

Judit Christa Jacob
Dr. med.

**Große Thioredoxinreduktasen -
Untersuchungen zur Funktion konservierter Histidine und zur Wirksamkeit bitoper
Inhibitoren**

Geboren am 12.11.1979 in Suhl
Staatsexamen am 16.11.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: PD Dr. med. Habil. Stephan Gromer

Das Thioredoxinsystem – bestehend aus der Thioredoxinreduktase und seinem namensgebenden Substrat, dem ca. 12 kDa großen Redoxprotein Thioredoxin – ist von zentraler Bedeutung für das zelluläre Redoxmilieu: Thioredoxin kann als Dithiol mit einer großen Zahl von Verbindungen reagieren und diese reduzieren. Auch die Thioredoxinreduktase selbst kann – insbesondere in tierischen Zellen – weitere Substrate exzellent umsetzen. Dadurch greift das Thioredoxinsystem in eine Vielzahl unterschiedlichster zellulärer Prozesse ein.

Seine Beteiligung an der DNA-Synthese, die in fast allen untersuchten Tumoren nachgewiesene Überexpression, aber auch seine Mitwirkung an der Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika rückten das Thioredoxinsystem in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt vieler biomedizinischer Forschungsfelder.

Die Thioredoxinreduktasen werden in zwei strukturell und mechanistisch stark unterschiedliche Klassen, die so genannten *großen* bzw. *kleinen* Thioredoxinreduktasen unterteilt. Die großen Thioredoxinreduktasen, zu denen auch das menschliche Enzym zählt, besitzen ein zusätzliches, auf einem flexiblen C-terminalen Arm lokalisiertes Redoxzentrum. Dieses Redoxzentrum wird beim Humanenzym durch ein sequenziell direkt benachbartes Cystein-Selenocysteinpaar gebildet – ein Umstand, der die Attraktivität dieses (Seleno-)Enzyms für die Entwicklung selektiv wirksamer Inhibitoren weiter erhöht.

Beim Sequenzvergleich der großen Thioredoxinreduktasen finden sich zwei hochkonservierte Histidinreste. Aufgrund ihrer Lage im Enzym wurde für beide eine Bedeutung als Basenkatalysator postuliert. Während für das im *Drosophila melanogaster*-Enzym an Position 464 gelegene Histidin bereits bei mehreren Mitgliedern der Enzymfamilie eine solche Funktion nachgewiesen worden war, gibt es für Histidin106 keinen entsprechenden homologen Rest. Aufgrund von strukturellen Überlegungen lag es nahe, dass dieses Histidin insbesondere bei Selenocystein-freien großen Thioredoxinreduktasen eine große Bedeutung für die effektive Bildung der eigentlich katalytisch wirksamen Thiolate haben könnte.

Anhand von insgesamt 31 Mutanten wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung dieser Reste kinetisch und strukturell genauer untersucht. Während die Daten für Histidin464 die Annahme einer Basenkatalysatorfunktion stützen, konnte für Histidin106 – entgegen der ursprünglichen Annahme – eine Bedeutung als Basenkatalysator ausgeschlossen werden. Viel eher weisen die Daten – insbesondere der Austausch Histidin106 gegen Phenylalanin darauf hin, dass Histidin106 eine wichtige Strukturfunktion ausübt. Neben der Bedeutung für dieses konkrete Problem legt dieser Befund nahe, dass die typischerweise zum Nachweis der

Basenkatalysatorfunktion eingesetzten Aminosäuren die Möglichkeit einer reinen Strukturfunktion nicht abdecken und so zu Fehlinterpretationen führen können. Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung neuartiger Thioredoxinreduktaseinhibitoren. Hier wurde versucht, zwei Inhibitorcomponenten, die jeweils eine Präferenz für eines der beiden Redoxzentren der menschlichen Thioredoxinreduktase aufweisen, durch eine Linkerstruktur zu verbinden und so in einem Molekül zu vereinen. Das rationale Ziel dieser bitopen („an zwei Orten wirkenden“) Inhibitoren, ist es, die Wirksamkeit der Einzelcomponenten synergistisch zu steigern.

Bei den beiden Teilcomponenten handelt es sich zum einen um ein 5-Nitrofuranderivat und zum anderen um cis-Platin, die durch unterschiedliche Linker miteinander verbunden wurden. Die Experimente zeigen, dass alle vier Inhibitoren das Humanenzym irreversibel hemmen. Detailliertere kinetische Analysen stützen das postulierte Wirkprinzip der bitopen Inhibitoren. Im Zellkulturexperiment war bei diesen neuen Leitstrukturen zudem eine wesentlich geringere Dosissteigerung zur Hemmung cis-Platin-resistenter Zelllinien erforderlich als bei der klinisch eingesetzten Ausgangsverbindung cis-Platin.

Beide Eigenschaften – antitumorale Wirksamkeit und Durchbrechung der Chemoresistenz – lassen auf einen erfolgreichen klinischen Einsatz dieser Inhibitorklasse hoffen.