

Catharina Cora Böhme

Dr. med.

**Katalytische Intermediate bei Disulfidreduktasen von Mensch und Malariaerreger.
Beiträge zur Entwicklung synkatalytischer Inhibitoren als Chemotherapeutika.**

Geboren am 03.01.1976 in Ilshofen

Reifeprüfung am 22.06.1995 in Crailsheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis WS 2003

Physikum am an der Universität Heidelberg.

Klinisches Studium in Heidelberg.

Praktisches Jahr in München.

Staatsexamen am 28.04.03 an der LMU München.

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Frau Prof. Dr. med. K. Becker-Brandenburg

Die Thioredoxinreduktase (TrxR) und die Glutathionreduktase (GR) von Mensch und Malariaerreger sind homodimere Enzyme, die zu den pyridinnukleotidabhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen gehören. Beide sind für den Thiolmetabolismus zentrale Enzyme, die an der Redoxregulation beteiligt sind, in Signaltransduktionsvorgänge eingreifen und Entgiftungsfunktionen übernehmen. Aufgrund dieser Bedeutung eignen sie sich als Ziele für die Medikamentenentwicklung. Als Antirheumatika eingesetzte Goldverbindungen hemmen die humane TrxR in nanomolaren Konzentrationen. Methylenblau, ein seit langem bekanntes Antimalariamittel, hemmt die GR von *P. falciparum* (PfGR) in therapeutischen Konzentrationen, die humane GR dagegen erst bei einer wesentlich höheren Dosis.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden weitere Grundlagen für eine Inhibitor-entwicklung gegen Malaria erarbeitet.

Dazu wurde zunächst die Expression und Reinigung rekombinanter PfTrxR optimiert. Durch partielle Adaptation an die *Codon Usage* von *E. coli* steht das Enzym nun für alle kommenden Studien in ausreichender Menge zur Verfügung und wurde auf die Übereinstimmung seiner *Steady-State*-Charakteristika mit dem Wildtyp überprüft.

Auch die GR der Maus (mGR), die der wichtigste Modellorganismus in der Malariaforschung ist, konnte endlich rekombinant hergestellt werden, so daß ihre Reinigung in großem Umfang möglich ist. Im Zuge der Klonierung wurde die Beobachtung gemacht, daß ein Teil der

Wildtyp-mGR eine mitochondriale Ziel-sequenz aufweist. Dies wurde noch für keine andere GR nachgewiesen. Bisher ging man davon aus, daß es sich bei diesem Enzym um ein zytoplasmatisches Enzym handelt. Qualitativ unterscheidet sich die rekombinante mGR kaum von der aus Ehrlichschen Aszites Tumorzellen (EAT-Zellen) gewonnenen mGR.

Im nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit wurden während eines Projektes in Ann Arbor, Michigan, umfangreiche kinetische Studien an der PfGR und der hTrxR durchgeführt. Mit der dort zur Verfügung stehenden Methode des *Stopped flow* wurde der katalytische Mechanismus der PfGR untersucht.

Die reduktive Halbreaktion der PfGR verläuft in vier Phasen. Der Elektronentransfer vom Flavinring zum Cysteinpaar im aktiven Zentrum stellt den geschwindigkeits-limitierenden Schritt der Gesamtreaktion dar. Im *Enzyme monitored turnover* zeigte sich, daß $E_{\text{FADH}}(\text{S-S})\cdot\text{NADP}^+$, das diesem Schritt vorausgeht, und $\text{EH}_2\cdot\text{NADPH}$, das ihm nachfolgt, während der Katalyse vorherrschen.

In diesem Zusammenhang wurde die Bedeutung von EH_4 , der vollständig reduzierten Enzymform, *in vitro* erforscht. Angesichts der hohen NADPH-Konzentrationen gegenüber geringen NADP^+ -Konzentrationen ist es wahrscheinlich, daß sich durch Redoxpotentialverschiebungen signifikante Mengen an EH_4 in der Zelle ansammeln. Da EH_4 keine Rolle im katalytischen Mechanismus spielt, könnte es sich um eine *stand by*-Form handeln, in der ein Teil der vielen, unter Normalbedingungen nicht benötigten, Enzymmoleküle ihre Wartezeit verbringt.

Die oxidative Halbreaktion erschien biphasisch, die Schritte wurden als die Bildung und der Zerfall eines gemischten Disulfids (MDS) zwischen dem distalen Cystein im aktiven Zentrum und Glutathion interpretiert. Es gelang, das kinetische Gleichgewicht zwischen $E_{\text{ox}}\text{-EH}_2$ und GSSG-GSH per Computersimulation zu modellieren und so den Mechanismus der oxidativen Halbreaktion im Detail zu verstehen. Dieses Modell erlaubt quantitative Simulationen, die die zentrale Bedeutung der beiden Enzymspezies MDS und $\text{MDS}\cdot\text{GSH}$ aufzeigen. Insbesondere $\text{MDS}\cdot\text{GSH}$ akkumuliert im Verlauf der Oxidation. Die Gleichgewichtskonstante K_{Haldane} der simulierten Oxidation von EH_2 mit GSSG lag bei 0.075. Für experimentelle *Steady-State*-Daten der Hefe GR war $K_{\text{Haldane}} = 0.085$. Dies spricht für die hohe Qualität der Simulation. Mit K_{Haldane} ließ sich das Redoxpotential des $E_{\text{ox}}/\text{EH}_2$ -Redoxpaares für PfGR berechnen; es liegt bei -206 mV für pH 6.9 und 4°C und unterscheidet sich damit erheblich von dem anderer Glutathionreduktasen.

Neue Enzymspezies wie das MDS, $\text{MDS}\cdot\text{GSH}$ und EH_4 wurden charakterisiert. Dies ermöglichte Überlegungen zu unter *in vivo* Bedingungen vorherrschenden Enzymspezies. Je nachdem in welcher Situation sich Zellen befinden, verschiebt sich das Spektrum vorkommender Enzymspezies. Da Inhibitoren oft selektiv einzelne Enzymspezies angreifen, kann diese Dissertation als Richtlinie für den korrekten Einsatz von Inhibitoren gelten.

Ausgehend von dem Konzept einer 2-Komponentenmalariatherapie, bestehend aus einem GR-Inhibitor und einer in den Hämabbau eingreifenden Substanzklasse, wurden in

Zusammenarbeit mit Frau Dr. Elisabeth Davioud am Pasteur-Institut Lille Naphthochinon-Derivate synthetisiert und an den Glutathionreduktasen getestet. Obwohl noch keine Inhibitor-Substrat-Komplexe als Röntgenstruktur vorliegen, ist davon auszugehen, daß die Naphthochinone an der Interface in der dort vorhandenen Höhle binden. Die vielversprechendsten Substanzen wurden anschließend an plasmodieninfizierten Zellen auf ihre Wirksamkeit und an Leberzellen auf ihre Zytotoxizität geprüft.

An den Thioredoxinreduktasen wurde die Wirkung von Peroxynitrit untersucht. Die Rolle von Stickstoffverbindungen in der Modulation von kardiovaskulären, immunologischen und neuronalen Prozessen, wie auch in der Pathophysiologie der zerebralen Malaria, wurde in den letzten Jahren von zahlreichen Forschergruppen intensiv bearbeitet. Peroxynitrit greift als potentes Zellgift in viele Stoffwechselvorgänge ein. Neben einer Schadensbegrenzung durch Reparaturvorgänge beugen Enzyme wie die Glutathionperoxidase einer Zellschädigung durch Verstoffwechseln von Peroxynitrit vor. Auch die Thioredoxinreduktase wird im Vergleich zu vielen anderen Enzymen, wie z.B. der Glutathionreduktase, erst bei hohen Peroxynitritkonzentrationen gehemmt. Sie setzt Peroxynitrit als Substrat um und reduziert damit die in der Zelle befindliche Peroxynitritkonzentration.

Der katalytische Zyklus der hTrxR ist noch nicht im Detail geklärt. *Stopped flow*-Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Elektronentransfer vom aktiven Zentrum zum redoxaktiven C-Terminus mit dem Cystein-Selenocystein-Paar und die Übertragung der Elektronen auf das Thioredoxin über die Bildung von Disulfidbrücken erfolgt.

Im Rahmen der Dissertation gelang es weiterhin, die Bedingungen für eine Kristallisation der hTrxR weiter zu optimieren. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur sowohl des Enzyms als auch von Enzym-Substrat-Komplexen steht damit unmittelbar bevor.