

Andreas Müssigbrodt
Dr. med.

Zur Rolle der Glutathionreduktasen von Mensch und Malariaerreger *Plasmodium falciparum* im zellulären Redoxmetabolismus

Geboren am 11.02.1975 in Bautzen
Reifeprüfung am 29.06.1993 in Bautzen
Studiengang der Zahnmedizin vom SS 1995 bis WS 1995/96
Studiengang der Medizin vom SS 1996 bis WS 2001/2002
Physikum am 19.03.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium Heidelberg und Lund (Schweden)
Praktisches Jahr in Mannheim, Paris, Neuchâtel (Schweiz)
Staatsexamen am 28.05.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. H. Schirmer

Malaria, die schon seit der Antike bekannte Infektionskrankheit, stellt auch für die moderne Medizin eine Herausforderung dar. Malaria wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen. Die Infektion mit *Plasmodium falciparum* ist die häufigste und folgenreichste Malariainfektion.

Die immunogenen Versteck- und Verwandlungsfähigkeiten des Erregers und die deshalb ausbleibende vollständige Resistenzentwicklung der infizierten Organismen, führten in Endemiegebieten zur Selektion von Menschen mit bestimmten, vererbten Enzymmerkmalen. Ein Mangel an GR sowie ihres Cofaktors Riboflavin schützt ebenso wie ein Mangel an G6PD (Favismus) vor der schweren Verlaufsform der Malaria. Die medikamentöse Erzeugung von oxidativem Stress ist eine Möglichkeit zur gezielten Behandlung der Malaria. Alle bisher bekannten Chemotherapeutika, die im Zusammenhang mit der gezielten Erzeugung von oxidativem Stress oder der Bekämpfung der Malaria stehen, sind – sofern bereits getestet – reich an gravierenden Nebenwirkungen, zu unspezifisch in bezug auf Zelltyp und Zielmolekül oder zu unwirksam.

Die Glutathionreduktase (GR) katalysiert die Reaktion



Dabei oszilliert das Protein zwischen der oxidierten Form E_{ox} und der mit zwei Elektronen reduzierten Form EH_2 . In unserem Labor wurde vor kurzem die EH_4 -Form der *P. falciparum* GR entdeckt. Diese EH_4 -Form könnte von erheblicher Bedeutung *in vivo* sein. Thema meiner Arbeit war es, die bisher eher zufällig erhaltene EH_4 -Form reproduzierbar darzustellen und ihre Eigenschaften unter quasi-physiologischen Bedingungen (pH 7,4, 37°C) mit der E_{ox} -Form und der EH_2 -Form des Enzyms zu vergleichen, um alle stabilen Zustände der *PfGR* bei pharmakologischen und pathophysiologischen Fragestellungen einbeziehen zu können. Vergleichend untersucht wurden auch jeweils Parasitenenzym (*PfGR*) und Wirtsenzym (hGR).

Kinetische Parameter der Glutathionreduktasen bei 37 °C und pH 7,4. Als Voraussetzung für Experimente unter quasi-physiologischen Bedingungen wurden die kinetischen Parameter k_{cat} und K_{m} für GSSG erstmalig bei pH 7,4 und 37°C bestimmt und mit den Literaturbedingungen (pH 6,9 und 25°C) verglichen. Die kinetischen Parameter zeigten bei den beiden pH-Werten sowohl für *PfGR* als auch für die hGR nur minimale Unterschiede. Bei 25°C betrug der K_{m} -Wert für GSSG 126 μM für die *PfGR* und 69 μM für die hGR. Bei

pH 7,4 und 37°C ergaben sich folgende Daten für *PfGR* (hGR): das K_m war 250 μM (140 μM) und das k_{cat} 19.000 min^{-1} (21.500 min^{-1}).

Die Messung der NADPH-Oxidaseaktivität der Glutathionreduktasen wurde mit 0,03 μM bis 1 μM Proteinlösungen bei 37 °C und pH 7,4 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen einerseits, dass die spezifische NADPH-Oxidaseaktivität negativ mit der Enzymkonzentration korreliert und andererseits bei der *PfGR* 3fach höher ist als bei der hGR. Die NADPH-Oxidaseaktivität beträgt für die *PfGR* 0,02 % der GSSG-Reduktase-Aktivität und für die hGR 0,009 % der GSSG-Reduktase-Aktivität.

Präparation rekombinanter Proteine für chemotherapeutische (*PfGR*) und chemisch-kinetische Studien (*P. falciparum* Thioredoxin). Für ergänzende Studien wurde die Herstellung von *PfGR* und His₆-markiertem *PfTrx* optimiert.

PfGR war in größeren Mengen nötig, um das Enzym als Target sogenannter Double Prodrugs zu testen. Diese von Davioud-Charvet entwickelten Substanzen sind Ester, deren Säurekomponente M5 - ein GR-Inhibitor - in der Fressvacuole der Malariaparasiten freigesetzt wird (Davioud-Charvet et al. 2001). Die Frage, ob M5 insbesondere an die EH₄-Form der GR bindet und deren Abbau beschleunigt, steht noch zur Bearbeitung aus. Das von mir bestimmte IC₉₀ von 25 μM bezieht sich auf das enzymatisch aktive Protein.

Das Thioredoxin diente der Überprüfung der von Kanzok vertretenen Hypothese, dass im Malariaparasiten das Thioredoxin-System die Glutathionreduktase-Aktivität unterstützen oder vertreten kann. Ich konnte bestätigen, dass die Reaktion $\text{PfTrx}_{\text{red}} + \text{GSSG} \rightleftharpoons \text{PfTrx}_{\text{ox}} + 2 \text{GSH}$ auch bei 37 °C abläuft, und zwar mit einer Geschwindigkeitskonstanten k_1 von 0,065 $\mu\text{M} \times \text{min}^{-1}$.

EH₄-Form der *PfGR*. Darstellung und Eigenschaften. EH₄ entspricht der maximal reduzierten Form der Glutathionreduktase, in der sowohl das katalytische Disulfid als auch das Flavin reduziert vorliegen. In meinen Versuchen war die Existenz einer solchen Form unter quasi-physiologischen Verhältnissen nachweisbar. Für diese Untersuchungen erwies es sich als notwendig, ein NADPH regenerierendes System (PRS; bestehend aus Glucose-6-Phosphat und G6PD) bei pH 7,4 und 37 °C kinetisch zu charakterisieren und einzusetzen.

Es stellte sich heraus, dass selbst eine hohe, PR-System stabilisierte NADPH-Konzentration nicht ausreicht, um *PfGR* vierfach zu reduzieren. Um den an der NADPH-Oxidase-Aktivität beteiligten Luftsauerstoff weitgehend, d. h. auf zellphysiologische Werte zu reduzieren, habe ich anaerobe Küvetten eingeführt, die kontinuierlich mit Stickstoff begast wurden. Unter diesen Bedingungen wurde eine vollständige Reduktion der GR zu EH₄ möglich. Der Nachweis konnte spektroskopisch erbracht und wegen des Farbverlusts auch unmittelbar sichtbar gemacht werden. Durch Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 37°C wurde die Zeit bis zum > 95 %igen Erreichen der EH₄-Form von mehreren Stunden auf 20 bis 30 Minuten verkürzt. Durch Messung der Absorption bei 540 nm konnte mithilfe der Absorptionskoeffizienten der $[\text{EH}_4]/[\text{EH}_2 \cdot \text{NADPH}]$ Quotient abgeschätzt werden. Das ϵ_{540} beträgt 2,5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für EH₄ und 8.2 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für EH₂-NADPH.

Der Nachweis der EH₄-Form ließ sich hingegen bei der hGR nicht erbringen. Auch nach mehrstündiger Versuchsdauer war sogar bei 41 °C und 50 °C kein EH₄-Spektrum angedeutet.

Denaturierung von *PfGR*-EH₄ durch Guanidiniumhydrochlorid. Die Halbwertszeit der Aktivität von EH₄ beläuft sich in Gegenwart von NADPH bei 37°C auf etwa 20 Minuten. Das Denaturans GdnHCl hat einen zusätzlichen Effekt. Bei 20 μM *PfGR* in EH₂ beträgt das EC₉₀ von GdnHCl etwa 1M. Dies weist auf eine labile Struktur der hin. Man beachte, dass die Stabilität von EH₄ nur bei sehr hohen Proteinkonzentrationen bestimmt wurde, da eine spektroskopische Kontrolle für das Vorliegen der EH₄-Form erforderlich schien.

Effekt der Kontakthelix-analogen Peptide K16_{hGR} und K16_{PfGR} auf EH₄. Um zu prüfen, ob die aneinander bindenden Kontakthelices H11 und H11' in der EH₄-Form sich trennen und ein zugegebenes komplementäres Peptid binden können, wurden die H11-analogen Peptide K16_{PfGR} (NADEIVQGFVAALKMN) und K16_{hGR} (GCDEMLQGFVAVKMG) synthetisiert und ihre Wirkung auf EH₄ getestet. K16_{PfGR} zeigte einen eher stabilisierenden Effekt, K16_{hGR} einen eher labilisierenden Effekt auf das Protein. Ein denkbarer Grund für die divergierenden Ergebnisse könnte die fehlende Ausbildung einer stabilen helikalen Struktur von K16_{PfGR} sein. K16_{hGR} könnte demnach die PfGR monomerisieren und damit *in vivo* dem Abbau zuführen. Diskutiert werden an diesem Beispiel Dimerisierungsinhibitoren als Chemotherapeutica.

Trypsin-Sensitivität. Aus Untersuchungen an den E_{ox}- und EH₂-Formen der PfGR ist bekannt, dass diese durch Trypsinbehandlung nicht inaktiviert werden.

Daher wurde – insbesondere in Hinblick auf die EH₄-Form – eine systematische Untersuchung der Trypsinsensitivität der verschiedenen Redoxzustände der PfGR interessant. Da bis jetzt noch keine EH₄-Kristalle gezüchtet werden konnten und die Schnittstellen von Trypsin bekannt sind, konnte dieses Experiment erste Hinweise über strukturelle Veränderungen der PfGR im EH₄-Status bringen. Im Gegensatz zu E_{ox} und EH₂ wird EH₄ durch Trypsinbehandlung irreversibel denaturiert. Der gleichzeitig ablaufenden reversiblen Inaktivierung durch NADPH wurde Rechnung getragen. Auch die Trypsinempfindlichkeit weist somit darauf hin, dass EH₄ eine aufgelockerte Tertiär- und Quartärstruktur hat.

PfGR-NADPH in Abhängigkeit von Temperatur, Enzymkonzentration und Glutathionkonzentration. Wie schon von Voruntersuchern beschrieben, wird die GR in Anwesenheit von NADPH und Fehlen eines Elektronenakzeptor-Substrats inaktiviert. Bei meinen systematischen Untersuchungen zu den Rahmenbedingungen (Temperatur, Enzym- und Glutathionkonzentration) dieser Inaktivierung wurden verschiedene Konzentrationen der PfGR verwendet und bei entsprechender Versuchsanordnung mit der hGR verglichen.

In Abwesenheit von NADPH konnte ich nur in der geringsten PfGR-Konzentration (0,03 µM) eine nachlassende Enzymaktivität beobachten, nach 20 min nur noch 78 % des Ausgangswertes. Bei höheren Proteinkonzentrationen (0,1-1µM) zeigten sich lediglich versuchsbedingte Aktivitätsschwankungen. Bei der hGR ergaben sich ähnliche Werte.

Demgegenüber ließen sich bei physiologischen NADPH-Konzentrationen größerer Unterschiede zwischen den beiden Glutathionreduktasen feststellen. Wiederum zeigte sich die PfGR (hGR) in der niedrigsten Konzentration von 0,03 µM am wenigsten stabil; nach 20 Minuten bei 37°C betrug die Volumenaktivität der NADPH-haltigen Probe nur noch 5 % (64 %), bei einer 1 µM Lösung hingegen 69 % (100 %).

Besonders auffällig ist der schützende Effekt von physiologischen GSH-Konzentrationen auf die PfGR, da er bei der hGR nicht nachweisbar war. 20 min nach NADPH-Zugabe betrug die spezifische Aktivität der PfGR (hGR) ohne GSH-Zusatz nur noch 5 % (64 %) der Ausgangsaktivität, während der Wert der GSH-haltigen Probe immerhin noch bei 64 % (64 %) lag.

Hydroxynonenal (HNE) als putativer Inhibitor des EH₂-NADPH-Komplexes. HNE entsteht im oxidativen Abbau bei oxidativem Stress aus ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen. Als α/β ungesättigter Aldehyd besitzt es durch Modifikation von Proteinen zahlreiche pathologische Aktivitäten. Vander Jagt et al. hatten postuliert, dass HNE die Glutathionreduktasen durch Michael-Addition an Cys58 rasch inaktiviert, was zu einem *circulus vitiosus* für die antioxidative Abwehr der Zelle führen würde. Diese Inaktivierung, die an die Anwesenheit von NADPH gebunden ist, könnte auch der Mechanismus für die chemotherapeutische Wirkung von oxidativen Chemotherapeutica bei Malaria sein.

Nach meinen Versuchen scheint der von Vander Jagt et al. bei boviner GR innerhalb der ersten 120 min festgestellte *schnelle* Inaktivierungseffekt durch HNE vor allem, oder sogar ausschließlich durch NADPH bedingt zu sein. Dafür spricht auch die bei den Autoren fehlende Kontrolle mit einer NADPH-haltigen Enzymprobe. Der ebenfalls von Vander Jagt festgestellte *langsame* Aktivitätsabfall innerhalb von 24 Stunden auf ungefähr 50 % der Ausgangsaktivität ist in meinen Experimenten sowohl bei physiologischen Konzentrationen der PfGR wie bei der hGR-Probe feststellbar. HNE scheint demnach die durch NADPH eingeleitete Inaktivierung irreversibel zu fixieren. Die *langsame* inaktivierende Modifizierung der GR durch HNE spielt wahrscheinlich in bradytrophen Zellen mit geringer oder fehlender Proteinsynthese (z.B. in Erythrozyten oder Fasern der Augenlinse) eine pathophysiologisch bedeutsame Rolle, in den Malariaparasiten hingegen sicherlich nicht.