

Anke Monika Fechner
Dr. med.

**Zur Pathologie des Thiolstoffwechsels:
Das Thioredoxinsystem des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* und Beiträge
zur Pathophysiologie der schweren Malnutrition**

Geboren am 16.11.1975 in Bopfingen
Reifeprüfung am 23.06.1995 in Bopfingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis SS 2003
Physikum am 24.03.1998 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Mannheim (Universität Heidelberg)
Praktisches Jahr in Ludwigsburg (Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg)
Staatsexamen am 20.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktormutter: Frau Prof. Dr. med. Katja Becker-Brandenburg

Oxidativer Stress spielt in Regulationsprozessen aerober Zellen und Organismen eine entscheidende Rolle. Er entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies einerseits und der vorhandenen antioxidativen Kapazität andererseits.

In aerob lebenden Zellen stellen die Disulfidreduktasen Glutathion- und Thioredoxinreduktase die zentralen antioxidativ wirksamen Enzyme dar, niedermolekulare Antioxidanzien und Serumproteine ergänzen den antioxidativen Schutz.

Im Rahmen dieser Arbeit war ich an der Identifizierung, heterologen Expression und Charakterisierung der Thioredoxinreduktase von *Drosophila melanogaster* beteiligt. Erst dies ermöglichte die detaillierte Untersuchung des Thioredoxinsystems des Modellorganismus *Drosophila melanogaster*.

Basierend auf einem Proteinsequenzalignment und der jetzt möglichen funktionellen Analyse des Enzyms, konnten wir zwingend zeigen, dass die 1997 von Candas *et al.* veröffentlichte Gensequenz nicht, wie seinerzeit angenommen, für eine Glutathionreduktase, sondern für eine Thioredoxinreduktase kodiert.

Bei der von uns exprimierten *DmTrxR* handelt es sich um ein homodimeres Flavoenzym mit einem Molekulargewicht von 53.7 kDa pro Untereinheit (491 Aminosäuren). Das Enzym zeigte in der kinetischen Basischarakterisierung Thioredoxinreduktase-typische Eigenschaften (K_M (NADPH) 6.5 μ M, K_M (*E.coli* Trx) 730 μ M, spezifische Aktivität 22.4 U \times mg⁻¹).

Eine Glutathionreduktaseaktivität des gereinigten Enzyms konnte ausgeschlossen werden.

Weitere in dieser Arbeit dargelegte Befunde weisen – in Übereinstimmung mit dem Fehlen einer klassischen Glutathionreduktasesequenz im *Drosophila*-Genom – darauf hin, dass die in *Drosophila melanogaster*-Extrakten nachweisbare Glutathiondisulfidreduktion indirekt durch die Thioredoxinreduktase vermittelt wird. Hierbei erscheint es am wahrscheinlichsten, dass reduziertes Thioredoxin oxidiertes Glutathion regeneriert.

Im Rahmen der Regulation des Redoxgleichgewichts aerober Organismen spielen antioxidative Schutzmechanismen, wie unter anderem das Thioredoxinsystem auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Besonders in der

Pathophysiologie der schweren Unterernährung stellt ein starkes Redoxungleichgewicht – hervorgerufen durch ein massives Defizit antioxidativer Schutzmechanismen - einen zentralen Faktor des Krankheitsgeschehens dar.

In einer von uns durchgeführten randomisierten Studie wurden verschiedene Antioxidanzien (Glutathion à 2 x 600 mg/d p.o., α -Liponsäure (ALS) à 2 x 50 mg/d p.o. und Acetylcystein à 2 x 100 mg/d p.o.) als Nahrungsergänzungen zusätzlich zur Standardtherapie verabreicht und ihre Wirkung in einer 20-tägigen Verlaufskontrolle anhand von klinischen und biochemischen Parametern evaluiert. Dabei zeigte sich, dass die Gesamtkonzentration antioxidativ wirkender Plasmabestandteile bei den Kwashiorkorpatienten - im Vergleich zu Kontrollkindern - am Aufnahmetag um mehr als die Hälfte reduziert war. Insbesondere das Gesamtprotein und hierbei vor allem das Albumin waren stark vermindert – im Gegensatz zu Bilirubin und Harnsäure, deren Konzentrationen nicht wesentlich verändert waren.

Ebenso fanden sich bei den Kwashiorkorpatienten – als starker Hinweis darauf, dass neben oxidativem auch nitrosativer Stress bei der Erkrankung eine wichtige Rolle spielt – doppelt so große Nitrit- und Nitratspiegel.

Es fanden sich zudem am Aufnahmetag stark erniedrigte Plasmakonzentrationen fast aller essentiellen sowie der funktionell wichtigen Aminosäuren Ornithin, Citrullin und α -Aminobuttersäure. Interessanterweise waren jedoch die Konzentrationen von Glycin und Histidin am Aufnahmetag, sowie im weiteren Verlauf, signifikant erhöht.

Patienten, die im Beobachtungszeitraum verstarben, zeigten am letzten Untersuchungstag als Ausdruck des fortbestehenden, stark erhöhten oxidativen Stresses signifikant verminderte Glutathion-, Gesamtprotein- und Albuminkonzentrationen.

In den Studiengruppen zeigte sich über den Beobachtungszeitraum im Vergleich zur Standardgruppe ein deutlicher Anstieg vieler antioxidativer Parameter, wie beispielsweise die Gesamtkonzentration antioxidativer Plasmabestandteile (TAOS) oder die Glutathionperoxidaseaktivität.

Von klinisch entscheidendster Bedeutung ist jedoch die Beobachtung, dass in allen drei Therapiegruppen die Letalität zum Teil deutlich unter der der Vergleichsgruppe lag.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten untermauern die wichtige pathophysiologische Bedeutung des oxidativen Stresses in der Pathogenese des Kwashiorkor. Gestützt durch die Ergebnisse der durchgeführten Therapiestudie, erscheint es sinnvoll, in Zukunft für die Behandlung einen Therapieansatz zu wählen, der die bisherige symptomatische Behandlung im Sinne der derzeitigen WHO Kriterien um die Applikation von Antioxidanzien ergänzt.