

Jan Tobias Wagner
Dr. med.

Die Glutamatdehydrogenase von *Plasmodium falciparum* – Attraktives Zielmolekül einer gegen die Malaria gerichteten Chemotherapie ?

Geboren am 30.07.1974 in Saarburg
Reifeprüfung am 16.06.1993 in Saarburg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis WS 2001/02
Physikum am 09.09.1996 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Schwäbisch Hall (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg)
Staatsexamen am 06.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer.nat. R. Luise Krauth-Siegel

Die Malaria, auch als die „Königin der Krankheiten“ bezeichnet, spielt in der heutigen Zeit eine wieder zunehmend bedeutsame Rolle- auf nationaler Ebene durch die schnell ansteigende Zahl importierter Krankheitsfälle, auf internationaler Ebene auf Grund der sich mehr und mehr manifestierenden Resistenzen gegen die verfügbaren Medikamente.

Die gefürchtetste Variante der Erkrankung ist die *Malaria tropica*, die durch das Protozoon *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird.

Thema der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der NADP(H)-spezifischen Glutamatdehydrogenase aus *P. falciparum* als mögliches Zielmolekül einer gegen die Malaria gerichteten Chemotherapie.

Folgende Ergebnisse wurden hierbei erzielt:

- Das *P. falciparum* *gdh*-Gen wurde kloniert. Wie der Southern Blot zeigt, liegt das Gen in einfacher Kopie vor. Es kodiert ein Protein mit 470 Aminosäureresten und einer relativen Molmasse von 52.546 pro Untereinheit. In einem multiplen Alignment mit 17 hexameren GDHs erwiesen sich 41 Reste als in allen Sequenzen konserviert. Alle diese Reste finden sich auch in der Aminosäuresequenz der *P. falciparum* GDH. Das Enzym weist einen Anteil von ca. 58 % identischer Reste mit der GDH von *Giardia lamblia* und ca. 50 % mit den GDHs einiger Eubakterien auf. Dem hingegen findet sich nur eine geringe Übereinstimmung mit dem menschlichen Enzym, was die phylogenetische Distanz zwischen Parasiten und höheren Eukaryonten unterstreicht und die Attraktivität der *P. falciparum* GDH als mögliches Zielmolekül einer Chemotherapie erhöht.
- Das Enzym wurde in GDH- und Glutamatsynthese-defizienten *E. coli*-Zellen exprimiert. Die Präparation wurde als Ein-Schritt-Verfahren entwickelt. Sie ergab eine Gesamtausbeute von ca. 60 mg reiner GDH pro Liter Zellkultur, das entspricht einer relativen Ausbeute von ca. 70 %. Die spezifische Aktivität des reinen Enzyms beträgt ca. 76 U/mg.

- Mittels SDS-PAGE wurde die Molmasse der GDH-Untereinheit bestimmt. Es beträgt 49,5 kDa und ist identisch mit dem der authentischen *P. falciparum* GDH. Dieser Befund, zusammen mit der Tatsache, daß das *gdh*-Gen keine mitochondriale Präsequenz codiert, weist auf die zytosolische Lokalisation des Proteins hin.
- Die gelchromatographische Analyse des Proteins ergab eine Molmasse von 310000 ± 20000 Da. Dieser Wert läßt auf eine hexamere Konfiguration der *P. falciparum* GDH schließen und steht in Übereinstimmung mit dem für das authentische Protein gefundenen.
- Die kinetischen Daten des rekombinanten Enzyms stimmen sehr gut mit denen der authentischen *P. falciparum* GDH überein.
 Das pH-Optimum liegt für die Hinreaktion bei pH 8,5, für die Rückreaktion bei 7,0.
 Es ergaben sich folgende K_m -Werte: L-Glutamat 1050 ± 250 μM ; NADP^+ 20 ± 2 μM ; 2-Oxoglutarat 365 ± 25 μM ; NH_4^+ 9500 ± 600 μM ; NADPH $12,5 \pm 1$ μM .
 Hierbei fallen im Vergleich zu anderen hexameren, NADP(H)-abhängigen Enzymen der relativ hohe K_m -Wert für Ammoniumchlorid und der kleine Wert für L-Glutamat ins Auge. Dies könnte ein Hinweis sein, daß das Parasitenenzym bevorzugt in Richtung NADPH-Synthese arbeitet.
 Die k_{cat} -Werte liegen mit 470 ± 80 min^{-1} in der Hinreaktion und 3195 ± 260 min^{-1} in der Rückreaktion innerhalb des normalen Wertebereichs.
 Das Enzym ist hochgradig spezifisch für NADP(H). In Gegenwart von NAD(H) erniedrigte sich die Aktivität in der Hinreaktion auf 0,032 %, in der Rückreaktion verblieben 0,27 % Restaktivität. Die K_m -Werte für NAD^+ bzw. NADH liegen bei ca. 600 μM .
 Die *P. falciparum* GDH erwies sich als äußerst stabil gegenüber dem denaturierenden Agens Guanidiniumchlorid. Erst ab einer Konzentration von 500 μM wurde die Enzymaktivität stärker gehemmt als durch gleiche Konzentrationen an NaCl.
 Ein weiteres Merkmal des Parasitenenzym ist seine ausgesprochene Thermophilie. Das Temperaturoptimum der katalytischen Aktivität liegt für die Hinreaktion bei 50°C, für die Rückreaktion bei 60°C.
 Die Darstellung der Temperaturabhängigkeit als Arrhenius-Plot ermöglichte die Berechnung der Aktivierungsenergie ΔG^* sowie des Q_{10} -Wertes. Der Wert für ΔG^* liegt mit 16 kcal/mol im für hexamere GDHs typischen Bereich. Der Q_{10} -Wert beträgt 2,6.
- Im Zuge der durchgeführten Inhibitorstudien erwies sich das Enzym als nicht durch ADP bzw. GTP in seiner Aktivität modulierbar, wie dies bereits für andere, coenzym-spezifische GDHs nachgewiesen wurde.
 Keine Hemmung ließ sich des weiteren durch Chloroquin und Methylenblau, durch sechs Glutamatrezeptorantagonisten, durch die zyklischen Dicarbonsäuren Terephthalsäure und Cyclohexan-1,3-dicarbonsäure und den Glutamatsynthasehemmstoff Azaserin erreichen. Lediglich drei der getesteten Substanzen führten zu einem meßbaren Hemmeffekt:
 Der Glutaminsynthetasehemmstoff Phosphinotricin erwies sich als kompetitiver Inhibitor der Hinreaktion mit einem K_i -Wert von 240 μM .
 Die Aminosäure D-Glutamat ist ein kompetitiver Inhibitor der *P. falciparum* GDH mit K_i -Werten von 665 ± 25 μM in der Hin- und 470 ± 20 μM in der Rückreaktion.
 Die Dicarbonsäure Glutarat hemmt mit einem K_i -Wert von 355 ± 15 μM die Hinreaktion, während in der Rückreaktion kein klarer Inhibitionstyp zu bestimmen war. Der IC_{50} -Wert liegt hier bei 7 mM.

- Mittels stadienspezifischem Western Blot konnte gezeigt werden, daß die GDH in allen Parasitenstadien exprimiert wird, und zwar vom Ring- zum Schizontenstadium hin in zunehmender und dann im Segmenter Stadium leicht abnehmender Quantität. Die Messung der GDH-Aktivität in den verschiedenen Stadien ergab ein identisches Verteilungsmuster.
- Die *P. falciparum* GDH wurde unter zwei Bedingungen kristallisiert. Zum einen in Form von schnell entstehenden, kubischen Kristallen von 50 µm Kantenlänge, zum anderen als längliche, stufige Kristalle, die sich über 3 Wochen entwickelten und eine Größe von ca. 500 x 200 µm erreichten.