

Zusammenfassung

Urothion, das Degradationsprodukt des Molybdän-Cofaktors (Moco), ist ein trizyklisches Thiophenopterin – obligatorisch im Harn ausgeschieden. In den letzten Jahrzehnten blieb die Biosynthese und Fuktion von Urothion, sowie die katabole Inaktivierung von Moco unbekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Biosynthese von Urothion in Säugern erforscht. Beruhend auf der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Urothion und dem Lufoxidationsprodukt Mocos, Form B, wurde die Existenz von mindestens zwei Enzymen, einer Methyltransferase und einer Phosphatase, im Moco Katabolismus angenommen. Als Voraussetzung, um mit Urothion arbeiten zu können, wurde zunächst ein Standard durch die Aufreinigung von Urothion aus Urin generiert. Die Identität des aufgereinigten Urothions wurde anschließend mittels Massenspektrometrie, Dünnschichtchromatographie, und pH-abhängiger UV/Vis-Spektrometrie verifiziert. Im nächsten Schritt wurde die *in vitro* Synthese von Urothion etabliert, um die entsprechenden Enzyme der Moco-Degradation zu identifizieren. Diese *in vitro* Urothion-Synthese basiert auf der Umwandlung des Substrates Thiopurin (erhalten aus der *in vitro* Synthese von MPT oder aus dem Einsatz von hitzedenaturierter oder nativer Sulfitoxidase) zu Urothion unter Verwendung von murinem Leber-Rohextrakt als Enzymquelle. S-Adenosylmethionin (SAM) stellte sich als essentiell benötigter Methylgruppen-Donor für die *in vitro* Urothion-Synthese heraus. Der anschließenden chromatographischen Anreicherung von Urothion-synthetisierender Aktivität aus Leber-Extrakt folgend, wurde die Thiopurin S-Methyltransferase (TPMT) durch Peptid-Massen-Fingerprint-Analyse identifiziert. TPMT methyliert Thiopurine in einer SAM-abhängigen Weise und repräsentiert einen der bestbeschriebenen genetischen Polymorphismen im Arzneimittel-Metabolismus. Zytostatische Arzneimittel wie 6-Mercaptopurin und Azathioprin, welche für die Behandlung von Leukämie und Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden, sind bekannte Substrate der TPMT. Schwere hematopoetische Vergiftungserscheinungen können bei Patienten auftreten, welche TPMT-defizient sind und mit diesen Arzneimitteln behandelt werden. Unter Verwendung von aufgereinigter, rekombinanter TPMT konnte die Umwandlung von Thiopurin in Urothion in Anwesenheit der Alkalischen Phosphatase gezeigt werden, während in dessen Abwesenheit ein phosphoryliertes Intermediat, Jukathion, identifiziert und charakterisiert wurde. Die Inhibition der TPMT (aufgereinigt oder in Rohextrakt) durch 3,4,5-Triiodbenzoesäure verhinderte sowohl die Jukathion- als auch die Urothion-Synthese. Experimente mit Leber-Rohextrakt von TPMT-*Knockout*-Mäusen bewiesen endgültig, dass Thiopurin das endogene Substrat der TPMT darstellt, da keine Urothion-Synthese im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen detektiert werden konnte. Zusätzlich korrelierte die TPMT-Aktivität in humanem Leber- als auch Erythrozyten-Zytosolen von Patienten mit Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten TPMT-Mutationen, mit der entsprechenden Urothion-Synthese-Rate. Zum Abschluss wurde kein Urothion in Urin von homozygot TPMT-defizienten Patienten detektiert, was weiterhin die Funktion der TPMT in der Urothion Biosynthese bekräftigt. Im Ganzen belegen all unsere Daten die Ansicht, dass die TPMT die physiologische Methyltransferase im Moco Katabolismus darstellt und damit das Endprodukt dieses Stoffwechselweges, Urothion, als neuer Biomarker für die Behandlung von Patienten, die an Leukämie erkrankt sind oder an Autoimmunkrankheiten leiden, dienen könnte.

Abstract

Urothione, the degradation product of the molybdenum cofactor (Moco), is a tricyclic thiophenopterine - obligatory excreted by urine. Over the last decades, the biosynthesis and function of urothione, as well as the catabolic inactivation of Moco remained unknown. Therefore, in this thesis the urothione biosynthesis in mammals was investigated. Based on the structural similarity between urothione and the air oxidation product of Moco, Form B, the existence of at least two enzymes, a methyltransferase and a phosphatase, was proposed in Moco catabolism. As a prerequisite for working with urothione, initially a standard was generated by purification of urothione out of human urine. The identity of purified urothione was then verified by mass spectrometry, thin layer chromatography, and pH-dependent UV/Vis spectrometry. In a next step the *in vitro* urothione synthesis was established to identify the respective enzymes taking part in Moco-degradation. This *in vitro* urothione synthesis is based on the conversion of the substrate, thiopterin (obtained from *in vitro* MPT synthesis or by application of heat-denatured or native sulfite oxidase), to urothione using mouse liver crude protein extracts, as source of enzymes. S-adenosyl methionine (SAM) was found to be strictly required as methyl group donor for *in vitro* urothione synthesis. Following chromatographic enrichment of urothione-synthesizing activity from liver extracts, thiopurine S-methyltransferase (TPMT) was identified by peptide mass fingerprinting. TPMT methylates thiopurines in a SAM-dependent manner and represents one of the best-characterized genetic polymorphisms in drug metabolism. Cytostatic drugs, such as 6-mercaptopurine and azathioprine, which are used for the treatment of leukemia and autoimmune diseases, are known substrates of TPMT. Severe hematopoietic toxicity can occur in patients, which are deficient in TPMT and are treated with these drugs. Using purified, recombinant TPMT demonstrated conversion of thiopterin into urothione in the presence of alkaline phosphatase, while in its absence a phosphorylated intermediate, jukathione, was identified and characterized. Inhibition of TPMT (purified or in crude extracts) by 3,4,5-triiodobenzoic acid abolished both jukathione and urothione synthesis, respectively. Experiments with liver crude extract of TPMT-knockout mice finally proved thiopterin to be the endogenous substrate of TPMT as no urothione production was visible in contrast to TPMT wildtype mice. In addition, TPMT activity in human liver as well as red blood cell extracts of patients with wildtype, heterozygous and homozygous TPMT mutations correlated with the respective urothione synthesis rates. Finally, no urothione was detected in urine of homozygous TPMT-deficient patients, further confirming the role of TPMT in urothione biosynthesis. In aggregate, all our data support the view that TPMT is the physiological methyl transferase in Moco catabolism and therefore, the endproduct of this pathway, urothione could serve as novel biomarker for the treatment of patients with leukemia and numerous autoimmune diseases.