

Holger Bauer
Dr. sc. hum.

**Besonderheiten des antioxidativen Stoffwechsels bei Insekten.
Drosophila melanogaster und die Malaria­mücke *Anopheles gambiae* als Beispiele**

Geboren am 23.04.1975 in Pforzheim

Diplom der Fachrichtung Chemie am 23.02.2000 an der Universität Karlsruhe (TH)

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

Die Besonderheiten des Redoxmetabolismus der Taufliege *Drosophila melanogaster*, bei der das intrazelluläre Redoxgleichgewicht ohne das Enzym Glutathionreduktase (GR) gewährleistet werden muss, rücken die antioxidativen Enzyme und deren Mechanismen ins Blickfeld des Interesses. Das Thioredoxinsystem ersetzt zum Hauptteil die fehlende GR-Aktivität durch die GSSG-Reduktion mit Hilfe von reduziertem Thioredoxin ($\text{Trx}(\text{SH})_2$). Das Flavoenzym Thioredoxinreduktase (TrxR) ist dementsprechend für das Überleben der Fruchtfliege essentiell. Ferner spielt bei diesem Prozess wahrscheinlich auch das Glutaredoxin eine Rolle, von dem hier gezeigt werden konnte, dass es Substrat der Thioredoxinreduktase ist und dass es fähig ist, GSSG effektiv zu reduzieren. Es lässt sich somit bei *Drosophila* keine Trennlinie zwischen Thioredoxin-, Glutaredoxin- und Glutathion-System ziehen.

Die Thioredoxinreduktase von *D. melanogaster* (DmTrxR-1) wurde mit Hilfe von anaeroben Redoxexperimenten sowie Methoden der Schnellen Kinetik charakterisiert. Ferner wurde begonnen, das Enzym zu kristallisieren, um durch Röntgenbeugungsanalyse strukturelle Informationen zu gewinnen. In dem hier vorgeschlagenen Modell für den Mechanismus des Enzyms involviert der katalytische Zyklus die EH_2 - und EH_4 -Formen des Enzyms. Damit unterscheidet sich DmTrxR-1 grundsätzlich von verwandten schweren TrxRs. Die Schlüsselrolle für die Interaktion mit dem Substrat Thioredoxin kommt einem C-terminalen Redoxzentrum mit zwei sequenziell benachbarten Cysteinen zu.

Zur weiteren Charakterisierung des Thioredoxin-Systems der Fruchtfliege habe ich ein zweites Thioredoxin (DmTrx-2) und eine Thioredoxinperoxidase (DmTPx-1) kloniert, exprimiert und in ihren biochemischen Eigenschaften beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeiten ergab sich, dass DmTrx-2 ein bedeutend besseres Substrat der DmTPx-1 ist als das homologe DmTrx-1. Somit konnten zum erstenmal funktionelle Unterschiede zwischen zwei Thioredoxinen aus demselben Organismus – sogar aus demselben Zellkompartiment – nachgewiesen werden.

Ausgehend von den Kenntnissen über die Fruchtfliege wurde begonnen, das Redoxsystem des Malaria-Moskitos *Anopheles gambiae* zu charakterisieren. Auch bei diesem Insekt ist keine Glutathionreduktase im Genom codiert, und folglich war keine GR-Aktivität in Zellextrakten nachweisbar. Hingegen lassen sich im Genom und in den ESTs Sequenzen identifizieren, die für das Enzym Thioredoxinreduktase kennzeichnend sind. Die Sequenzidentitäten mit dem Ortholog in *Drosophila* betragen fast 70%, insbesondere findet sich auch in *A. gambiae* TrxR-1 das für Insekten offenbar typische Cys-Cys-Motiv des C-terminalen Redoxzentrums. Die AgTrxR-1 wurde in Zusammenarbeit mit dem EMBL kloniert, rekombinant hergestellt und mit enzymologischen sowie proteinchemischen Methoden charakterisiert.

Das Thioredoxinsystem als beherrschendes Prinzip des Thiolstoffwechsels scheint somit ein charakteristisches Merkmal bei Insekten zu sein. Das Fehlen einer GR ist aber auch von Bedeutung für *Drosophila* als Modellorganismus in der Altersforschung und der Entwicklungsbiologie. So wird der Bekämpfung reaktiver Sauerstoffspezies und der Redoxhomöostase gerade bei Alterungsprozessen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Frühere Ergebnisse, die sich auf „GR-Aktivitäten“ und „GR-Gene“ bei *D. melanogaster* beziehen, sind neu zu interpretieren, und eine einfache Übertragung auf den Menschen, der ja tatsächlich über eine GR verfügt, ist nicht möglich.

Wie die Erfolge der Vergangenheit gezeigt haben, ist das Zurückdrängen der Vektor-Insekten eine sehr effektive Methode zur Kontrolle der Malaria. Das früher in großem Maßstab eingesetzte DDT ist, wie wir heute wissen, aber leider mit ernstzunehmenden ökologischen und gesundheitlichen Risiken behaftet. Ferner haben sich gegen dieses und andere Insektizide Resistenzen verbreitet, die den Kampf gegen Mosquito und Malaria beträchtlich erschweren.

Die Besonderheiten des Insekten-Redoxstoffwechsels sowie der daran beteiligten Enzyme liefern vielversprechende Ansätze zur Entwicklung neuer Insektizide und Möglichkeiten zur Eindämmung von Malaria. Die hinreichend großen Unterschiede zwischen Insekten-TrxRs und den verwandten TrxRs aus Säugern sind eine wichtige Voraussetzung zum Design spezifischer Inhibitoren. Solche Wirkstoffe ermöglichen einen selektiven Angriff an einem Schwachpunkt des Insektenstoffwechsels. Im Idealfall könnte man solche Verbindungen sogar als Medikamente dem Menschen verabreichen und sie der Stechmücke über die Blutmahlzeit applizieren. Dies käme beispielsweise für solche Inhibitoren in Betracht, welche die Cystin-TrxRs von Malariaparasiten und Insekten, nicht aber die Selenylsulfid-TrxRs des Menschen inhibieren.