hille, R. F. Anderson JBC 1991, 266, 5608-5615 “Electron transfer in milk xanthine oxidase as studied by pulse radiolysis.”

[43] J. S. Olson, D. P. Ballou, G. Palmer, V. Massey, JBC 1974, 249, 4350-4362 “The mechanism of action of xanthine oxidase.”

[44] R. Hille, V. Massey, JBC 1981, 256, 9090-9095 “Studies on oxidative half-reaction of xanthine oxidase.”

[45] R. Hille, T. Nishino, FASEB 1995, 9, 995-1003 „Flavoprotein Structure and Mechanism 4: Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase.”

[46] C. M. Harris, V. Massey, JBC 1997, 272, 28335-28341 “The oxidative half-raction of xanthine dehydrogenase with NAD, reaction kinetics and steady-state mechanism.”

[47] S. Sanders, R. S. Eisenthal, R. Harrison, Eur. J. Biochem. 1997, 245, 541-548 „NADH oxidase actvity of human xanthine oxidoreductase – generation of superoxide anion.“

[48] V. Massey, H. Komai, G. Palmer, G.B. Elion, JBC 1970, 245. 2837-2844 „On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines.“

[49] T. Spector, Biochem. Pharmacol. 1988, 37, 349-352 “Oxypurinol as an inhibitor of xanthine oxidase-catalyzed production of superoxide radical.”

[50] F. Pea, Contrib. Nephrol. 2005, 147, 35-36 “Pharmacology of drugs for hyperuricemia: mechanism, kinetics and interactions.”

[51] C. M. Harris, V. Massey, JBC 1997, 272, 8370-8379 “The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen–reaction kinetics and steady-state mechanism.”

[52] L. M. Schopfer, V. Massey, JBC 1988, 263, 13528-13538 „ Rapid Reaction Studies on the Reduction and Oxidation of Chicken Liver Xanthine Dehydrogenase by the Xanthine/Urate and NAD/NADH Couples.“

[53] J. R. Williamson, JBC 1966, 241, 5026-5036 “Glycolytic Control Mechanism”

[54] C. S. Lieber, N. Engl. J. Med. 1988, 319, 1639-1650 „Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues.”

[55] J. J. Truglio, K. Theis, S. Leimkühler, R. Rappa, K. V. Rajagopalan, C. Kisker, Structure 2002, 10, 115-125 “Crystal structure of the Active and Alloxanthine-Inhibited Forms of Xanthine Dehydrogenase from *Rhodobacter Capsulatus*.”

[56] K. F. Aguey-Zinsou, P. V. Bernhardt, S. Leimkühler, JACS 2003, 125, 15352-15358 “Protein Folm Voltammetry of *Rhodobacter Capsulatus* Xanthine Dehydrogenase.”

[57] M. J. Barber, M. P. Coughlan, K. V. Rajagopalan, L. M. Siegel, Biochemistry 1982, 21, 3561-3568 “Properties of the prosthetic groups of rabbit liver aldehyde oxidase: a comparison of molybdenum hydroxylase enzymes”

[58] K. V. Rajagopalan, J. L. Johnson, JBC 1992, 267, 10199-10202 „The pterin molybdenum cofactors.”

[59] T. A. Krenitsky, S. M. Neil, G. B. Elion, G. H. Hitchings, Arch. Biochem. Biophys. 1972, 150, 585-599 „A Comparison of the Specifities of Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase.”

[60] S. A. Jacobs, R. G. Stoller, B. A. Chabner, D. G. Johnes, J. Clin. Invest. 1976, 57, 534-538 “7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate.”

[61] H. Zhang, A. Schmeißer, C. D. Garlichs, K. Plötze, U. Damme, A. Mügge, W. G. Daniel, Cardiovasc. Res. 1999, 44, 215-222 „Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane bound NADH-/NADPH-oxidases.“

[62] B. P. Yu, Physiol.. Rev. 1994, 74, 139-162 “Cellular defense against damage from reactive oxygen spezies.”

[63] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, Methods. Enzymol. 1990, 186, 1-85 “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.”

[64] R. Meneghini, Free Radic. Biol. Med. 1997, 23, 783-792 “Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage.”

[65] G. Czapski, Methods Enzymol. 1984, 105, 209-215 “Reaction of ˙OH.”

[66] R. Richmond, B. Halliwell, J. Chauhan, A. Dabre, Anal. Biochem. 1981, 118, 328-335 “Superoxide-dependent formation of hydroxyl radials: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds.”

[67] H. Sies, Eur. J. Biochem. 1993, 215, 213-219 “Strategies of antioxidative defence.”

[68] B. N. Ames, R. Cathcart, E. Schwiers, P. Hochstein, PNAS 1981, 78, 6858-6892 „Uric acid provides an antioxidative defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis.”

[69] L. Y. Chang, J. W. Slot, H. J. Geuze, J. D. Crapo, J. Cell. Biol. 1988, 107, 2169-2179 “Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes.”

[70] S. L. Markelund, P. M. Andersen, L. Forsgren, P. Nilsson, P. I. Ohlsson, G. Wikander, A. Oberg, J. Neurochem. 1997, 69, 675-681 „Normal binding and reactivity of copper in mutant superoxide dismutase isolated from amyotrophic laterail sclerosis patient.“

71 G. A. Keller, T. G. Warner, K. S. Steimer, R. A. Hallewell, PNAS 1991, 88, 7381-7387 „Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells.“

[72] L. W. Oberley, Free Radic. Biol. Med. 1988, 5, 113-124 “Free radicals and diabetes.”

[73] W. J. Evans, J. E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Gutteridge, A. Jatoi, K. Kalanar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W. E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F. Rossi Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, S. D. Anker (in revidierter Form eingereicht)

[74] M. J. Tisdale, Nutrition 1997, 13, 1-7 “Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations.”

[75] D. Heber, L. O. Byerley, J. Chi, Cancer Res. 1986, 58, 1867-1873 “Pathophysiology of malnutrition in the adult cancer patient.”

[76] E. Bruera, Oncology 1992, 49 (Suppl 2), 35-42 “Clinical management of anorexia and cachexia patients with advanced cancer.”

[77] M. R. Brennan, Cancer Res. 1997, 37, 2359-2364 “Uncomplicated starvation vs cancer cachexia.”

[78] K. Nelson, D. Walsh, Cancer Bull. 1991, 43, 403-406 “Management of the anorexia/cachexia syndrome.”

[79] M. J. Tisdale, Nature 2002, 2, 862-871 “Chachexia in cancer patients.”

[80] S. D. Anker, R. Sharma, Int. J. Cardiol. 2002, 85, 51-66 “The syndrome of cardiac cachexia.”

[81] W. D. DeWys, Am. J. Med. 1980, 69, 491-497 „Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients.”

[82] J. Inagaki, V. Rodriguez, G. P. Bodey, Cancer 1974, 33, 568-573 „Causes of death in cancer patients.”

[83] J. M. Lawler, W. Song, S. R. Demaree, Free Radic. Biol. Med. 2003, 35, 9-16 “Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidative capacity in skeletal muscle.”

[84] J. F. Mead, Free Radic.Biol. 1976, 1, 51-68 “Free radical mechanism in lipid damage and consequences for cellular membrane.”

[85] P. Pacher, I. G. Obrosova, J.G. Mabley, C. Szabo, Curr. Med. Chem. 2005, 12, 267-275 “Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications: emerging new therapeutic strategies.” Trends Pharmacol. Sci. 2005, 26, 302-310 “

[86] P. Pacher, R. Schulz, L. Liaudet, C. Szabo, Trends Pharmacol. Sci. 2005, 26, 302-310 “Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure.”

[87] M. Aslan, T. M. Ryan, B. Adler, T. M. Townes, D. A. Parks, J. A. Thomson, A. Tousson, M. T. Gladwin, R. P. Patel, M. M. Tarpey, PNAS, 2001, 98, 15215-15220 “Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell desease.”

[88] Y. Shi, E. E. Evans, L. R. Kenneth, Nature 2003, 425, 516-521 “Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells.”

[89] Y. P. Li, R. J. Schwartz, I. D. Waddell, FASEB J. 1998, 12, 871-880 „Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen mediated NF-kappaB activiation in response to tumor necrosis factor alpha.“

[90] U. K. Lämmli, Nature 1970, 227, 680-685 „Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4”

[91] L. Maia, L. Mira; Arch. Biochem. Biophys. 2002, 1, 48-53 “Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase: A Simple Procedure for the Simultaneous Purification from Rat Liver”

[92] S. Spiekermann, U. Landmesser, S. Dikalov, M. Bredt, G. Gamez, H. Tatge, N. Reepschläger, B. Hornig, H. Drexler, D. G. Harrison; Circ., 2003, 107, 1383-1389 „Electron Spin Resonance Characterization of Vascular Xanthine and NAD(P)H Oxidase Activity in Patients With Coronary Artery Disease“

[93] S. Schumann, unveröffentlicht, Dissertation in Arbeit, 2007

[94] J. L. Johnson, W. R. Waud, H. J. Cohen, K. V. Rajagopalan; JBC 1974, 249, 5056-5061 “Simple Procedure for the Simultaneous Purification from Rat Liver”

[95] M. Kanda, F. O. Brady, K. V. Rajagopalan, JBC 1971, 247,3,765-770 „Studies on the Dissociation of Flavin Adenine Dinucleotide from Metalloflavoproteins”

[96] J. E. Wertz, J. R. Bolton: Electron Spin Resonance, McGraw-Hill, New York 1986

[97] M. Kolberg, Dissertation 2001 “Generation and characterization of free and metal associated Amino acids radicals in ribonucleotide reductase using EPR techniques.”

[98] M. Galander, Dissertation 2005 “Strukurelle Untersuchungen an der Ribonukleotid Reduktase und der Pyruvat::Ferrodoxin Oxidoreduktase mittels ESR und ENDOR.“

[99] A. Stesmans, G. Vangorp, J. Magn. Reson. 1989, 178, 42-55

[100] S. Stoll, A. Schweiger, J. Magn. Reson. 2006, 178, 42-55

[101]S. Leimkühler, R. Hodson, G. N. George, K. V. Rajagopalan, JBC 2003, 278, 20802-20811 „Recombinant *Rhodobacter capsulatus* Xanthine Dehydrogenase, a Useful Model System fort he Characterization of Protein Variants Leading to Xanthinuria I in Humans”

[102] L. Maia, R. O. Duarte, A. Ponces-Freie, J. G. Moura, L. Mira, J. Biol. Inorg. Chem. 2007, 12, 777-787 “NADH Oxidase activity of rat and human liver xanthine oxidoreductase: potential role in superoxide production.”

[103] K. Parschat, C. Canne, J. Huttermann, R. Kappl, S. Fetzner, Biochem. Biophys. Acta (2001) 1544, 151-165 „Xanthine dehydrogenase from Pseudomonas putida 86:

specificity, oxidation-reduction potentials of its redox-active centers, and first EPR characterization “

[104] R. J. Rascati, P. Parsons, JBC, 1979, 254, 5, 1586-1593 „Purification and Characterization of Cytochrome c Oxidase from Rat Liver Mitochondria.“

[105] G. Richter (2003), Praktische Biochemie, Grundlagen und Techniken, Thieme Verlag, New York, Stuttgart, S. 25ff.

[106] J. M. Downey, T. Miura, L. J. Eddy, D. E. Chambers, E: Mellert, D. J. Hearse, D. M. Yellon, J. Mol. Cell. Cardiol. 1987, 19, 1053-1060 „ Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic heart.“

[107] L. J. Eddy, J. R. Stewart, H. P. Jones, T. D: Engerson, J. M. McCord, J. M. Downey, Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 22) 1987, 253, H709-H711 “ Free radical producing enzyme, xanthine oxidase, is undetectable in human hearts.”

[108] T. Podzuweit, W. Braun, A. Müller, W. Schaper, Bas. Res. Cardiol. 1987, 82, 493-505 „Arrhytmias and infarction in the ischemic pig heart are not mediated by xanthine oxidase-derived free oxygen radicals.”

[109] H. de Groot, A. Littauer, Biochem Biophys Res. Commun. 1988, 155, 278-282 “ Reoxygenation injury in isolated hepatocytes: cell death precedes conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase.”

[110] J. S. McNally, M. E. Davis, D. P. Giddens, A. Saha, J. Hwang, S. Dikalov, H. Jo, D. G. Harrison, Am. J Physiol. Heart Circ Physiol. 2003, 285, H2290-H2297 „ Vascular Signaling by free radicals: Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress.“

[111] J. T. Curnutte, R. Kuver, P. J. Scott, JBC, 1987, 262, 5563-5569 „Activation of Neutrophil NADPH Oxidase in a Cell-free system.“

[112] H. P. Misra, I. Fridovich, JBC 1972, 247, 6960 „The Generation of Superoxide Radical during the Autooxidation of Hemoglobin.“

[113] G. D. Nordblom, R. E. White, M. .J. Coon, Arch. Biochem. Biophys. 1976, 175, 524-533 „ Studies in hydroperoxide-dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrom P-450.“

[114] J. R. Step, A. I. Cederbaum, Arch. Biochem. Biophys. 300, 391-400 „ ESR studies on the production of reactive oxygen intermediates by rat liver microsomes in the presence if NADPH or NADH.”

[115] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, Chem. Rec. 1996, 96, 2841-2887 „ Heme-containing oxygenases."

[116] J. A. Peterson, S. E. Graham, Structure 1998, 6, 1079-1085 „A close familiy resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450."

[117] G. H. Loew, D. L. Harris, Chem. Rev. 2000, 100, 407- 419 " Role of the heme active site and protein environment in structure, spectram and function of cytochrome P450s."

[118] J.-M. Li, A. M. Shah, Am. J. Physiol. Regul. Integr, Comp. Physiol. 2004, 287, R1014-R1030, Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology."

[119] G. L. Squadrito, R. Cueto, A. E. Splenser, A. Valavanidis, H. Zhang, R. M. Uppu, W. A. Pryor, Arch. Biochem. Biophys. 2000, 376, 333-337 "Reaction of Uric Acid with Peroxynitrite and Implications for the mechanism of Neuroprotection by Uric Acid."

[120] S. Dikalov, B. Fink, M. Skatchkov, E. Bassenge, Free Rad. Biol. Med. 1999, 1-2, 170-176 „ Comparison of glycerin trinitrate-induced with pentaerythrityl tetranitrate-induced *in vivo* formation of superoxid radicals: effect of vitamin C."

[121] P. Pacher, A. Nivorozhkin, C. Szabo, Pharmacolgical Reviews 2006, 58, 1 "Therapeutic effects of Xanthien Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol."

[122] V. Massey, H. Komai, G. Palmer, G.B. Elion, JBC 1970, 245, 2837-2844 „On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by Allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines."

[123] T. Spector, W. W. Hall, T. A. Krenitsky, Biochem. Pharmacol. 1986, 35, 3109-3114 "Human and bovine xanthine oxidases. Inhibition studies with oxipurinol."

[124] R. Hille, Chem. Rev. 1996, 96, 2757-2816 "The mononuclear molybdenum enzymes."

[125] C. Galbusera, P. Orth, D. Fedida, T. Spector, Biochem. Pharmacol. 2006, 71, 1747-1752 "Superoxide radical production by Allopurinol and xanthine oxidase."

[126] M. P. Coughlan, J. L. Johnson, K. V. Rajagopalan, JBC 1980, 255, 7, 2694-2699 „Mechanism of Inactivation of Molybdoenzymes by Cyanide."

[127] J.-M. Li, A. M. Shah, Am. J. Physiol. Regul. Integr, Comp. Physiol. 2004, 287, R1014-R1030, Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology."

[128] I. Fleming, Circ. Res. 2001, 89, 753-762 “Cytochrome P450 enzymes in vascular homeostasis.”

[129] J. Switala, O. J. O`Neil, P. C. Loewen, Biochemistry 1999, 38, 3895-3901 „Catalase HPII from *Escherichia coli* Exhibits Enhanced Resistance to Denaturation”

[130] T. A. Krenitsky, S. M. Neil, G. B. Elion, G. H. Hitchings, Arch. Biochem. Biophys. 1972, 150, 585-599 „A Comparison of the Specificities of Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase.“

[131] T. K. Kundu, R. Hille, M. Velayutham, J. L. Zweier, Arch. Biochem. Biophys. 2007, 460, 13-121 „Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: An important source of oxidants in biological tissues.”

[132] R. K. Scopes, 2000, Protein Purification- Principles and Practice, 3rd Edition, Springer Verlag

[133] S. Englard, S. Seifter, Methods Enzymol. 1990, 182, 285-300 „Precipitation techniques.“

[134] H. Rehm, 2006, Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, 5. Auflage, Elesevier, Spektrum- Akademischer Verlag, Heidelberg

[135] M. Gorbunoff, Anal. Biochem. 1984, 136, 425-432 „The interaction of proteins with hydroxyapatite; role of protein charge and structure.“

[136] M. John, J. Schmidt, Anal. Biochem. 1984, 141, 466-471 “High resolution hydroxyapatite chromatography of proteins.”

[137] A. Meneshian, G. B. Bulkley, Microcirculation 2002, 9, 161-175 „The physiology of enrdothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction.“

[138] R. Marti, E. Varela, C. Pascual, R. M. Segura, Clinica Chim. Acta, 2001, 303, 117-125 “Determination of xanthineoxidoreductase forms: Influence of reaction conditions.”

[139] A. Sarnesto, N. Linder, K. O. Raivio, Lab. Invest. 1996, 74, 48 “Organ Distribution and Molecular Forms of Human Xanthine Dehydrogenase/Xanthine Oxidase Protein.”

[140] M. G. Battelli, E. Lorenzoni, F. Stirpe, Biochem. J. 1973, 131, 191 “ Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase). Purification, interconversion and some properties.“

[141] C. M. Harris, S. A. Sanders, V. Massey, JBC 1999, 274, 4561-4569 “Role of the Flavin Midpoint Potential and NAD Binding in Determining NAD Versus Oxygen Reactivity of Xanthine Oxidoreductase.”

[142] T. Nishino, T. Nishino, JBC 1989, 264, 2518-2517 „The Reactivity of Chicken Liver Xanthine Dehydrogenase with Molecular Oxygen.”

[143] L. M. Schopfer, V. Massey, T. Nishino, JBC 1988, 263, 13528-13528 „Rapid reaction studies on the reduction and oxidation of chicken liver xanthine dehydrogenase by the xanthine/urate and NAD/NADH couples.“

[144] T. Nishino, J. Biochem. 1994, 116, 1-6 „The Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase and the Role of the Enzyme in Reperfusion Injury.”

[145] J. Hunt, V. Massey, JBC 1994, 269, 18904-18914 “Studies of Reductive Half reaction of Milk Xanthine Dehydrogenase.”

[146] V. Massey, Biochim. Biophys. Acta 1959, 34, 255-256 “The microestimation of succinate and the extinczion coefficient of Cytochrome C.”

[147] M. A. Sharpe, C. E. Cooper, Biochem. J. 1998, 332, 9-19 “Reactions of nitric oxide with mitochrondrial Cytochrom c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite.”

[148] L. Thompson, M. Trujillo, R. Telleri, R. Radi, Arch. Biochem. Biophys. 1995, 319, 491-497 „Kinetics of cytochrom c oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric-oxide producing biological systems.“

[149] D. P. Ballou, G. Palmer, V. Massey, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1969, 36, 898-904 “Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocuprein”

[150] M. B. Kadiiska, B. C. Gladen, D. D. Baird, A. E. Dikalova, R. S. Sohal, G. E. Hatch, D. P. Jones, R. P. Mason, J. C. Barrett, Free Rad Biol Med 2000, 28, 838-845 “Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl(4) poisoning?”

[151] T. Tanigawa, Y. Kotake, L. A. Reinke, Free Rad Res Commun 1993, 19, 101-110 “Spin trapping of superoxide from glass adherent polymorphonuclear leukocytes induced by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine.”

[152] C. L. Murrant, M. B. Reid, Microsc. Res. Tech. 2001, 55, 236-248 „Detection of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species in Skeletal Muscle.“

[153] E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman; Arch Biochem Biophys 1980, 200, 1-16 „Spin Trapping of Superoxide and Hydroxyl Radical: Practical Aspects."

[154] E. G. Janzen, Accounts Chem Res 1971, 4, 31-40

[155] S. Dikalov, B. Fink, M. Skatchkov, D. Stalleicken, E. Bassenge, J Pharm Exp Ther 1998, 286, 938-944 "Formation of reactive oxygen species by pentaerithrityltetranitrate and glyceryl trinitrate in vitro and development of nitrate tolerance."

[156] K. Zwicker, S. Dikalov, S. Matuschka, L. Mainka, M. Hofmann, V: Khramtsov, G. Zimmer, Arzneimittel-Forsch 1998, 48, 629-636

[157] G. M. Rosen, E. Finkelstein, E. J. Rauckmann, Arch. Biochem. Biophys. 1982, 215, 367-378 „A method for the detection of superoxide in biological systems."

[158] S. Dikalov, M. Skatchkov, E. Bassenge, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997, 230, 54-57 "Quantification of peroxynitrite, superoxide, and peroxyl radicals by a new spin trap hydroxylamine 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine."

[159] H. Frejaville, H. Karoui, B. Tuccio, F. Le Moigne, M. Culcasi, S. Pietri, R. Lauricella, P. Tordo, J. Med. Chem. 1995, 38, 258-265 „ 5-(Diethoxyphopshoryl)-5-methyl-1-pyrrolidine N-Oxide: A New Efficient Phosphorylated Nitrone for the *in Vitro* and *in Vivo* Spin Trapping of Oxygen centered Radicals."

[160] T. Nishino, K. Okamoto, J. Inorg. Biochem. 2000, 82, 43-49 „The role of the [2Fe-2s] cluster centers in xanthine oxidoreductase."

[161] R. Hille, V. Massey (1985) in Molybdenum Enzymes (T. G. Spiro ed.) S.443-518, John Wiley & Sons, Inc. New York

[162] H. Sticht, P. Rosch, Prog. Biophys. Mol. Biol. 1998, 70, 95-136 „The structure of iron-sulfur proteins."

[163] T. Iwasaki, K. Okamoto, T. Nishino, J. Mizushima, H. Hori, T. Nishino, J. Biochem. 2000, 127, 771-778 "Sequence Motif-Specific Assignment of Two [2Fe-2S] Clusters in Rat Xanthine Oxidoreductase Studied by Site-Directed Mutagenesis."

[164] R. Kappl, S. Sielker, K. Ranguelova, J. Wegner, K. Parschat, J. Hüttermann, S. Fetzner, Biochemistry 2006, 45, 14853-14868 „Spectroscopic and Biochemical Studies on Protein Variants of Quinaldine 4-Oxidase: Role of E736 in Catalysis and Effects of Serine Ligands on the FeSI and FeSII Clusters."

[165] K. F. Aguey-Zinsou, P. V. Bernhardt, S. Leimkühler, JACS 2003, 125, 15352-15358 “Protein Fold Voltammetry of *Rhodobacter Capsulatus* Xanthine Dehydrogenase.“

[166] R. Hille, R. F. Anderson, JBC 2001, 276, 31193-31202 „Coupled Electron/Proton Transfer in Complex Flavoproteins. Solvent kinetic isotope effect studies of electron transfer in xanthine oxidase and triemethylamine dehydrogenase.”

[167] C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, L. P. Dutton, Nature 1999, 402, 47-52 “Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction.”

[168] J. M. Lawler, W. Song, S. R. Demaree, Free Radic. Biol. Med. 2003, 35, 9-16 “Hindlimb unloading increase oxidative stress and disrupts antioxidative capacity in skeletal muscle.”

[169] M. Mazzali, J. Hughes, Y. Kim, A. Jefferson, D. Kang, K. L. Gordon, H. Y. Lan, S. Kivlighn, R. J. Johnson, Hypertension 2001, 38, 1101-1106 “Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by novel crystal independent mechanism.”

[170] M. H. Alderman, H. Cohen, S. Madhavan, S. Kivlighn, Hypertension 1999, 34, 144-150 “Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients.”

[171] S. D. Anker, W. Doehner, M. Rauchhaus, R. Sharma, D. Francis, C. Knosalla, C. H. Davos, M. Cicoira, W. Shamim, M. Kemp, R. Segal, K. J. Osterziel, F. Leyva, R. Hetzer, P. Ponikowski, A. J. S. Coats, Circulation 2003, 107, 1991-1997 “Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional and hemodynamic staging.”

[172] C. Godin, A. Caprani, J. Dufaux, P. Flaud, J. Cell. Sci. 1993, 106, 441-445 « Interactions between neutrophils and endothelial cells. »

[173] C. Vorbach, R. Harrison, M. R. Capecchi, Trends in Immunol. 2003, 24, 512-517 „Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immunsystem.“

[174] I. Kushner, Perspect. Biol. Med. 1993, 36,611-622 “Regulation of the acute phase response by cytokines.”

[175] J. P. Kehrer, Toxicology 2000, 149, 43-50 „The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity.“

[176] M. Lovera, N. Carbo, J. Lopez-Soriano, Cancer Lett. 1998, 133, 83-87 “Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle.”

[177] P. Matthys, R. Dijkmans, P. Proost, Int. J. Cancer, 1991, 49, 77-82 “Severe cachexia in mice inoculated with interferon-γ-producing tumour cells.”

[178] T. Spector, Biochem. Pharmacol. 1988, 37, 349-352 „Oxypurinol as an Inhibitor of Xanthine Oxidase Catalyzed Production of Superoxide Radical.“

[179] D. N. Granger, E. Hollwarth, D. A. Parks Acta Physiol. Scand. Suppl. 1986, 548, 47-63 “Ischaemia-reperfusion injury: Role of derived free radicals.”

[180] P. C. Moorehouse, M. Grootveld, B. Halliwell, J. G. Quinlan, J. M. C. Gutteridge FEBS Lett. 1987, 213, 23-28 “Allopurinol and Oxypurinol are hydroxyl radical scavengers.”

[181] S. W. Wern, C. M. Grumm, A. Ventura, R. A. Hahn, P. P. K. Ho, R. D. Towner, J. C .Fantone, M. A. Schork, B. Kucchesi, Circ. 1991, 83, 995-1005 “Xanthine oxidase inhibition does not limit canine infarct size.”