

Michael Filser  
Dr. med.

## **Klonierung, Überexpression und Beiträge zur funktionellen Charakterisierung eines Monothiol-Glutaredoxins aus *Trypanosoma brucei***

Geboren am 20.07.1977 in Heidelberg  
Staatsexamen am 17.05.2006 an der Universität Heidelberg

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

Die im Jahr 1999 erstmals beschriebenen, ubiquitär vorkommenden 1-Cys-Glutaredoxine enthalten in ihrem vorhergesagten aktiven Zentrum anstelle des für Glutaredoxine klassischen C-P-Y-C Dithiolmotivs ein C-G-F-S Monothiolmotiv. Im Rahmen des *T. brucei* Genomprojekts wurden Sequenzen für zwei 2-Cys-Glutaredoxine und drei 1-Cys-Glutaredoxine entdeckt, wobei zu Beginn der Arbeit nur die Sequenz für eines der drei Monothiol-Glutaredoxine vorlag. Amplifikation des Gens aus cDNA zeigte, dass die mRNA des *T. brucei* „1-Cys-Glutaredoxins-1“ erst mit dem dritten Methionin nach einem Stop-Codon beginnt. 1-Cys-Glutaredoxin-1 enthält ein untypisches C-A-Y-S Motiv im vermutlichen aktiven Zentrum und wird als mitochondriales Protein vorhergesagt. Das Gen wurde ohne mitochondriale Präsequenz ( $\Delta$  41 Aminosäuren) in *E. coli* kloniert und überexprimiert. Aufgrund einer N-terminalen His<sub>6</sub>-Modifikation konnte das rekombinante Protein an einer Kobaltaffinitätsäule aufgereinigt werden (99 % reines Protein mit einer Ausbeute von 7 mg/100 ml Zellkultur). Das authentische Protein hat ohne mitochondriale Präsequenz eine berechnete Masse von 16 kDa. Rekombinantes 1-Cys-Glutaredoxin-1, das infolge Lagerung zu kovalenten Dimeren und Polymeren oxidiert war, ließ sich nur langsam durch Glutathion oder Trypanothion reduzieren. Deutlich beschleunigt wurde die Reaktion dagegen durch Zugabe der strukturverwandten Dithiolproteine *T. brucei* Tryparedoxin, Thioredoxin oder *E. coli* Glutaredoxin 1. Kinetische Konstanten konnten für diese Reaktionen nicht ermittelt werden, da kein Substrat bekannt ist, das ein Monothiol-Glutaredoxin kontinuierlich oxidiert, ohne die Messung zu beeinflussen. Ähnlich der Peroxidasen in Trypanosomatiden wird *T. brucei* 1-Cys-Glutaredoxin-1 *in vivo* vermutlich über ein Trypanothion-abhängiges Dithiolprotein im reduzierten Zustand gehalten.

*T. brucei* 1-Cys-Glutaredoxin-1 wurde in verschiedenen – für klassische Glutaredoxine typischen – Assays untersucht: Das rekombinante Protein zeigte wie alle bisher charakterisierten Monothiol-Glutaredoxine keine Aktivität im klassischen HEDS Assay (Monothiolmechanismus), dem sensitivsten und spezifischsten Nachweisverfahren von Glutaredoxinaktivität. Auch eine modifizierte Versuchsanordnung unter Verwendung des Thioredoxinsystems zur kontinuierlichen Reduktion des 1-Cys-Glutaredoxins-1 erbrachte keine Aktivität. Dies schließt eine geschwindigkeitslimitierende Reduktion des Proteins durch Glutathion als Erklärung für die fehlende Aktivität aus. Erstmals wurde ein 1-Cys-Glutaredoxin im Ribonukleotid-Reduktase Assay untersucht. Da die Reaktion einem Dithiolmechanismus folgt, zeigte das *T. brucei* Protein erwartungsgemäß keine Aktivität. Weitere Assays ergaben, dass 1-Cys-Glutaredoxin-1 weder als allgemeine Proteindisulfid-Oxidoreduktase (Insulin-Reduktase Assay) noch als Tryparedoxin-abhängige Peroxidase fungiert. Die *in vitro* beobachtete diskrete Fähigkeit, Proteinsulfensäuren zu reduzieren, dürfte in Anbetracht des deutlich aktiveren und mit mindestens 100  $\mu$ M hoch konzentrierten Tryparedoxins *in vivo* von untergeordneter Bedeutung sein.

*T. brucei* 1-Cys-Glutaredoxin-1 ließ sich sowohl in prozyklischen Zellen (Insektenstadium) als auch in Blutstrom-Parasiten in einer hohen Konzentration von mindestens 3,5 bzw. 7,5  $\mu\text{M}$  nachweisen. Western Blots nach Zellfraktionierung und mit isolierten Mitochondrien bestätigten, dass 1-Cys-Glutaredoxin-1 in prozyklischen und sehr wahrscheinlich auch in Blutstrom-Parasiten mitochondrial vorliegt. In Zusammenarbeit mit Prof. E. Herrero, Lleida, Spanien wurde gezeigt, dass die mitochondriale Präsequenz des *T. brucei* Proteins in *S. cerevisiae* funktionell ist. In  $\Delta\text{grx5}$  Hefe-Mutanten konnte die Expression des *T. brucei* 1-Cys-Glutaredoxins-1 den pathologischen Phänotyp nicht verhindern, obwohl die Funktion von Monothiol-Glutaredoxinen konserviert ist. Weitere Untersuchungen werden erweisen müssen, ob 1-Cys-Glutaredoxin-1 essentiell ist und ob 1-Cys-Glutaredoxin-2, das ebenso mitochondrial vorhergesagt wird, die Funktion des *S. cerevisiae* Glutaredoxins 5 übernehmen kann und so Rückschlüsse auf den trypanosomalen Stoffwechsel zulässt.