

Stephan Gromer
Dr. med.

Die Thioredoxinreduktase von Mensch und Maus - Ein Selenoenzym als Zielmolekül von Chemotherapeutika

Geboren am 27.08.1971 in Heidelberg
Reifeprüfung am 11.06.1991 in Östringen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 93 bis SS 99
Physikum am 29.03.1995 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Bad Mergentheim und Canberra (ACT, Australien)
Staatsexamen am 11.10.1999 in Bad Mergentheim (Universität Heidelberg)

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Frau Prof. Dr. med. Katja Becker-Brandenburg
Herr Prof. Dr. med. R. Heiner Schirmer

Die homodimere Thioredoxinreduktase ($\text{TrxS}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{NADP}^+$) gehört - wie Glutathionreduktase, Liponamiddehydrogenase und Quecksilber(II)ionenreduktase - zur Familie der pyridinnukleotidabhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen. Als zentrales Enzym des zellulären Thiolmetabolismus ist sie an der für die Zellteilung erforderlichen Desoxyribonukleotidsynthese ebenso beteiligt wie an der Redoxregulation intra- und extrazellulärer Prozesse, aber auch an der Entgiftung von Alkylhydroperoxiden und endogenem NK-Lysin.

Funktionelle Veränderungen des Thioredoxinsystems bei unterschiedlichen Krankheitsbildern bestätigen die Rollenvielfalt der Thioredoxinreduktase.

Kurz vor Beginn der vorliegenden Dissertation wurde die Aminosäuresequenz der Human-TrxR bekannt; daraus ließ sich vermuten, daß das Enzym mit dem detailliert untersuchten Enzym aus *Escherichia coli* wenig mechanistische und strukturelle Gemeinsamkeiten hat. Hieraus ergab sich einerseits, daß bisher als selbstverständlich geltende Analogieschlüsse nicht zulässig sind, andererseits wurden bakterielle Thioredoxinreduktasen zu vielversprechenden Zielmolekülen für Antibiotika.

Ziele meiner Arbeit waren die Optimierung der Reinigung der Human-TrxR im Milligramm-Maßstab, Untersuchungen zum Mechanismus der Enzymkatalyse und Inhibitorstudien sowie die Kristallisation des Enzyms für röntgenstrukturanalytische Untersuchungen.

Ein effektives und reproduzierbares Verfahren zur Reinigung der Human-TrxR aus Plazenta wurde entwickelt. Aus etwa 500 g läßt sich nun 1 mg reines Enzym mit einer Reinheit >99% und einer spezifischen Aktivität von 42 U/mg isolieren.

Diese Methode wurde in leicht modifizierter Form auch auf die Reinigung der TrxR aus Ehrlichschen Aszites-Tumorzellen der Maus übertragen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß beide isolierten Enzyme, die TrxR des Menschen und der Maus, je ein Äquivalent FAD und Selen pro Untereinheit enthalten. Das Vorkommen von Selenocystein im C-terminalen Bereich der hTrxR erklärt die bisher vergeblichen Versuche verschiedener Arbeitsgruppen, das Enzym in einem heterologen System zu exprimieren.

Im zweiten Schritt der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit L. David Arscott und Charles H. Williams Jr., Ann Arbor, umfangreiche kinetische Untersuchungen an der

gereinigten Human-TrxR durchgeführt. Auf dieser Basis konnte ein detailliertes Modell mit 11 Redox-Transienten zum katalytischen Zyklus des Enzyms entwickelt werden. Zentraler Bestandteil des postulierten Mechanismus ist die abschließende Übertragung der vom NADPH stammenden Reduktionsäquivalente auf Thioredoxin und andere Zielsubstrate durch den *beweglichen* C-terminalen Arm der TrxR, der das redoxaktive Selenocystein enthält. Dieses mechanistisch neuartige Katalysemodell kann das ungewöhnlich breite Substratspektrum der TrxR von Säugetieren erklären.

Ausgehend von Literaturberichten und Besonderheiten der Selen-Chemie wurden verschiedene klinisch verwendete Medikamente als Inhibitoren der isolierten Human-TrxR getestet. Bei einer Reihe von Substanzen, beispielsweise den Dicarbonsäuren, war keine relevante Hemmwirkung erkennbar. Dagegen erwiesen sich cytotatisch wirksame Nitrosoharnstoffe vom BCNU-Typ sowie die antirheumatisch wirkenden Goldverbindungen Auranofin und Aurothioglucose als exzellente Inhibitoren. Beide Substanzklassen greifen selektiv die *in vivo* vorherrschende NADPH-reduzierte Form des Enzyms an und blockieren sie.

Am Beispiel des Auranofin-TrxR-Komplexes ließ sich ein von Morrison und Walsh 1988 aufgestelltes mathematisches Modell für *tight-binding*-Inhibitoren experimentell belegen. Darüberhinaus kann die extrem starke Hemmwirkung von Auranofin in nanomolaren Konzentrationen erstmalig wesentliche *in vivo* Effekte dieses Medikamentes erklären.

Ex iuvantibus unterstützen meine Befunde die von anderen Autoren entwickelte Hypothese, daß sezerniertes Thioredoxin in reduzierter Form als Cytokin eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, des Sjögren-Syndroms und verwandter Autoimmunerkrankungen spielt. Somit wurde erstmalig die Therapie dieser Erkrankungen im Zusammenhang mit ihrer Pathogenese diskutiert, was zu neuen systematischen Forschungsansätzen führen könnte.

Im Rahmen der Dissertation gelang es weiterhin, Einzelkristalle der Human-TrxR zu züchten. Eine Aufklärung der dreidimensionalen Struktur sowohl des Enzyms als auch von Enzym-Inhibitor-Komplexen ist auf der Grundlage dieser Vorarbeiten in absehbarer Zeit zu erwarten. Dies sollte die Entwicklung selektiverer Inhibitoren mit größerer therapeutischer Breite erlauben.

Die vollständige Arbeit und Veröffentlichungen stehen unter <http://www.gromer.purespace.de> zum download bereit.