

Jana Katarina Eubel

Dr. med.

## **Interaktionen von Methylenblau mit antioxidativen Systemen malariaparasitierter Zellen**

Geboren am 17. Juni 1981 in Göttingen

Staatsexamen am 26. Juni 2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

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

Methylenblau (MB) ist ein für die Therapie der Malaria wiederentdeckter und vielversprechender Wirkstoff. Als BONARIA-Medikament ist es sicher, wirksam, erschwinglich, zugelassen und international verfügbar.

MB greift in die antioxidativen Abwehrsysteme der menschlichen Wirtszelle und von *P. falciparum* ein, die für Entwicklung und Verlauf einer Malariainfektion bedeutend und als pharmakologische Angriffspunkte in der Malariatherapie etabliert sind.

Sein Verhalten in der Zelle ist das eines Redoxpendlers: MB wechselt zwischen seiner oxidierten blaugefärbten Form MB und seiner zwei-Elektronen reduzierten farblosen Form Leukomethylenblau (LMB), ohne verbraucht zu werden, wobei die Oxidation mit der Bildung von  $H_2O_2$ , einem *reactive oxygen species*, verbunden ist. LMB ist einziger Metabolit von MB und erweitert durch seine veränderten biochemischen Eigenschaften dessen Aktionsradius.

### **Methylenblau als subversives Substrat.**

Für die im Zentrum der zellulären antioxidativen Abwehr stehenden Disulfidreduktasen Glutathionreduktase (GR) und Thioredoxinreduktase (TrxR) ist MB ein nicht-kompetitiver Inhibitor. Unter physiologischen Bedingungen wichtiger ist jedoch seine Eigenschaft als subversives Substrat dieser Enzyme. Nach enzymkatalysierter Reduktion von MB zu LMB wird letzteres unter aeroben Bedingungen und bei einem pH von 7,0-7,4 sofort wieder zu MB autooxidiert. In jedem Reaktionszyklus werden NADPH und  $O_2$ , die im *P. falciparum* Metabolismus benötigt werden, verbraucht, und  $H_2O_2$  wird gebildet. Die physiologische, antioxidative Funktion der Enzyme wird ins Gegenteil verkehrt, sie verhalten sich nun prooxidativ. Der  $k_{cat}$ -Wert für MB und die *P. falciparum*-GR beträgt 1,6 % des Wertes für das

physiologische Substrat GSSG, für die *P. falciparum*-TrxR 12 % des Wertes für Thioredoxindisulfid. Unter physiologischen Bedingungen kommt beiden Enzymen eine gleich große Bedeutung bei der Umsetzung von MB zu.

### **Zelluläre Reduktantien vermögen den Redoxpendlerzyklus spontan in Gang zu setzen.**

Dies gilt für NAD(P)H und Dithiole wie reduziertes Thioredoxin und Dihydroliponamid, die MB mit Geschwindigkeitskonstanten von  $k = 4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (NAD(P)H),  $8,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Thioredoxin) und  $53 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Dihydroliponamid) bei pH 7,4 und 25°C reduzieren. Dagegen läuft die Reduktion von MB durch GSH, dem quantitativ wichtigsten Antioxidans der Zelle, unter physiologischen Bedingungen nur sehr langsam ab.

### **Naphthazarine sind ebenfalls subversive Substrate der Disulfidreduktasen.**

Als Partner für einen doppelköpfigen Wirkstoff mit dem Vorteil eines pleiotropen Angriffs für MB bieten sich die hier untersuchten Naphthazarinderivate an, die Inhibitoren und/oder subversive Substrate der Human-GR und Human-TrxR sind.

### **Rekombinante Darstellung der Selenocystein-haltigen Human-Thioredoxinreduktase.**

Das für Messungen mit MB benötigte Selenoenzym Human-TrxR wurde aus Plazenta präpariert und alternativ rekombinant gewonnen. Die Grundlage für die rekombinante Darstellung war ein Plasmid, das die mit einer Variante des bakteriellen SECIS-Elements der Formiatdehydrogenase-H aus *E. coli* fusionierte TrxR-Sequenz trägt. Zusätzlich wurde der die Human-TrxR exprimierende *E. coli*-Klon mit einem Plasmid transformiert, das die für die Selenocystein-Bereitstellung erforderlichen *selA*-, *selB*- und *selC*-Gene unter Kontrolle ihrer endogenen Promotoren trägt. Eine Steigerung der spezifischen Aktivität der rekombinant gewonnenen Human-TrxR ist durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen, aber auch von molekularbiologischer Seite möglich.

### **Mutagenese-Studien zum Mechanismus der Disulfidreduktasen als Targets von Methylenblau.**

Die Möglichkeit, Human-TrxR rekombinant darzustellen, ebnet den Weg für Mutationsstudien, die nicht das Sec<sup>498</sup> betreffen. So konnte die Rolle des in der Familie der homodimeren NADPH-abhängigen Flavoenzyme hochkonservierten Glu<sup>477</sup> im katalytischen Zyklus der Human-TrxR bestätigt werden: Glu<sup>477</sup> bildet mit His<sup>472</sup> das Zentrum einer katalytischen Triade, die von Cys<sup>59</sup> zu Sec<sup>498</sup> und zu Cys<sup>32</sup> des zu reduzierenden Substrats Thioredoxin wechselt. Das Studium des katalytischen Zyklus der Disulfidreduktasen verdeutlicht, wie viele Intermediate eines Zielmoleküls zu charakterisieren sind, um den eigentlichen Angriffsort eines Medikaments zu identifizieren.