

Michael Keese
Dr. med.

Zur Zellbiologie der Glutathionreduktase: Wirkung physiologischer NO-Carrier und Entwicklung eines Indikatorsystems für den zellulären Rdoxmetabolismus

Geboren am 19.12.1971 in Heidelberg
Reifeprüfung am 10.07.1991 in Nürnberg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis SS 1998
Physikum am 15.03.1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Kapstadt, Murten und Heidelberg
Staatsexamen am 12.11.1998 an der Universität Heidelberg

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

Die Enzyme des Glutathionstoffwechsels stellen einen bedeutsamen Bestandteil der zellulären antioxidativen Mechanismen dar. Enge Verbindungen bestehen zum Stickoxid-Metabolismus. *In vivo* Veränderungen im Glutathion-Redoxzyklus durch NO sind beispielsweise bei Infektionen mit intrazellulären Parasiten von pathophysiologischer Bedeutung. Biochemische Untersuchungen dieser Veränderungen könnten die Möglichkeit neuer und schonender pharmakologischer Einflußnahmen durch eine gezielte Modulation körpereigener Mechanismen bieten.

A. S-Nitrosoglutathion (GSNO) im Glutathionmetabolismus

Ausgehend von der Inhibition der Glutathionreduktase durch GSNO (Becker *et al.*, 1995) wurde die Wirkung des GSNO auf zwei weitere Enzyme des Glutathionstoffwechsels untersucht.

Glutathion-S-Transferase der π -Klasse wird kompetitiv zu den beiden Substraten Chlor-dinitrobenzol und Glutathion inhibiert. Die K_i -Werte liegen für CDNB und GSH mit 168 μ M bzw. 180 μ M in einem physiologisch sinnvollen Bereich. Eine irreversible Modifikation des Enzyms durch GSNO findet nicht statt. Dies gilt auch für die Glutathionperoxidase. Reversible Effekte des GSNO auf Glutathionperoxidase sind wahrscheinlich unbedeutend, wegen der Besonderheiten des Assay-Systems aber schwer zu quantifizieren.

B. Dinitrosyldithioleisenkomplexe (DNICs) und Enzyme des Glutathionstoffwechsels

DNICs sind reaktive NO-Trägersubstanzen, die einen bedeutsamen Anteil des EDRF ausmachen. Im Rahmen meiner Dissertation wurden zwei niedermolekulare Vertreter (DNIC-GSH₂ und DNIC-CYS₂) dieser Komplexklasse untersucht.

Die Glutathionreduktase wird schon bei sehr geringen DNIC-Konzentrationen inhibiert. Die IC₅₀-Werte liegen für DNIC-GSH₂ bei 1.5 µM, für DNIC-CYS₂ bei 16 µM. Die Hemmung zeigte einen kompetitiven Anteil, der jedoch durch eine extrem schnelle kovalente Inaktivierung des Enzyms überlagert wurde. Absorptionsspektroskopisch wurde nachgewiesen, daß im modifizierten Enzym der CT-Komplex zwischen Cys63 und dem Flavin nicht mehr aufgebaut werden kann. Die Modifikation betrifft wahrscheinlich nicht das Flavin, da ApoGR, der Proteinanteil der GR nach Abtrennung des FAD, ebenfalls modifiziert wurde. Der Vergleich der Inaktivierungskinetik beim Wildtyp und einer GR-Mutante ohne die ersten 15 N-terminalen Aminosäuren legte nahe, daß das reaktive Cys2 für die beobachtete Inhibierung irrelevant ist. Dieser Befund ist wesentlich, da Cys2 kristallographisch nicht faßbar ist.

Zur Klärung des Hemmechanismus wurde das modifizierte Enzym kristallisiert. Die von S. Savvides und P.A. Karplus an der Cornell University durchgeführte Röntgenbeugungsanalyse ergab eine Elektronendichtekarte bei 1.7 Å Auflösung, die ich eindeutig interpretieren konnte: In der durch DNIC-GSH₂ modifizierten GR ist das Cys63 zum Sulfinat oxidiert und Cys58 trägt in Disulfidbindung ein Glutathionmolekül. Die Modifikation an Cys63 erklärt die Irreversibilität der Enzym-Inaktivierung.

Der Einfluß externer DNICs auf die GR intakter Zellen war erwartungsgemäß gering. Hier konnten unter den Inkubationsbedingungen in *CHO*-Zellen und Erythrozyten selbst bei Konzentrationen von bis zu 100 µM nur 30 % Aktivitätsminderung festgestellt werden. Das Wachstum von *P. falciparum* blieb durch DNICs im Medium unbeeinflusst.

Beide DNICs sind zu GSH kompetitive Inhibitoren der Glutathion-S-Transferase mit auffällig niedrigen K_i-Werten von ca. 20 nM. Eine irreversible Modifikation des Enzyms wurde ebensowenig beobachtet wie bei der Glutathionperoxidase.

C. Strukturvorhersagen zu Thioredoxinreduktase aus *P. falciparum*, eines potentiellen Zielmoleküls intrazellulärer DNICs

Basierend auf der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Thioredoxinreduktase wurde durch Computermodellierung ein Strukturvergleich mit der GR erstellt.

35 % der Aminosäuren erwiesen sich als identisch. Die Thioredoxinreduktasestruktur ist jedoch weniger dicht gepackt und zeigt deutliche Unterschiede an den Substratbindungsstellen. Große Ähnlichkeit zur GR besitzen dagegen die für die FAD-Bindung und die Katalyse wichtigen Aminosäuren.

D. Glutathionreduktase als quasi-physiologisches Redoxindikatorsystem für lebende Zellen

1. Mikroinjektion von GR-Kristallen

Zur Kristallisation der GR bei niedriger Ionenstärke wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, mit hoher Wahrscheinlichkeit große röntgentaugliche Kristalle zu gewinnen. Bei diesen Kristallen sind die Veränderungen im GR-Absorptionsspektrum in Abhängigkeit vom Reduktionsdruck des umgebenden Milieus selbst makroskopisch als Farbumschlag von gelb nach rot zu beobachten. Daher sollten sich intrazelluläre GR-Kristalle als Indikatoren für den Zustand des intrazellulären Redoxmilieus von Zellkompartimenten eignen. Mit der Mikroinjektion gelang es, kleine immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Kristallfragmente von < 1 µm³ Größe ins Cytoplasma von Fibroblasten zu injizieren. Größere Fragmente konnten durch Partikelbombardement oder unter Verwendung von Laserpinzetten in die

Zellen manipuliert werden. Die intrazelluläre Rotverfärbung der Kristalle wurde dokumentiert.

2. Immunkomplexe endogener GR mit mikroinjizierten IgGs

Die cytoplasmatische und die nukleäre GR wurden in *HeLa*-Zellen und *Keplerfibroblasten* immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Da eine normale Fluoreszenzfärbung nicht möglich war, wurde das Anti(hGR)-Serum mikroinjiziert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte erst im Anschluß. Die intracytoplasmatische und intranukleoplasmatische Präsenz des Enzyms wird deutlich nachweisbar, da sich die Immunpräzipitate als Partikel klar vom Umgebungshintergrund abheben. Dieser Effekt könnte ebenso wie Verwendung von GR-Kristallen für die Messung intrazellulärer Redoxpotentiale genutzt werden, weil immunpräzipitierte GR ihre enzymatischen und spektroskopischen Eigenschaften beibehält. In Peroxysomen und Lysosomen ließen sich erwartungsgemäß keine partikulären GR-IgG-Komplexe nachweisen. Messungen an intrazellulären GR-Partikeln sind nicht nur für pathophysiologische Fragestellungen wie beispielsweise die Effekte von NO-Trägern von Interesse. Sie können auch als Qualitätskriterium vor Organtransplantationen dienen, für deren Erfolg ein intaktes Redoxmilieu der Zellen wahrscheinlich ebenso bedeutsam ist wie das pH oder die ATP-Konzentration.