

Helge Gallwitz
Dr. med.

Interaktion des natürlichen Zytostatikums Ajoen mit humaner Glutathionreduktase und Trypanothionreduktase aus *Trypanosoma cruzi*. Kristallisation der ajoengehemmten GR sowie enzymkinetische und spektroskopische Untersuchungen.

Geboren am 04.11.1970 in Bonn
Reifeprüfung am 09.06.1990 in Bonn
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WES 91/92 bis WS 97/98
Physikum am 18.08.1993 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 03.06.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Frau Prof. Dr. rer. nat. R. L. Krauth-Siegel

Interaktion des natürlichen Zytostatikums Ajoen mit humaner Glutathionreduktase und Trypanothionreduktase aus *Trypanosoma cruzi*. Kristallisation der ajoengehemmten GR sowie enzymkinetische und spektroskopische Untersuchungen.

Knoblauchzubereitungen werden verschiedene therapeutische Wirkungen zugeschrieben. Neben antiateriosklerotischen und kardioprotektiven Wirkungen gehören dazu u.a. die Senkung der Tumorpromotion und Hemmung mehrerer, meist thiolhaltiger, Enzyme. Hauptverantwortlich für diese Wirkungen sind niedermolekulare Organoschwefelverbindungen, insbesondere das Allicin, das bei der Verletzung der Knoblauchzehe enzymatisch aus Alliin gebildet wird. Ein stabiles Reaktionsprodukt, das spontan aus Allicin entsteht, ist das natürliche Zytostatikum Ajoen (*E,Z*-4,5,9-Trithiadodeca-1,6,11-trien-9-oxid). Ajoen senkt den NADPH- und GSH-Pool von Zellen und wirkt dadurch zytotoxisch. Der Mechanismus dieser Wirkung ist jedoch unbekannt. Weitere Folgeprodukte des Allicin, für die auch u.a. cytotoxische Wirkungen beschrieben wurden, sind Diallylsulfid (DAS) und Diallyltrisulfid (DATS).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des Ajoens mit dem Schlüsselenzym des Thiolhaushalts, der Glutathionreduktase (GR) untersucht. Außerdem wurde die Wechselwirkung mit der Trypanothionreduktase (TR) aus *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der südamerikanischen Chagas-Krankheit untersucht. Die Trypanothionreduktase ist eine in Flagellaten vorkommende Disulfidreduktase, die Glutathion-Spermidin-Konjugate reduziert. Dieser einzigartige Thiolstoffwechsel der Trypanosomen ist ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der Chagas-Krankheit. Außerdem wurden die Wirkungen von DATS auf die GR und TR untersucht. Die durchgeführten Untersuchungen hatten vier Schwerpunkte:

- Kinetische und spektroskopische Charakterisierung der Hemmung von GR und TR durch *E*- und *Z*-Ajoen.

- Bestimmung der kinetischen Daten für die 1-Elektronenreduktion von *E*-Ajoen, *Z*-Ajoen und DATS und für die 2-Elektronenreduktion des Ajoens zu Folgeprodukten durch die GR in Gegenwart von NADPH.
- Strukturaufklärung der Produkte, die bei der GR-katalysierten Reduktion von Ajoen entstehen.
- Kristallisation der ajoengehemmten GR für die Röntgenstrukturanalyse .

Ajoen hemmt kovalent die menschliche GR und die TR aus *Trypanosoma cruzi*. Die Hemmung ist zeit- und temperaturabhängig und erfolgt nur am reduzierten Enzym (EH₂- Zustand). Die GR wird schneller gehemmt als die TR. In Gegenwart von GSH bzw. T(SH)₂ wird die Hemmung der Enzyme jedoch stark verringert. Das Spektrum der ajoengehemmten GR zeigt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 460 nm in den kurzwelligen Bereich und die für den Charge-transfer-Komplex der GR typische Absorptionsbande bei 530 nm. Die Absorption bei 530 nm ist etwas geringer als im reinen EH₂-Spektrum, vermutlich aufgrund einer alternativen Konformation des Cys 63 in der ajoengehemmten GR, die keine Ausbildung des Charge-transfer Komplexes erlaubt.

Ajoengehemmte GR kristallisiert mit 18% Ammoniumsulfat bei 4°C und 20°C, die Modifikation ist über Monate stabil. Die Röntgenstrukturanalyse der ajoengehemmten GR zeigt die Bildung eines gemischten Disulfids zwischen dem Cystein 58 des aktiven Zentrums der GR und dem **CH₂=CH-CH₂-S(O)-CH₂-CH=CH-S**-Fragment des Ajoens.

Die ajoengehemmte GR hat eine deutlich gesteigerte Oxidaseaktivität. Substanzen, die durch Steigerung der 1e⁻-Übertragungskapazität ein antioxidatives Enzym in ein prooxidatives umwandeln, werden „Turncoat-Inhibitoren“ genannt. Ajoen ist das erste Beispiel für einen kovalenten Turncoat-Inhibitor der GR.

Ajoen oder eines seiner Reaktionsprodukte wird von der GR in einem 1e⁻-Schritt reduziert und wirkt als Redoxcyclus. Die GR reduziert Ajoen auch in einem 2e⁻-Schritt. Die gebildeten Hauptprodukte sind 4,5,9-Trithiadodeca-1,6,11-trien (Desoxyajoen) und 4,8,9,13-Tetrathiahexadeca-1,6,10,15-tetraen. Der stechende Geruch der Ansätze läßt als weitere Produkte Allylmercaptan oder Thioacrolein vermuten. Die Reduktion des *Z*-Isomers erfolgt mit einem k_{cat} / K_m von $6,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ deutlich schneller als die des *E*-Isomers ($k_{cat} / K_m = 425 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$). GSH beschleunigt die ajoeninduzierte NADPH-Oxidation und auch die Cytochrom C-Reduktion der GR. Die bimolekularen Umsatzraten von *Z*-Ajoen durch GR und TR aus *Trypanosoma cruzi* sind mit Literaturwerten für den Umsatz von *p*-Chinonen durch GR und TR vergleichbar.

Die schnellere Reduktion des *Z*-Ajoens durch die GR führt zu isomerspezifischen Unterschieden im Hemmverhalten. Während *Z*-Ajoen die GR schneller, aber unvollständig hemmt, wird durch *E*-Ajoen ein höherer Hemmungsgrad des Enzyms erreicht. Die Oxidaseaktivität der TR wird durch Ajoen nur leicht verstärkt.

DAS hemmt weder kompetitiv noch kovalent GR oder TR, DATS ist ein schwacher Inhibitor der TR. DATS steigert die Oxidaseaktivität der GR ($k_{cat} / K_m = 1070 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$). Die Oxidaseaktivität der TR wird durch DATS nur schwach gesteigert. Auch DATS wird vermutlich zu einem kleinen Teil zu 2e⁻-reduzierten Folgeprodukten umgesetzt. Die nachhaltige Steigerung der 1-Elektronenübertragung der GR durch DATS bei relativ hoher Stabilität der Verbindung sollte eine starke Wirkung auf den Thiolpool haben und könnte so zu der beschriebenen antiparasitären und zytostatischen Wirkung beitragen.

Die Hemmung der GR durch Ajoen bei gleichzeitiger Steigerung der Oxidaseaktivität des Enzyms sollte eine starke oxidative Belastung der Zelle darstellen. Der Verbrauch von Redoxäquivalenten, insbesondere des NADPH könnte die starke Senkung des Thiolpools in Zellen durch Ajoen erklären. Als Naturstoff besitzt Ajoen aber eine Vielzahl von Wirkungen, so daß die zytotoxische Potenz sicher eine Summe verschiedenster Effekte darstellt.

