

Henning Hillebrand
Dr. med.

Eine neue Klasse von Peroxidasen im Trypanothion-Stoffwechsel von *Trypanosoma brucei* – funktionelle und strukturelle Charakterisierung

geboren am 06. September 1975 in Sögel
Staatsexamen am 12. Mai 2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. R. Luise Krauth-Siegel

Trypanosoma brucei ist ein eukaryoter, parasitärer Einzeller, der zusammen mit *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania spp.* der Ordnung der Kinetoplastiden zugerechnet wird. *Trypanosoma brucei gambiense* ist der Erreger der eher chronisch verlaufenden westafrikanischen humanen Trypanosomiasis oder Schlafkrankheit, während *T.b. rhodesiense* die akute ostafrikanische Schlafkrankheit verursacht. *T. b. brucei* führt bei Rindern zur Nagana-Krankheit und ist nicht humanpathogen. Die Mehrzahl der Medikamente, die zur Therapie der Schlafkrankheit eingesetzt werden, wurde bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelt. Resistenzentwicklung, eingeschränkte Verfügbarkeit der neueren Substanzen sowie eine teilweise hohe Rate an lebensbedrohlich verlaufenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen erschweren die Therapie der humanen Trypanosomiasis.

Attraktive potentielle Zielmoleküle für neue antitrypanosomale Verbindungen bietet der Redoxmetabolismus der Parasiten, der die Zellen vor oxidativen Einflüssen durch reaktive Sauerstoffspezies schützt, wie sie vom menschlichen Immunsystem produziert werden. Im Mittelpunkt steht bei Trypanosomen das Dithiol Trypanothion, das Reduktionsäquivalente für verschiedene Stoffwechselwege bereitstellt. Trypanothion bildet als Elektronendonator zusammen mit dem Enzym Trypanothionreduktase und dem Thiol Tryparedoxin sowie einer Peroxiredoxin-Peroxidase eine Reaktionskaskade, die die Reduktion von Hydroperoxiden katalysiert. Glutathionperoxidasen als Bestandteil dieses Stoffwechselweges waren bislang in Trypanosomatiden nicht bekannt.

Im Genom von *T. brucei* findet sich eine Sequenz, die Strukturhomologien zu klassischen Glutathionperoxidasen in anderen Organismen aufweist. Das Gen wurde kloniert und sequenziert, das Protein rekombinant hergestellt und enzymkinetisch charakterisiert. Der betreffende Genlocus beinhaltet drei nahezu identische Kopien. Die dritte Kopie kodiert für das mit 176 Basenpaaren längste Protein, das als *T. brucei* Peroxidase III bezeichnet wurde. Das Protein ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 20.000 und wird in allen Lebensstadien des Parasiten exprimiert. N-terminal trägt es ein mitochondriales und C-terminal ein vermutlich glykosomales Targeting-Peptid, ist allerdings nur cytosolisch und mitochondrial nachweisbar. Die deutlichste Sequenzübereinstimmung besteht gegenüber einem Protein in *Trypanosoma cruzi*, während von den humanen Glutathionperoxidasen die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase PHGPx die größte Ähnlichkeit aufweist. Im Unterschied zu den klassischen Glutathionperoxidasen, die ein Selenocystein im aktiven Zentrum tragen, ist dieser Aminosäurerest bei *T. brucei* PxIII durch Cystein ersetzt. Derartige Enzyme sind für zahlreiche Spezies beschrieben, ihre katalytischen Eigenschaften überwiegend unbekannt.

Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten Peroxidase wurden mittels Einzelkurvenprogressionsanalyse untersucht. PxIII zeigte Peroxidaseaktivität, die jedoch mit Glutathion als

Elektronendonator nur gering ausfiel. Höhere Aktivitäten wurden mit Thioredoxin anstelle von Glutathion erzielt. Eine Steigerung der enzymatischen Aktivität um fünf Größenordnungen ergab schließlich das Trypanothion/Tryparedoxin-System als Thiolsubstrat. Die Peroxidase katalysiert effizient die Reduktion verschiedener Hydroperoxide wie H_2O_2 , *t*-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid und ist in der Lage, *in vitro* die 2-Cys-Peroxiredoxin-Peroxidasen funktionell vollständig zu ersetzen. Die *T. brucei* PxIII zeigt einen Ping-Pong-Mechanismus, bei dem es nicht zur Ausbildung von Enzym-Bisubstrat-Komplexen kommt. Da die Peroxidase kein klassisches Sättigungsverhalten aufweist, nehmen K_M und V_{\max} folglich unendliche Werte an.

Angesichts der marginalen Aktivität der *T. brucei* PxIII mit Glutathion handelt es sich um ein Protein, das zwar strukturell den Glutathionperoxidasen ähnlich ist, funktionell aber eine Trypanothion-abhängige Tryparedoxinperoxidase darstellt. Damit tritt neben die bekannten 2-Cys-Peroxiredoxine mit der Peroxidase III ein Vertreter einer neuen, zweiten Klasse von Peroxidasen des Trypanothionstoffwechsels von *Trypanosoma brucei*.