

Michael Scheiwein
Dr.med.

Pathophysiologische und chemotherapeutische Mechanismen der Glutathionreduktase-Inaktivierung bei Malaria

Geboren am 24.09.1974 in Heidelberg
Reifeprüfung am 20.06.1994 in Sandhausen
Studiengang der Fachrichtung Medizin von SS 1996 bis SS 2003
Physikum am 25.03.1998 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Ludwigshafen, Luzern, Kapstadt und Sydney
Staatsexamen am 05.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Professor Dr. med. R. Heiner Schirmer

Im Rahmen der Dissertation wurden am Beispiel der Glutathionreduktasen (GR) des Erythrozyten (hGR) und des Erregers *Plasmodium falciparum* (PfGR) folgende Ergebnisse zur Pathophysiologie und Chemotherapie der Malaria gewonnen:

Hämin als GR-Inhibitor. Hämin ist ein in parasitierten Erythrozyten freiwerdendes toxisches Häm-Derivat. Es inhibiert physiologische Konzentrationen von hGR und PfGR reversibel und ist bei der Human-GR ein nicht-kompetitiver Inhibitor ($K_i = 1 \mu\text{M}$). Die hGR wird durch Hämin stärker gehemmt als die PfGR. Ob die Inhibition eine physiologische Rolle spielt, ist noch zu klären.

NADPH-abhängige Redoxzustände der GR. Die GR hat verschiedene Redoxzustände, z.B. E_{ox} , EH_2 und $\text{EH}_2\text{-NADPH}$. *In vitro* konnte ich bei einem hohen NADPH/NADP⁺-Verhältnis die GR in einen weiteren Redoxzustand überführen, die mit vier Elektronen reduzierte EH_4 -Form. Die Instabilität des $\text{EH}_2\text{-NADPH}$ -Komplexes könnte zum Teil durch Übergang in die EH_4 -Form bedingt sein.

Destabilisierung der Plasmodien-GR bei 40 °C. Die Human-GR erwies sich bei den Untersuchungen zur Proteinstabilität als unempfindlich gegenüber Umwelteinflüssen. Auch bei 40°C war sie in jedem Redoxzustand über längere Zeit stabil. Ganz anders verhält sich die GR von *Plasmodium falciparum*. Sie wird bei den für Malaria typischen Temperaturen von 40°C in ihrer physiologischen $\text{EH}_2\text{-NADPH}$ -Form fast vollständig inaktiviert. Dies ist wahrscheinlich einer der Pathomechanismen, durch den die gegenüber oxidativem Stress sehr empfindlichen Plasmodien bei Fieber abgetötet werden.

Struktur der Bisnitro-GR – Zur Rolle von Peroxynitrit bei Malaria. Das antimikrobielle Agens Peroxynitrit entsteht aus den Phagozytenprodukten NO und O_2^- . Es inhibiert physiologische Konzentrationen von hGR und PfGR unabhängig von deren Redoxzustand. Die PfGR kann Peroxynitrit als Substrat verstoffwechseln, verbraucht dabei allerdings hohe NADPH-Mengen. Die hGR katalysiert diese Reaktion in weit geringerem Maße. Peroxynitrit dient nicht nur als Substrat, sondern hemmt die GSSG-Reduktion durch hGR und PfGR irreversibel, und zwar unabhängig vom Redoxzustand der Enzyme. Der Mechanismus

der Hemmung konnte bei der hGR durch Absorptionsspektroskopie und Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden (Zusammenarbeit mit Savvas Savvides, Oregon State University). Methodisch interessant ist, dass das durch Peroxynitrit modifizierte Protein nur bei Temperaturen über 30°C röntgentaugliche Kristalle ergibt. Wie die Röntgenbeugungsanalyse zeigt, nitriert Peroxynitrit selektiv die beiden Tyrosine 106 und 114 im Substratbindungszentrum an der zweizähligen Molekülachse. Die modifizierten Reste sind negativ geladen und verhindern elektrostatisch die Bindung des ebenfalls negativ geladenen Peptidsubstrats Glutathiondisulfid an das Protein. Interessant ist deshalb die Frage, ob eines dieser Tyrosine in Oxidantien-aktivierten Signalketten phosphoryliert wird und somit den hypothetischen Verstärker des Redox-Signaling darstellt. Auf der Basis dieser Ergebnisse kann jetzt die Rolle der Phagozyten-gestützten GR-Nitrierung in der Pathogenese der Cerebralen Malaria untersucht werden.

Darf der GR-Inhibitor Methylenblau bei Patienten mit G6PDH-Defizienz eingesetzt werden? Genetisch-hämatologische Untersuchungen in Burkina-Faso. Die *in vitro* beobachtete Instabilität der PfGR sowie die Empfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* gegenüber oxidativem Stress sind wesentliche Grundlagen für die Medikamentenentwicklung. Methylenblau beispielsweise inhibiert selektiv die Glutathionreduktase von *Plasmodium falciparum*. Dieses gegen Malaria wirksame Chemotherapeutikum ist zur Zeit aber nur für andere Indikationen zugelassen. Als einzig gefährliche Nebenwirkung des Methylenblau gilt das Risiko von hämolytischen Krisen bei Personen mit hereditärer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Defizienz.

Deshalb habe ich Blutproben von 780 Personen in Bourasso, Burkina Faso, mit einer von mir miniaturisierten biochemischen Screening-Methode auf GR-Defizienz und G6PDH-Defizienz hin untersucht. Bei etwa 20% der Proben war eines dieser Enzyme defizient. Anschließend Tests in Gegenwart von Methylenblau ergaben aber kein erhöhtes Hämolyse-Risiko in dieser Gruppe. Wenn sich diese Ergebnisse für alle in Burkina Faso lebenden Ethnien bestätigen, stellen die dort vorherrschenden Enzym-Varianten keine Kontraindikation für die Wiedereinführung von Methylenblau als Antimalariamittel dar.