

Heiko Rainer Merkle

Dr. med.

Redoxin-Netzwerke des infizierten Erythrozyten bei Malaria. Humanes St-Thioredoxin, Peroxynitrit und Methylenblau als molekulare Sonden

Geboren am 28.12.1974 in Malsch

Staatsexamen am 24.10.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Heiner Schirmer

Redoxine wie Thioredoxin und Glutaredoxin sind Proteine mit etwa 100 Aminosäuren, die durch die Sequenz -Cys-X-X-Cys- im aktiven Zentrum gekennzeichnet sind. Sie spielen eine entscheidende Rolle für das Milieu von Zellkompartimenten, insbesondere für die Stabilisierung essentieller Thiolgruppen in Proteinen und Coenzymen, aber auch als Elektronendonatoren für die Reduktion von Nukleotiden zu Desoxynukleotiden oder von Peroxiden zu Wasser.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Redoxine des Malariasystems rekombinant dargestellt und als Redoxsysteme charakterisiert. Mithilfe neu entwickelter Assays wurde erstmalig nachgewiesen, dass Redoxine untereinander kommunizierende Systeme bilden und sich in reversiblen Reaktionen wechselseitig im reduzierten Zustand halten können:



Die Gleichgewichtskonstanten für Reaktionen dieses Typs lagen zwischen 1 und 4, die Geschwindigkeitskonstanten für Hin- und Rückreaktion zwischen 20 und 250 M⁻¹ s⁻¹. Es handelt sich also um leicht reversible Reaktionen. Unter physiologischen Bedingungen wird A-RedoxinS₂ durch NADPH in einer Thioredoxinreduktase-abhängigen Reaktion zu A-Redoxin(SH)₂ regeneriert.

Medizinisch besonders wichtig ist das Humanthioredoxin1, das zusätzlich noch eine Rolle im Eisen-Schwefel-Cluster-Stoffwechsel spielt. Gerade dieses Protein ist wegen seiner 5 Cysteinreste und der Tendenz, über Cys73 und Cys73' verbrückte inaktive instabile Dimere zu bilden, der systematischen Bearbeitung schwer zugänglich. Deshalb habe ich die Mutante St-Trx1 konstruiert, rekombinant hergestellt und charakterisiert. St-Trx1 enthält anstelle von Cys73 einen Serinrest und zudem einen Hexahistidyl-Henkel (tag) am N-Terminus. St-Trx1, ein stabiles und robustes Protein, wurde als Reaktionspartner von Thioredoxinreduktasen und Redoxinen untersucht. Die Geschwindigkeitskonstante k_{+1} für die Reaktion $\text{St-Trx1(SH)}_2 + \text{GSSG} \rightarrow \text{St-Trx1S}_2 + 2 \text{GSH}$ bei 25°C war $k_{+1} = 150 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und damit ebenso groß wie für die Reaktion, in der der Wildtyp (Trx1-wt) eingesetzt wurde. Am Beispiel des St-Trx1 wurde erstmals gezeigt, dass auch das Redoxpaar Glutathiondisulfid / 2GSH mit Redoxinen in *reversiblen* Reaktionen interagieren kann, also auch in folgender Richtung:

$2 \text{ GSH} + \text{RedoxinS}_2 \rightarrow \text{GSSG} + \text{Redoxin(SH)}_2$. Der k_1 -Wert bei 37°C für diese Reaktion ist nach meinen Messungen zwar nur $16 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, aber dies könnte für die primäre Aktivierung von Redoxinen in Signalketten ausreichen.

Die Daten lassen sich auch zur Bestimmung der Redoxpotentiale unter Standardbedingungen (E°) anwenden. Für St-Trx1 ergab sich bei 25°C und pH 7,0 ein Wert von -251 mV . Die Werte für Thioredoxine und Glutaredoxine bei Insekten (Taufliegen) und *P. falciparum* lagen zwischen -247 mV und -265 mV , wobei sich für die Glutaredoxine immer höhere, d.h. weniger negative Werte ergaben, als für die Thioredoxine aus demselben Organismus.

Ein infektiologisch wichtiger Inhibitor der Redoxin-Netzwerke in Pathogenen ist Peroxynitrit (ONOO^-), welches von Neutrophilen und Makrophagen des Menschen gebildet wird. Peroxynitrit wirkt nicht nur als Oxidans von Dithiolen, sondern führt auch zur irreversiblen Nitrierung von Tyrosinresten; wie hier gezeigt, gilt dies auch für Thioredoxinreduktasen und Thioredoxine.

Methylenblau – ein Medikament, welches wir gegenwärtig in Kombination mit anderen Antimalariamitteln in Burkina Faso testen – wurde als Inhibitor untersucht. Als neuer Befund ergab sich, dass Methylenblau bei klinisch relevanten Konzentrationen die Thioredoxinreduktasen inhibiert (IC_{50} für Human-TrxR = $30 \mu\text{M}$, IC_{50} für *Plasmodium falciparum*-TrxR = $43 \mu\text{M}$). Diskutiert wird, ob Methylenblau als Redoxpendler die Dithiole von Redoxinen reversibel oxidiert und so zum oxidativen Stress im Parasiten und in menschlichen Wirtszellen beiträgt. Meine Ergebnisse legen darüber hinaus nahe, dass Methylenblau als Substrat der Thioredoxinreduktasen durch NADPH reduziert wird. Ein Nebenbefund: Bei der Kristallisation des Methylenblau-Glutathionreduktase-Komplexes ergab sich, dass Methylenblau auch bei physiologischen Konzentrationen teilweise als Dimer vorliegt (K_{diss} für das Dimer beträgt $170 \mu\text{M}$).

Als Basis und Begleitung der Therapiestudien mit Methylenblau waren klinisch-biochemische Tests zu entwickeln oder für Feldstudien in Westafrika zu adaptieren. Im Rahmen meiner Arbeit sind zuverlässige und bezahlbare diagnostische Tests für das Screening auf Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Defizienz (G6PD-Defizienz, hereditärer G6PD-Mangel Typ A⁻) und Glutathionreduktase-Insuffizienz beschrieben.