

Patricia Begas
Dr. med.

Identifizierung eines alternativen Katalysemechanismus und potentiellen Glutathion-Aktivators im Modellenzym Glutaredoxin 7 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Fach: Infektiologie
Doktorvater: apl. Dr. rer. nat. Marcel Deponte

Glutaredoxine gehören zu den Oxidoreduktasen, welche die Reduktion von Disulfidbindungen, bevorzugt von glutathionylierten Substraten, katalysieren. Seit ihrer erstmaligen Beschreibung in den 1950er Jahren sind Isoformen in einer Vielzahl von Organismen entdeckt worden. Bisher konnte ihre Beteiligung an zahlreichen (patho-)physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Apoptoseregulierung, gezeigt werden. Charakteristisch für das aktive Zentrum von Glutaredoxinen ist ein CxxC/S Motiv. Abhängig von der Anzahl der dort befindlichen Cysteinreste erfolgt eine Einteilung in Monothiol- und Dithiolglutaredoxine. N-terminal des aktiven Zentrums befindet sich in vielen Glutaredoxin-Isoformen ein konservierter Lysinrest. Während Dithiolglutaredoxine eine Aktivität bei der Umsetzung des Modellsubstrats HEDS zeigen, sind die meisten Monothiolglutaredoxine in diesem Assay inaktiv. Eine Ausnahme bilden die beiden Monothiolglutaredoxine Grx6 und Grx7 aus *Saccharomyces cerevisiae*, weshalb diese sehr gut als Modellenzyme geeignet sind. Kinetische Studien an Glutaredoxinen mit anderen Substraten als HEDS, wie zum Beispiel GSSCys, ließen bisher einen typischen Ping-Pong-Mechanismus vermuten, wohingegen sich im HEDS Assay stets kreuzende Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm gemäß eines sequentiellen Mechanismus zeigten. Da im HEDS Assay zunächst GSH und HEDS das gemischte Disulfid GSSEtOH bilden, welches wiederum mit einem Molekül GSH zu GSSG und 2-ME reagiert, wurde das sequentielle Muster bisher als Ausdruck einer nicht-enzymatischen Reaktion zwischen HEDS und GSH interpretiert.

In dieser Arbeit wurden weitere mögliche Ursachen für das besondere kinetische Muster des HEDS Assays untersucht sowie, anhand von Mutationsstudien, der konservierte Lysinrest charakterisiert. Eine potentiell erniedrigte GSH Konzentration für die zweite Reaktion des HEDS Assays, welche zu einer Limitierung des weiteren Reaktionsablaufs und einer Abweichung im Ping-Pong-Mechanismus führen könnte, wurde anhand mathematischer Modellierungen ausgeschlossen. Ebenso konnte mithilfe des GSSEtOH Assays gezeigt werden, dass die kinetischen Muster nicht auf einer simultanen Bindung von GSH und GSSEtOH am Enzym beruhen. Anhand von Inhibitionsstudien konnte 2-ME als schwacher kompetitiver Inhibitor ausgemacht werden, wobei er nicht stark genug ist, um eine Konversion der parallelen Geraden des GSSEtOH Assays in kreuzende Geraden hervorzurufen. Eine GST-ähnliche Umsetzung von HEDS und GSH erscheint aufgrund der Inaktivität von *ScGrx7* im CDNB Assay ebenfalls unwahrscheinlich. Insgesamt lassen die Ergebnisse auf einen alternativen Ping-Pong-Mechanismus mit direkter Umsetzung von HEDS und GSH durch *ScGrx7* schließen, wobei beide Substrate um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren und Grx-SSEtOH als Intermediat gebildet wird.

Der Einfluss verschiedener Mutationen des konservierten Lysinrestes K105 von *ScGrx7* auf die katalytische Aktivität wurde im HEDS und GSSCys Assay verglichen. Im HEDS Assay waren die Effekte auf die k_{cat} Werte am größten. Diese nahmen umso stärker ab, je mehr sich der mutierte Rest in Ladung und Form vom ursprünglichen Lysinrest unterschied. Neben einer Stabilisierung der Enzymspezies Grx-S⁻ könnte K105 hier eine Funktion als Glutathion-Aktivator übernehmen. Dieser Einfluss ließ sich insgesamt auch im GSSCys Assay beobachten, wobei die Argininmutante in der Lage zu sein scheint Teile der Funktionen des Lysinres-

tes zu übernehmen. Im Gegensatz zum HEDS Assay zeigten die eingefügten Mutationen hier allerdings auch einen ausgeprägten Einfluss auf die K_m^{app} Werte, was am ehesten auf die unterschiedlichen Reaktionsmechanismen beider Assays zurückzuführen ist.

Neben dem traditionellen Katalysemechanismus mit einer glutathionylierten Zwischenpezies wurden für Glutaredoxine bisher zwei verfeinerte Reaktionsmodelle, welche die unterschiedliche Geometrie der Glutathionreste berücksichtigen, diskutiert. Zusammenfassend deuten die vorliegenden Ergebnisse auf einen alternativen Mechanismus des HEDS Assays hin, welcher am ehesten gemäß des „Glutathionaktivierungs-Modells“ abläuft. Für den GSSCys Assay kommen sowohl das „Glutathionaktivierungs-“ als auch das „Glutathiongerüst-Modell“ in Betracht. Möglich wäre hierbei eine Kombination beider Modelle aufgrund eines potentiellen zweiten Glutathionbindungsrestes oder eine Konformationsänderung nach Ablauf der oxidativen Halbreaktion.