

Stefan M. Kanzok
Dr. sc. hum.

**Die Thioredoxinsysteme von *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae* und dem Insektenmodellorganismus *Drosophila melanogaster*.
Untersuchungen zu den antioxidativen Mechanismen bei Malaria.**

Geboren am 09.19.1969 in Nürnberg
Reifeprüfung am 29.06.1990 in Bamberg
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1991 bis WS 1998
Vordiplom am 23.09.1994 an der Universität Freiburg i. Br.
Diplom am 29.04.1998 an der Universität Freiburg i. Br.

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. R. H. Schirmer

Das Thioredoxin- und das Glutathionsystem stellen in einer aerob lebenden Zelle die zentralen antioxidativen Mechanismen dar. Besonders empfindlich gegen reaktive Sauerstoffverbindungen ist der Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, der durch Mücken der Familie *Anopheles* übertragen wird.

In dieser Arbeit wurden die Thioredoxinsysteme des Erregers *Plasmodium falciparum* und der Tauflye *Drosophila melanogaster* - einer nahen Verwandten von *Anopheles gambiae* - molekularbiologisch und biochemisch untersucht und miteinander verglichen.

Die Ergebnisse ermöglichen einen Einblick in die antioxidativen Mechanismen der an der Malaria beteiligten Organismen. Außerdem stellen diese Mechanismen vielversprechende Ziele für das Design von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten dar, die durch Mücken und Fliegen übertragen werden.

Das bisher nicht beschriebene Thioredoxin-Gen des Malariaparasiten wurde *in silico* im Genom lokalisiert, aus einer cDNA Bank kloniert und rekombinant in *Escherichia coli* Zellen funktionell exprimiert. Die biochemischen Charakteristika zeigten, dass dieses Thioredoxin in Bezug auf Sequenz, Redoxpotential (-270 mV) und Funktion mit den schon bekannten Thioredoxinen anderer Organismen vergleichbar ist. Neu und biologisch-relevant ist zum einen die Tatsache, dass das *P. falciparum* Thioredoxin ein besseres Substrat für Human-Thioredoxinreduktase ist ($K_M = 2 \mu\text{M}$) als für das eigene Flavoenzym ($K_M = 10 \mu\text{M}$). Zum anderen ließ sich erstmalig eindeutig zeigen, dass Thioredoxin effektiv und in physiologisch signifikantem Maße das Glutathiondisulfid reduzieren kann: k_2 , die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung beträgt bei 37 °C etwa $1100 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$. Bei anderen von mir untersuchten Thioredoxinen, zum Beispiel bei Human-Thioredoxin, ist die Fähigkeit zur GSSG-Reduktion nicht so ausgeprägt wie bei *P. falciparum*-Thioredoxin, könnte aber dennoch eine bisher übersehene pathophysiologische Rolle spielen. Für das *P. falciparum* Thioredoxin als Antigen wurden polyklonale Antikörper gewonnen. Untersuchungen mit isoliertem Protein sowie mit Rohextrakten aus erythrozytären Stadien der Parasiten ergaben, dass das Antiserum spezifisch ist und keine Kreuzreaktionen aufweist. Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ließ sich für lebende Plasmodien zeigen, dass Thioredoxin bei allen erythrozytären Stadien gleichmäßig im Zytosol der Parasiten verteilt ist.

Mithilfe des im Internet veröffentlichten Genoms wurde eine Thioredoxinreduktase identifiziert, aus einer cDNA Bank kloniert und als aktives Enzym exprimiert. Die Thioredoxinreduktase besitzt im Gegensatz zu den orthologen Enzymen von Mensch und *Caenorhabditis elegans* im C-terminalen Bereich kein Cystein-Selenocystein-Motiv. Stattdessen finden sich hier zwei benachbarte Cysteine, die das Thioredoxin-reduzierende Zentrum bilden; *D. melanogaster* Thioredoxin-disulfid wird mit einem K_M von 7 μM umgesetzt. Die *Drosophila* Thioredoxinreduktase wird von Humanthioredoxinreduktase-spezifischen Inhibitoren kaum gehemmt. Paraquat, eine Verbindung, die eingesetzt wird, um experimentell reaktive Sauerstoffmetaboliten in Insekten zu erzeugen, hemmt das Fliegenenzym schon in geringen Dosen. Wie oben für das *Plasmodiensystem* beschrieben, kann auch Thioredoxin aus *D. melanogaster* Glutathiondisulfid reduzieren.

Auf der *in silico* Suche nach einer klassischen Glutathionreduktase in der Taufliege ergab sich, dass das Genom für kein typisches Glutathion-reduzierendes Flavoenzym codiert. Enzymaktivitätstests mit Extrakten von Zelllinien und adulten Fliegen ergaben keine Glutathionreduktaseaktivität; jedoch konnte nach Zugabe von 10 μM *D. melanogaster* Thioredoxin eine signifikante Reduktion von Glutathiondisulfid beobachtet werden. Parallelversuche mit Extrakten von *A. gambiae*-Zelllinien und adulten weiblichen Moskitos zeigten, dass wahrscheinlich auch *Anopheles* keine genuine Glutathionreduktase, sondern ein GSSG-reduzierendes Thioredoxinsystem besitzt. Dafür spricht auch die hohe Reaktivität des reduzierten *A. gambiae* Thioredoxins gegenüber GSSG. Dieses Protein wurde in rekombinanter Form dargestellt. Die phylogenetische Besonderheit des zentralen Redox-Metabolismus dipterer Insekten wurde kürzlich publiziert.

Meine Ergebnisse beschreiben verschiedene Aspekte der antioxidativen Abwehr bei Plasmodien und Dipteren. Für Organismen, die eine Glutathionreduktase besitzen, bedeutet dies, dass das Thioredoxinsystem Glutathiondisulfid ausreichend reduzieren kann, um in Extremsituationen auch in Abwesenheit aktiver Glutathionreduktase das Fließgleichgewicht zwischen reduziertem und oxidiertem Glutathion aufrecht zu erhalten. Für *Drosophila* und *Anopheles* zeigt sich, dass in einem Organismus ohne genuine Glutathionreduktase das Thioredoxinsystem die Reduktion von Glutathiondisulfid übernehmen kann.

Diese Besonderheit findet sich bemerkenswerterweise in jener Ordnung von Insekten, die für Infektionskrankheiten wie Malaria, Schlafkrankheit, Gelbfieber, Dengue oder Filariosen eine epidemiologisch-medizinische Bedeutung hat. Der Thioredoxin-gestützte Redox-Metabolismus dieser Insekten ist demnach möglicherweise ein geeignetes Ziel für spezifische biologische und chemische Maßnahmen gegen tropische Infektionskrankheiten.