

**Das Selenoprotein Thioredoxinreduktase:
Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von humanen
Disulfidreduktasen als potentielle Zielmoleküle von
Chemotherapeutika**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB 08
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl. Oec. troph. Sabine Urig

geboren am 30.10.1974 in Merzig

Gießen

- 2005 -

If we knew what it was we were doing,
it would not be called research... .

- Albert Einstein, 1879-1955 -

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms "Selenoproteine" am Institut für Biochemie der Ernährung (FB 09) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit vom 01.07.2002 bis 17.10.2005 unter Leitung von Prof. Dr. med. KATJA BECKER-BRANDENBURG und Prof. Dr. ALFRED PINGOUD angefertigt.

Dekan: PROF. DR. JÜRGEN MAYER
Institut für Biodidaktik, FB 08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Karl-Glöckner-Straße 21, 35394 Gießen

Erstgutachter: PROF. DR. ALFRED M. PINGOUD
Institut für Biochemie, FB 08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Zweitgutachter: PROF. DR. KATJA BECKER-BRANDENBURG
Institut für Biochemie der Ernährung, FB 09
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Eigene Veröffentlichungen

Erstautorenschaften¹:

- Millet R ¹, Urig S ¹, Jacob J, Amtmann E, Moulinoux JP, Gromer S, Becker K, Davioud-Charvet E. Synthesis of 5-nitro-2-furancarbohydrazides and their *cis*-diamminedichloroplatinum complexes as bitopic and irreversible inhibitors of large thioredoxin reductases. *J. Med. Chem.* (2005) **48**, in press
- Urig S ¹, Ahmadi R, Alber D, Herold-Mende C, Becker K. Platinum(II) complexes: Inhibition of thioredoxin reductase in glioblastoma therapy. *Flavins and Flavoproteins* (2005), in press
- Ahmadi R ¹, Urig S ¹, Hartmann M, Helmke BM, Koncarevic S, Allenberger B, Kienhoefer C, Neher M, Steiner HH, Unterberg A, Herold-Mende C, Becker K. Antiglioma activity of 2,2':6',2''-terpyridineplatinum(II) complexes in a rat model - effects on cellular redox metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* (2005), in press
- Urig S ¹, Fritz-Wolf K, Réau R, Herold-Mende C, Tóth K, Davioud-Charvet E, Becker K. Undressing of phosphine gold(I) therapeutic agents as irreversible inhibitors of human disulfide reductases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2005), in press
- Urig S ¹, Koncarevic S ¹, Steiner K, Rahlfs S, Herold-Mende C, Sueltmann H, Becker K. Differential genomic and proteomic profiling of glioblastoma cells. Cellular response to terpyridineplatinum(II) complexes, in preparation
- Urig S ¹, Lieske J, Irmeler A, Becker K. Truncated mutants of human thioredoxin reductase 1, engineering the C-terminus of large TrxR and substrate specificity, in preparation

Co-Autorenschaften:

- Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system-from science to clinic. *Med. Res. Rev.* (2004) **24**: 40-89.
- Deponte M, Urig S, Arscott LD, Fritz-Wolf K, Réau R, Herold-Mende C, Koncarevic S, Meyer M, Davioud-Charvet D, Ballou DP, Williams CH, Becker K. Mechanistic studies of a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**: 20628-20637.
- Koncarevic S, Deponte M, Fritz-Wolf K, Meyer M, Urig S, Fischer M, Réau R, Davioud-Charvet E, Becker K. Mass spectrometric analysis of human glutathione reductase modified by a gold-phosphole inhibitor. *Flavins and Flavoproteins* (2005), in press
- Fritz-Wolf K, Urig S, Wahl M, Becker K. Crystallographic analysis of human thioredoxin reductase, in preparation
- Anestal K, Urig S, Arner ES. Induction of cell death by derivatized mammalian thioredoxin reductase from a mechanistic point of view, in preparation

Kongreß- und Tagungsbeiträge

- *Urig S, Koncarevic S, Irmeler A, Becker K. Human thioredoxin reductase – novel aspects on drug development. 2nd Colloquium of the DFG Priority Program on Selenoproteins, Charité, Berlin, 2003.*
- *Urig S, Irmeler A, Hecker B, Becker K. Human thioredoxin reductases: multifunctional selenoproteins as drug targets. 55. Mosbacher Kolloquium "How nutrients influence gene activity", Mosbach, 2004.*
- *Urig S, Ahmadi R, Alber D, Herold-Mende C, Koncarevic S, Deponte M, Becker K. 2,2':6',2"-Terpyridineplatinum(II) complexes and their antitumor activity: inhibition of thioredoxin reductase 1 as effective tool in glioblastoma therapy. 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Shonan Village, Hayama, Japan, 2005.*
- *Deponte M, Urig S, Arscott LD, Fritz-Wolf K, Réau R, Herold-Mende C, Koncarevic S, Meyer M, Davioud-Charvet D, Ballou DP, Williams CH, Becker K. Mechanistic studies of a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. 15th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Shonan Village, Hayama, Japan, 2005.*

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Urig
Vorname	Sabine
Wohnort	Licher Str. 39 35394 Gießen
Geburtstag	30.10.1974
Geburtsort	Merzig/Saar
E-mail Adresse	Sabine.Urig@chemie.bio.uni-Gießen.de

Schulbildung

1981-1985:	Grundschule, Merzig-Hilbringen
1985-1986:	Hauptschule, Merzig-Hilbringen
1986-1992:	Christian-Kretschmar Realschule, Merzig/Saar
1992-1995:	Albert-Schweitzer Gymnasium, Dillingen/Saar

Hochschulausbildung

April 1996-April 1997:	Studiengang Chemie/Diplom , Justus-Liebig Universität Gießen sowie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
April 1997-Mai 2002:	Studiengang Oecotrophologie , Justus-Liebig Universität Gießen
Pflichtpraktika:	Praktische Tätigkeiten an der Universität Izmir/Türkei (Department of Soil Science), am Institut Fresenius, Taunusstein (Biochemische Analytik) und an der Universität Marseille/Frankreich (Département de génétique et physiologie du développement)
Sept. 2000-Mai 2001:	Praktische Diplomarbeit , Institut für Biochemie, Prof. Dr. Alfred Pingoud (AG PD Dr. Albert Jeltsch) zum Thema "Klonierung, Expression und Charakterisierung der <i>dam</i> -Methyltransferase aus <i>Escherichia coli</i> "
Juni-Dez. 2001:	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie, Prof. Dr. A. Pingoud
26.05.2002	Diplom der Oecotrophologie (Note: sehr gut), Zusatzprüfung: Produktions- und Qualitätsmanagement (Note: sehr gut)

Promotion

Juli 2002-Okt. 2005	Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen, AG Prof. Dr. Katja Becker zu den Themen "Das Selenoprotein Thioredoxin-reduktase: Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von humanen Disulfidreduktasen als potentielle Zielmoleküle von Chemotherapeutika"
Okt. 2004-Dez. 2004	Forschungsaufenthalt am Medical Nobel Institute for Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Stockholm/Schweden, Prof. Arne Holmgren und Assoc. Prof. Elias Arnér

Danksagungen

Herzlich bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Prof. Dr. med. Katja Becker-Brandenburg für ihre Betreuung, ihre großzügige Unterstützung und ihre vielfältige Kompetenz. Die Jahre in ihrem Institut waren in vielerlei Hinsicht prägend.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Alfred Pingoud für sein Interesse an dieser Arbeit und sein Verständnis sowie für meine Betreuung im Fachbereich 08.

Für die aufschlussreichen Gespräche in unserer kleinen "Selenprotein-Truppe" sowie die vielen praktischen Tipps bedanke ich mich nachdrücklich bei Dr. Angelika Irmner.

Bei Dr. Christel Herold-Mende möchte ich mich sehr bedanken für ihre Herzlichkeit und die freundliche Aufnahme in ihr Team im Rahmen verschiedener Projekte sowie ihre exzellente Kooperativität.

I would like to express my gratitude to Dr. Elisabeth Davioud-Charvet for her competent aid in enzymology and the very fruitful scientific discussions.

Dr. Stephan Gromer danke ich für das stets offene Ohr und die guten Ratschläge.

Bei Dr. Karin Fritz-Wolf und Prof. Dr. Régis Réau möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit, die Anregungen und interessanten Gespräche bedanken.

Marina Fischer danke ich für ihre exzellente technische Unterstützung und ihr Organisations-talent, insbesondere bei den langwierigen Plazentenpräparationen.

Beate Hecker, Ulrike Burkhardt-Zahrt und Elisabeth Fischer sowie Doris Heinke drücke ich hiermit mein herzliches Dankeschön aus für die technische Assistenz und Unterstützung bei Verwaltungsangelegenheiten. Annette Briesemeister danke ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei Formatierungsarbeiten und ihre freundliche Art.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen Monique Bate Akoachere, Marcel Deponte, Dr. Rimma Iozef, Johanna Lieske, Simone Lipinski, Christine Nickel, Dr. Stefan Rahlfs, Hu Ying und insbesondere bei Saša Končarević möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor und die angenehme Atmosphäre im Institut bedanken.

Ich danke auch meinen Freunden von nah und fern und meiner Familie, auf die ich immer zählen konnte.

Mein tiefster Dank gilt meinem Freund Hans Peter, der mir über die Jahre hinweg stets ermutigend und unterstützend zur Seite gestanden hat. Diese Arbeit ist nicht minder sein Verdienst.

I. Inhaltsverzeichnis

II.	Abkürzungsverzeichnis.....	IX
III.	Abbildungsverzeichnis.....	XIII
IV.	Tabellenverzeichnis.....	XV

1. EINLEITUNG 1

1.1	<i>Der Redoxstoffwechsel höherer Organismen</i>	1
1.1.1	<i>Der NADPH-abhängige Thiolstoffwechsel</i>	1
1.1.1.1	<i>Das Thioredoxinsystem</i>	3
1.1.1.2	<i>Das Glutathionsystem</i>	10
1.1.2	<i>Zellulärer Redoxstoffwechsel in der Tumorthherapie</i>	13
1.1.2.1	<i>Entgiftungssysteme (Glutathionperoxidase, Glutathion S-Transferase)</i>	14
1.1.2.2	<i>Regulationsmechanismen</i>	14
1.2	<i>Rationale Medikamentenentwicklung</i>	19
1.2.1	<i>Redoxproteine als "drug targets"</i>	19
1.2.2	<i>Strukturanalyse von Redoxproteinen und Protein-Inhibitor-Komplexen</i>	22
1.3	<i>Enzymhemmung</i>	23
1.3.1	<i>Inhibitoren</i>	24
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	26

2. MATERIAL UND METHODEN 27

2.1	<i>Materialien</i>	27
2.1.1	<i>Rohmaterial</i>	27
2.1.2	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	27
2.1.3	<i>Chemikalien, Lösungen, Proteine und Kits</i>	28
2.1.3.1	<i>Chemikalien, Fertiglösungen</i>	28
2.1.3.2	<i>Puffer und Medien</i>	29
2.1.3.3	<i>Kits für Proteinbiochemie, Molekular- und Zellbiologie</i>	30
2.1.3.4	<i>Proteine und Peptide</i>	30
2.1.4	<i>Säulenmaterialien</i>	31
2.1.5	<i>Plasmide und Primer</i>	31
2.1.5.1	<i>Plasmide</i>	31
2.1.5.2	<i>Primer für Klonierungen, Sequenzierungen und Mutagenesen</i>	31
2.1.5.3	<i>Primer für Real Time PCR</i>	32
2.2	<i>Methoden</i>	33

2.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	33
2.2.1.1	<i>Klonierungen</i>	33
2.2.1.2	<i>Mutagenesen</i>	33
2.2.1.3	<i>Real Time-PCR</i>	34
2.2.2	<i>Expression, Reinigung und Charakterisierung rekombinanter Proteine</i>	35
2.2.2.1	<i>Expression und Proteinreinigung</i>	35
2.2.2.2	<i>Kinetische Untersuchungen</i>	36
2.2.2.3	<i>Versuche zur Redoxpotentialbestimmung</i>	36
2.2.2.4	<i>Gelfiltrationsversuch mit markiertem Glutathion (³H-GSSG)</i>	37
2.2.2.5	<i>Titrationen mit NADPH</i>	37
2.2.3	<i>Analytische Verfahren</i>	37
2.2.3.1	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	37
2.2.3.2	<i>Enzymatische Assays</i>	38
2.2.3.3	<i>Selen- und Platinbestimmungen</i>	42
2.2.3.4	<i>Bestimmung antioxidativer Parameter in Blut und Gewebe</i>	42
2.2.4	<i>Reinigung der Thioredoxinreduktase aus humaner Plazenta</i>	44
2.2.4.1	<i>Chloroform-Butanol-Extraktion</i>	45
2.2.4.2	<i>Acetonpräzipitation</i>	45
2.2.4.3	<i>Ionenaustauschchromatographie, DEAE-Zellulose</i>	45
2.2.4.4	<i>Affinitätschromatographie, 2',5'-ADP-Sepharose 4B</i>	46
2.2.4.5	<i>FPLC-Gelfiltrationschromatographie, Superdex 200</i>	46
2.2.5	<i>Aufarbeitung von Rattengeweben</i>	47
2.2.6	<i>Inhibitorstudien</i>	47
2.2.6.1	<i>Platinkomplexe</i>	47
2.2.6.2	<i>Phosphol-Komplexe</i>	52
2.2.7	<i>Kristallisation der humanen Thioredoxinreduktase</i>	53
2.2.7.1	<i>Die Hangig drop-Wasserdampf-Diffusionsmethode</i>	53
2.2.7.2	<i>Optimierung der Kristallisation</i>	54

3. ERGEBNISSE **55**

3.1	<i>Optimierte Reinigung der Thioredoxinreduktase</i>	55
3.1.1	<i>Rohmaterial und Vorbereitung</i>	55
3.1.2	<i>Chloroform-Butanol-Extraktion und Acetonpräzipitation</i>	55
3.1.3	<i>DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie</i>	56
3.1.4	<i>2',5'-ADP-Sepharose-Affinitätschromatographie</i>	56
3.1.5	<i>Gelfiltration-Molekulargewichtschromatographie an der FPLC-Anlage</i>	56
3.1.6	<i>Reduzierende und nicht-reduzierende Gelfiltration, Elutionsprofile</i>	57
3.1.7	<i>Reinheitsüberprüfung der Präparation, SDS-PAGE</i>	58
3.1.8	<i>Gesamtübersicht über die Präparation</i>	59
3.1.8.1	<i>Bildliche Dokumentation der präparativen Schritte</i>	59
3.1.8.2	<i>Ausbeutetabelle</i>	60
3.2	<i>Charakterisierung verschiedener rekombinanter Mutanten der eukaryotischen Thioredoxinreduktase</i>	61
3.2.1	<i>Optimierung der Herstellung rekombinanter Thioredoxinreduktasen</i>	61
3.2.2	<i>Die Selenocystein →Cystein Mutante</i>	62

3.2.3	<i>Deletionsmutanten der hTrxR</i>	64
3.2.3.1	<i>Kinetische Charakterisierung</i>	65
3.2.3.2	<i>Titrationsen mit NADPH</i>	66
3.2.3.3	<i>Versuche zur Redoxpotentialbestimmung</i>	66
3.3	<i>Vergleichende Charakterisierung der Thioredoxinreduktase aus Plazenta und heterolog exprimierter Mutanten der Thioredoxinreduktase</i>	68
3.3.1	<i>Sequenzvergleiche</i>	68
3.3.2	<i>Substratspezifität, Kinetische Unterschiede</i>	69
3.3.3	<i>Zelluläre Auswirkungen (Bioporter Versuch)</i>	70
3.4	<i>Inhibitorstudie 1: Inhibition von großen Thioredoxinreduktasen durch Cis-Diamindichlorplatin-Komplexe von 5-Nitro-2-furancarbohydrazid</i>	71
3.4.1	<i>Aufklärung des Inhibitionsmechanismus</i>	72
3.4.1.1	<i>Steady-state Kinetiken</i>	72
3.4.1.2	<i>Relative IC₅₀-Werte über die zeitabhängige Inaktivierung der TrxR</i>	76
3.4.1.3	<i>Zeitabhängigkeit der Inhibition</i>	77
3.4.1.4	<i>Vergleichende Hemmstudien der Thioredoxinreduktase aus Drosophila melanogaster</i>	79
3.5	<i>Inhibitorstudie 2: 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe und ihr Einfluss auf den Redoxstoffwechsel in vitro und in vivo bei Glioblastoma multiforme</i>	80
3.5.1	<i>Das Glioblastom-Rattenmodell</i>	80
3.5.2	<i>Enzymaktivitäten und Gesamtglutathion in Extrakten verschiedener Gewebe</i>	82
3.5.3	<i>Selen- und Platinbestimmungen in Geweben</i>	83
3.5.4	<i>TAOS und andere Blutparameter</i>	83
3.5.5	<i>Bioverfügbarkeit</i>	84
3.5.6	<i>Apoptosetests an Glioblastomzellen</i>	84
3.5.7	<i>Microarray-Analyse zur Detektion von chemotherapeutischen Veränderungen auf Transkriptionsebene</i>	85
3.5.8	<i>Validierung interessanter Gene mittels RT-PCR</i>	87
3.5.9	<i>2D-Gelelektrophorese mit Zellextrakten zur Detektion von chemotherapeutischen Veränderungen auf Translationsebene</i>	88
3.6	<i>Inhibitorstudie 3: Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der Inhibition von Thioredoxin- und Glutathionreduktase durch Phosphol-Komplexe</i>	89
3.6.1	<i>Kinetische Charakterisierung der Hemmung der humanen Glutathionreduktase durch Phosphol-Verbindungen</i>	90
3.6.2	<i>Kinetische Charakterisierung der Hemmung der humanen Thioredoxinreduktase durch Phosphol-Verbindungen</i>	92
3.6.3	<i>DNA-Interaktion</i>	93
3.6.4	<i>Antiproliferative Effekte der Phosphole in Glioblastom-Zellkultur</i>	93
3.6.5	<i>Kristallisation und Strukturaufklärung eines Komplexes aus humaner Glutathionreduktase und einem Gold(I)-Phosphol</i>	94

3.7	<i>Kristallisation der humanen Thioredoxinreduktase</i>	96
3.7.1	<i>Kristallisationsversuche der authentischen Thioredoxinreduktase</i>	96
3.7.2	<i>Kristallisation der rekombinanten Cystein-Mutante</i>	96
3.7.2.1	<i>Optimierung der Kristallisationsbedingungen</i>	96
3.7.2.2	<i>Erste Röntgenstrukturdaten</i>	97
4.	<u>DISKUSSION</u>	98
4.1	<i>Zur Reinigung der Thioredoxinreduktase aus humaner Plazenta</i>	98
4.1.1.	<i>Ausbeute und Reinheit, neuere Reinigungsverfahren</i>	98
4.2	<i>Deletionsmutanten von eukaryotischen Thioredoxinreduktasen: Manipulation des C-Terminus mit Auswirkungen auf Enzymkatalyse und Substratspezifität</i>	100
4.3	<i>Neuere Aspekte der Cysteinmutante der humanen TrxR (hTrxR^{U498C})</i>	102
4.4	<i>Inhibition der humanen Thioredoxinreduktase durch Cis-Diamindichlorplatin-Komplexe</i>	103
4.4.1	<i>Interpretation der steady-state-Kinetiken mit den Inhibitoren 8, 13a-c und 20</i>	103
4.4.2	<i>Zeitabhängige Inaktivierung großer Thioredoxinreduktasen durch CDDP-Komplexe</i>	104
4.4.3	<i>Kooperativität und Spezifität der TrxR-Hemmung</i>	104
4.4.4	<i>Schlussfolgerung</i>	105
4.5	<i>2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe</i>	106
4.5.1	<i>In vivo-Effekte der Terpyridinplatin-Komplexe</i>	106
4.5.2	<i>Differentielle Genom- und Proteomanalyse von Glioblastomzellen nach Behandlung mit 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexen</i>	108
4.6	<i>Phosphol-Komplexe als potentielle redox-modifizierende Chemotherapeutika</i>	109
4.6.1	<i>Kinetische Beschreibung des Inhibitionsmechanismus</i>	109
4.6.2	<i>Weitere Effekte</i>	111
4.6.3	<i>Strukturelle Aspekte</i>	111
4.7	<i>Zur Kristallisation und Strukturaufklärung von Thioredoxinreduktasen</i>	113
4.7.1	<i>Bekannte TrxR-Strukturen anderer Spezies</i>	113
4.7.2	<i>Die Struktur der Säugetier-TrxR</i>	114
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	116
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	120

II. Abkürzungsverzeichnis

A, ΔA	Absorption, Absorptionsdifferenz
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzothiazolinsulfonat)
ad	zu einer Endkonzentration von
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMS	4-Acetamid-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
app	apparent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Au	Gold
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma gene 2 product</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BCNU	1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (= Carmustin)
BLAST	Basic local alignment search tool (Computerprogrammbezeichnung)
bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzen
CDDP	<i>Cis</i> -Diamindichlorplatin(II), auch Cisplatin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
c	(milli,mikro)molare Konzentration einer Substanz
Ci	Curie
C _t	<i>threshold cycle</i>
CTC	Charge-transfer complex (Charge-transfer Komplex)
Cyt	Cytochrom
d	Desoxy-
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
dd	doppelt deionisiert (hier Reinstwasser, das doppelt deionisiert und filtriert ist)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMPS	2,3-Dimercaptopropansulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
dpm	<i>disintegrations per minute</i>
DsbA	Disulfide bond formation protein A
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTE	Dithioerythrol
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (Ellmans Reagenz)
DTT	Dithiothreitol
ε	Absorptionskoeffizient [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
e ⁻	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EH ₂	Enzym in einem zwei Elektronen reduzierten Zustand
EH ₄	Enzym in einem vier Elektronen reduzierten Zustand
E _{ox}	Enzym im oxidierten Zustand
Eq	Äquivalent(e)
E _{red}	Enzym im reduzierten Zustand
ESI MS	<i>electrospray-ionization mass spectrometry</i>

EtOH	Ethanol
F	Faraday Konstante (Einheit des elektrochemischen Äquivalents = 96485.3 C/mol)
FACS	<i>fluorescence associated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung ($\sim 9.81 \text{ m/s}^2$) oder Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
ggf.	gegebenenfalls
Glc-6-P	Glucose-6-Phosphat
GoPI	Goldphospholinhibitor [1-Phenyl-2,5-di(2-pyridyl)phosphol]gold(I)chlorid
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion = γ -Glutamylcysteinylglycin (reduziert)
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiert)
GST	Glutathion S-Transferase
h	human oder Stunde
Hb	Hämoglobin
Hk	Hämatokrit
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSA	Humanes Serumalbumin
HEPES	[N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)]
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
1,5-I-AEDANS	5-[2-(Iodacetamid)ethylamino]naphthalen-1-sulfonsäure
I ₂₃ 2N	4-Mercaptopyridin(4'-chlor-2,2':6',2"-terpyridin)platin(II) Nitrat
I ₂₅ 2N	2-Mercaptopyridin(4'-chloro-2,2':6',2"-terpyridin)platin(II) Nitrat
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
k-	kilo-
K	Kelvin
k, k _{max}	(maximale) Geschwindigkeitskonstante
k _{inact}	max. Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung
keV	kiloelectron volt (1 keV = $1.60217646 \times 10^{-16}$ joules)
K _d , K _i , K _M	Dissoziations-, Inhibitions- und Michaeliskonstante
K ₁ *	Hemmkonstante (= Dissoziationskonstante) des Isomerisierungskomplexes E·I*
KP	Kaliumphosphat
Kr	Kreatinin
l	Liter
LB	Luria Bertani (Medienbezeichnung)
M-	Mega-
MALDI-MS	<i>matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry</i>
max.	maximal
2-ME	2-Mercaptoethanol
MetOH	Methanol
mindest.	mindestens
M _w	Molekulargewicht
mPEG-MAL	m-Polyethylenglykol Maleimid
n	Anzahl
NADP ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
NaP	Natriumphosphat
NBT	Nitroblautetrazolium
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i> (elektronische Datenbank)
NDP(s)	Ribonukleosiddiphosphat(e)
NEM	N-Ethylmaleimid
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilo-triacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriacetat)
OD _{600nm}	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
o.g.	oben genannter
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCD	<i>programmed cell death</i> (programmierter Zelltod)
PDB	<i>protein data bank</i> (elektronische Proteindatenbank)
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PFA	Paraformaldehyd
6-P-Gluconat	6-Phosphogluconat
P _i	Anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPh ₃ AuCl	(Triphenylphosphin)gold(I)chlorid
ppb	<i>parts per billion</i>
ppm	<i>parts per million</i>
Prx	Peroxiredoxin(e)
PSI-BLAST	Position specific iterated BLAST (Computerprogrammbezeichnung)
Pt	Platin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Gaskonstante in der Nernstgleichung (8.315 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
RBC	<i>red blood cells</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> (reaktive Stickstoffspezies)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Se	Selen
Sec	Selenocystein (21. Aminosäure)
SECIS-Element	<u>S</u> elenocystein <u>I</u> nsertion <u>S</u> equenz <u>E</u> lement
SELDI-TOF MS	Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
SGOT	Serum Glutamat-Oxaloacetat Transaminase
SGPT	Serum Glutamat-Pyruvat Transaminase
SOD	Superoxiddismutase
spdbv	Swiss-PdbViewer (Computerprogrammbezeichnung)
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV	Säulenvolumen
T	absolute Temperatur (in K)
TAOS	Totaler Antioxidativer Status
TEAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Acetat und EDTA (Pufferbezeichnung)
<i>tert</i> -BOOH	tertiäres Butylhydroperoxid
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TNB	Thionitrobenzoesäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
U	Unit (Enzymeinheit, siehe auch Ref. 1) oder Selenocystein
UE	FAD-enthaltende Untereinheit
ÜN	Über Nacht
US-Puffer	Ultraschallpuffer
V _A	Volumenaktivität
WBC	<i>white blood cells</i>
WT	Wildtyp

- (1) Aminosäuren sind mit dem international üblichen Drei- bzw. Einbuchstaben-Code abgekürzt. Mutanten-Proteine werden nach folgendem Schema benannt: Alte Aminosäure (Einbuchstaben-Code), Positionsnummer, neue Aminosäure (Einbuchstaben-Code). Der Einbuchstaben-Code U steht für die 21. Aminosäure Selenocystein.
- (2) Die innerhalb des Textes verwendeten Fachbegriffe aus dem englischen Sprachgebrauch sind klein und kursiv geschrieben.
- (3) Der IC_{50} -Begriff für diejenige Inhibitorkonzentration, die die Enzymaktivität um 50% senkt (halb-maximale Enzymhemmung), wird in der vorliegenden Arbeit mit dem neueren Begriff $i_{0,5}$ gleichgesetzt (Cortes *et al.*, 2001).

(4) Erläuterungen zu TrxR-Mutanten:

hTrxR ^{U498C} :	humane Thioredoxinreduktase mit dem Austausch des C-terminalen Selenocysteins an der Position 498 durch Cystein
hTrxR Δ 16:	humane Thioredoxinreduktase-Mutante mit C-terminaler Deletion von 16 AS;
hTrxR Δ 16 ^{K29R} :	humane Thioredoxinreduktase-Mutante mit C-terminaler Deletion von 16 AS und zusätzlichem Austausch von Lysin 29 gegen Arginin;
hTrxR Δ 16 ^{K29R,H108Y} :	humane Thioredoxinreduktase-Mutante mit C-terminaler Deletion von 16 AS und zusätzlichem Austausch von Lysin 29 gegen Arginin und von Histidin 108 gegen Tyrosin;
hTrxR Δ 16 ^{K29R,H108Y,A119N,V478E} :	humane Thioredoxinreduktase-Mutante mit C-terminaler Deletion von 16 AS und zusätzlichem Austausch von Lysin 29 gegen Arginin, von Histidin 108 gegen Tyrosin und Alanin 119 gegen Asparagin sowie Valin 478 gegen Glutaminsäure.
rTrxR Δ 16:	Thioredoxinreduktase-Mutante aus <i>Rattus norvegicus</i> mit C-terminaler Deletion von 16 AS;
rTrxR Δ 16 ^{I478E} :	Thioredoxinreduktase-Mutante aus <i>Rattus norvegicus</i> mit C-terminaler Deletion von 16 AS sowie zusätzlichem Austausch von Isoleucin 478 gegen Glutaminsäure.

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Übersicht über den Zusammenhang zwischen NADPH-, Thioredoxin- und Glutathionstoffwechsel. ..2	
Abb. 1.2: Genkarte der humanen Thioredoxinreduktase als Zusammenschritt von der GeneCards® Homepage des Weizman-Institutes, Israel (www.genecards.org/)	6
Abb. 1.3: Transkriptionsvarianten von TXNRD1 anhand verschiedener Exon-Kombinationen, die fünf potentielle Isoformen der hTrxR1 (N-terminale Varianten) kodieren.....	7
Abb. 1.4: Domänenstruktur der TrxR1	7
Abb. 1.5: Der katalytische Mechanismus am Beispiel der humanen Sec-haltigen TrxR	8
Abb. 1.6: Domänenstruktur der TGR	9
Abb. 1.7: Domänenstruktur der GR	11
Abb. 1.8: Der Zellzyklus mit seinen Phasen und einigen redoxabhängigen und unabhängigen Kontrollpunkten	16
Abb. 1.9: Beeinflussung der Apoptose in Krebszellen durch Therapeutika und Redoxregulierung.....	17
Abb. 1.10: Röntgenstruktur der mit S-Nitrosoglutathion modifizierten hGR (PDB-Code 1GSN) bei 1.7 Å Auflösung	22
Abb. 1.11: Die drei bekanntesten und gut untersuchten Platin(II) Verbindungen Cisplatin (cis-DDP) (1), Carboplatin (2) und Oxaliplatin (3)	24
Abb. 1.12: Bildung und Effekte von Cisplatin-DNA-Addukten	24
Abb. 1.13: Chemische Struktur von BCNU und seiner reaktiven Intermediate bei Reaktion mit Protein-Cystein	25
Abb. 1.14: Chemische Struktur von Auranofin mit seinem reaktiven Metallzentrum	25
Abb. 1.15: Chemische Struktur von 4-Mercaptopyridin(4'-chlor-2,2':6',2''-terpyridin)platin (II)-Nitrat mit zentralem Pt-Atom.....	25
Abb. 2.1: Reaktionsgleichung der DTNB-Reduktion durch die Thioredoxinreduktase	38
Abb. 2.2: Reaktionsgleichung der GSSG-Reduktion durch die Glutathionreduktase	40
Abb. 2.3: Reaktionsgleichung der Selenenyliodid-Reduktion durch die Thioredoxinreduktase	41
Abb. 2.4: Reaktionsgleichung der Menadion-Reduktion durch die Thioredoxinreduktase	42
Abb. 2.5: Theoretisches Chromatogramm einer Fraktionierung mit hoher Auflösung	46
Abb. 2.6: Schematische Darstellung eines Kristallisationsansatzes nach der Hanging drop-Methode	54
Abb. 3.1: Fötus in der Fruchtblase, der von der mütterlichen Plazenta über die Umbilicalgefäße mit Nährstoffen versorgt wird	55
Abb. 3.2: Oxidierende (A) und reduzierende (B, C) Gelfiltration der Plazenta-Proteinfraction mit TrxR	57
Abb. 3.3: SDS-PAGE-Analyse der gereinigten TrxR. SDS-Gele mit Peak-Elutionsfraktionen nach (A) oxidierendem und reduzierendem (B) Gelfiltrationslauf	58
Abb. 3.4: a) Vorbereitung des Materials ¹ , Extraktionen ² , Dialyse ³ , Vorbereitung der DEAE-Säule ⁴	59
b) DEAE-Ionenaustauschchromatographie ⁵ , Aktivitätsmessungen ⁶ ,.....	59
2'5'-ADP Sepharose-Affinitätschromatographie ⁷ , Gelfiltration (FPLC) ⁸ und SDS-PAGE ⁹	59
Abb. 3.5: Analyse der Reinigung rekombinanter TrxRs	61
Abb. 3.6: NADPH-vermittelte Menadionreduktion durch die hTrxR ^{U498C}	63
Abb. 3.7: Absorptionsspektren der Titration von 15 µM hTrxR ^{U498C} mit 0-6 Äquivalenten NADPH unter aeroben Bedingungen bei 25°C	64
Abb. 3.8: Vergleich der relativen Aktivitäten der TrxR-Plazenta und hTrxR ^{U498C} als Funktionen des pH-Wertes	64
Abb. 3.9: Kinetiken der hTrxRΔ16 unter Standardbedingungen bei 25°C.....	65
Abb. 3.10: Spektren der Titration der hTrxRΔ16 (15 µM) mit 1 , 0; 2 , 3; 3 , 7.5; 4 , 10, 5 , 15; 6 , 30; 7 , 45; 8 , 75; 9 , 90 µM NADPH (aerob, 25°C)	66
Abb. 3.11: Gelfiltration von NADP ⁺ -inkubierter TrxR mit ³ H-GSSG	67
Abb. 3.12: Multiples Sequenzalignment (CLUSTAL W (1.82) der TrxR1 aus Mensch, Ratte und Drosophila melanogaster mit humaner GR	68
Abb. 3.13: Effekte verschiedener TrxR-Varianten auf die Vitalität von A549-Zellen.....	70
Abb. 3.14: Strukturformeln der Cis-Diamindichlorplatin (CDDP)-Komplexe 13a-c und 20 sowie ihrer Ausgangssubstanzen und Zwischenprodukte	71

Abb. 3.15: Charakterisierung des Hemmtyps der Nitrofuranverbindung 8 bei Reaktion mit TrxR-WT aus humaner Plazenta im steady-state	73
Abb. 3.16: Charakterisierung der Hemmung der hTrxR Δ 16 durch den Inhibitor 8 (steady-state, DTNB-Reaktion)	74
Abb. 3.17: Charakterisierung der Hemmung des hTrxR-WT durch Inhibitor 20 im DTNB-Assay (A und B) und Trx-Assay (C).....	75
Abb. 3.18: Zeitabhängige Inaktivierung des hTrxR-Wildtyps (Plazenta) durch die CDDP-Komplexe 20 (A-C) und 13a-c (D-F)	78
Abb. 3.19: Gewebespezifische Variation der TrxR-Aktivität (A) und GPx-Aktivität (B) [mU/mg Protein].....	83
Abb. 3.20: Redoxparameter im Blut.....	84
Abb. 3.21: Sichtbarmachung von apoptotischen Markern in Glioblastomzellen (Zelllinie 89) anhand verschiedener Färbetechniken und mikroskopischer Analysen	85
Abb.3.22: Heatmap-Ausschnitt der differentiellen Klone aus behandelten und nichtbehandelten Glioblastomzellen.....	86
Abb. 3.23: Relative Quantifizierung der Expression verschiedener Gene nach Behandlung mit I ₂₃ 2N	87
Abb. 3.24: Strukturformeln der in dieser Inhibitorstudie verwendeten neu synthetisierten Phosphorkomplexe (1-4) und der bekannten Vergleichssubstanz [PPh ₃ AuCl] (5).....	89
Abb. 3.25: Kinetische Analyse der hGR-Hemmung durch die Au-Phospholverbindung 1 (0.01, 0.5, 1.0, 2.0 μ M), (A) Michaelis-Menten-Plot, (B) Lineweaver-Burk-Plot, (C) Cornish-Bowden-Plot	90
Abb. 3.26: Kinetische Analyse der hGR-Hemmung durch die Pt-Phospholverbindung 3 (0-10 μ M), (A) Michaelis-Menten-Plot, (B) Dixon-Plot	91
Abb. 3.27: Kinetische Analyse der hTrxR-Hemmung. Hemmung der Trx-Reduktion durch die Au-Phospholverbindung 2 (0-500 nM).....	92
Abb. 3.28: Interaktion des Inhibitors 1 mit pUC18-Plasmid-DANN	93
Abb. 3.29: Verfeinerte Struktur der durch den Inhibitor 1 modifizierten hGR.....	95
Abb. 3.30: Verschiedene Kristallformen der hTrxR ^{U498C}	97
Abb. 3.31: Erste statistische Daten der Röntgenstrukturanalyse der hTrxR ^{U498C}	97
Abb. 4.1: Strukturformeln von Selenocystein und Dehydroalanin	99
Abb. 4.2: Möglicher Mechanismus der Selenoxidation von Selenocystein-Se-Konjugaten.....	99
Abb. 4.3: Multiples Sequenzalignment (CLUSTAL W (1.82) mit TrxR- und GR-Sequenzen	100
Abb. 4.4: Modelle der Oberflächenstrukturen der hGR (A), der hGR mit gebundenem GSSG (B) sowie der TrxR (C)	101
Abb. 4.5: Doppelliganden-Strategie und Enzymkoordination in Zusammenhang mit dem Inaktivierungsprozess	103
Abb. 4.6: Allgemeine Struktur von Pt(IV)-Komplexen	105
Abb. 4.7: Mittelwerte und Standardabweichungen der MRI-Daten von Kontrollratten (schwarzer Balken) und Ratten, die mit I ₂₃ 2N in der "späten Therapie" behandelt wurden.....	106
Abb. 4.8: Mechanismus des Inhibitors 2 (R \rightarrow Au-Cl, R = Phospholligand) im aktiven Zentrum der hGR (Modell)	110
Abb. 4.9: Biologisches Dimer der GR, modifiziert mit zwei Goldatomen (goldfarbene Kugeln) in den aktiven Zentren (Cys58-S-Cys63) und zwei Molekülen Au-Phosphol (ohne Cl) an den Positionen 284	112
Abb. 4.10: Struktur der TrxR aus Rattus norvegicus.....	114

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-I:	Orthologe in anderen Spezies (www.genecards.org/).....	6
Tabelle 1-II:	Beispiele einiger Erkrankungen, in deren Verlauf Veränderungen im Trx-System beobachtet wurden.	19
Tabelle 2-I:	Bezeichnung der verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge.....	27
Tabelle 2-II:	Bezeichnungen der Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge.....	28
Tabelle 2-III:	Bezeichnungen der Pufferart in alphabetischer Reihenfolge.....	29
Tabelle 2-IV:	Bezeichnungen der Kits in alphabetischer Reihenfolge.....	30
Tabelle 2-V:	Protein- und Peptidbezeichnungen in alphabetischer Reihenfolge.....	30
Tabelle 2-VI:	Bezeichnung des Materials in alphabetischer Reihenfolge.....	31
Tabelle 2-VII:	Bezeichnung, Quelle und Verwendungszweck der Plasmide.....	31
Tabelle 2-VIII:	Bezeichnung, Sequenz und Restriktionsstelle bei Klonierungsprimern.....	31
Tabelle 2-IX:	Liste der verwendeten Primer für die <i>Real Time</i> -PCR.	32
Tabelle 2-X:	Expressionsbedingungen in <i>E. coli</i>	35
Tabelle 2-XI:	Namen, Strukturformeln und Molekulargewicht von 5-Nitro-2-furancarbohydrazid und den verschiedenen CDDP-Komplexen.....	48
Tabelle 2-XII:	Namen, Strukturformeln und Molekulargewicht der beiden Terpyridinplatin-Komplexe.....	49
Tabelle 2-XIII:	Namen, Strukturformeln und Molekulargewicht von Triphenylphosphin-Goldchlorid der verschiedenen Phosphol-Komplexe.....	52
Tabelle 3-I:	Tabelle der bei einzelnen Präparationsschritten bestimmten Parameter einschließlich der relativen Gesamtausbeute.....	60
Tabelle 3-II:	Synopsis der Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten hTrxRs in Wildtyp und Mutantenform.....	69
Tabelle 3-III:	Zeitabhängige Hemmung der TrxR (WT und Mutanten) sowie der GR durch die CDDP-Komplexe 13a-c und 20.....	76
Tabelle 3-IV:	Rattengruppen mit Glioblastoma multiforme, den verschiedenen Therapiegruppen zugeordnet.....	81
Tabelle 3-V:	Aktivitäten der TrxR, GPx, GR und GST [mU/mg Protein] in ausgewählten Geweben von I ₂₃ 2N-behandelten Ratten (B, Behandlung) (n = 5, 25/50 mg/kg) und Kontrollratten (K, Kontrolle) (n = 6) (Ausnahmen sind angegeben).....	82
Tabelle 3-VI:	Inaktivierung reduzierter hGR (1.4 nM UE), hTrxR-WT (4.8 nM, DTNB-Assay; 24 nM Trx-Assay) und hTrxR-Mutanten (1.8 μM hTrxR ^{U498C} , 100 nM hTrxRΔ16, Δ8) nach 10-minütiger Inkubation mit den Inhibitoren 1-4 (i _{0.5}).	90
Tabelle 3-VII:	Antiproliferative Effekte der Verbindungen 1-7 (IC ₅₀ -Werte) auf drei verschiedene Glioblastom-Zelllinien.....	94

1. EINLEITUNG

Die französischen Chemiker Antoine-Laurent Lavoisier und Louis-Jacques Thenard haben bereits Ende des 18. Jahrhundert den Zusammenhang zwischen molekularem Sauerstoff, seiner biologischen Oxidation und deren Konsequenzen für den Organismus erkannt. Daraus ergab sich, dass Oxidationen Teil eines Prozesses sind, innerhalb dessen der aktive Sauerstoff (als "säuernder" oder "stressender" Bestandteil) von Reaktionspartnern "entschärft" wird.

1.1 *Der Redoxstoffwechsel höherer Organismen*

Redoxreaktionen liefern die für die Lebensvorgänge höherer Organismen notwendige Energie. Es handelt sich um chemische und biochemische Reaktionen, die eine Kombination von Oxidationen und Reduktionen darstellen, bei der Elektronen von einem Donor auf einen Akzeptor übertragen werden. Die wichtigsten Redoxreaktionen in den Zellkompartimenten höherer Organismen sind Reaktionen NADP⁺-abhängiger Dehydrogenasen für reduktive Synthesen und Reaktionen NAD⁺-abhängiger Dehydrogenasen für Substrathydrierungen im Zytosol, Reaktionen NAD⁺- und flavinabhängiger Dehydrogenasen des Zitratzyklus und der Fettsäureoxidation sowie von Oxidoreduktasen der Atmungskette in den Mitochondrien und Redoxreaktionen mischfunktioneller Oxygenasen in den Mikrosomen.

Bei Redoxprozessen in biologischen Systemen spielen die enzymatisch katalysierten Reaktionen der Oxidoreduktasen (EC I)¹ eine bedeutende Rolle. Die im Rahmen des zellulären Metabolismus entstehenden *Reaktiven Sauerstoffspezies* (ROS) oder *Stickstoffspezies* (NOS) (Wasserstoffperoxid, H₂O₂; Superoxidationen, O₂^{•-}; Hydroxylradikal, •OH; Hydroxylanion, OH⁻; Stickstoffmonoxid, NO; Peroxynitrit, ONOO⁻ u.a.) müssen zur Vermeidung einer oxidativen Stresssituation (Sies and Cadenas, 1985) entsprechend abgepuffert werden. Daher hat die Zelle, deren Bestreben ein überwiegend reduzierendes Milieu ist, intrinsische Systeme ausgebaut, die dies mittels reversiblen Thiol-Disulfid-Reaktionen gewährleisten können (Sies, 1993). Essentielle Cysteine in den aktiven Zentren von Enzymen sind über reversible S-Modifikationen (auch durch ROS oder NOS) ebenfalls an der Redoxregulation beteiligt (Cooper *et al.*, 2002). Die beiden großen thiolabhängigen Redoxsysteme sind das Thioredoxin- und das Glutathionsystem (Trx- und GSH-System). Beide Systeme enthalten überlappende, aber auch unterscheidbare Elemente und arbeiten in ähnlicher Weise, um oxidierte Komponenten zu reduzieren und reduzierende Äquivalente weiterzugeben. Die redox-aktiven Cysteine in Enzymen des Trx- und GSH-Systems werden durch einen Elektronen-Transfer in Kombination mit einem Hydridtransfer über NADPH und FADH₂ reduziert (Jacob *et al.*, 2003).

1.1.1 *Der NADPH-abhängige Thiolstoffwechsel*

Der NADPH-Pool in einer Zelle, der die für die enzymatischen Reaktionen der Thioredoxinreduktase (TrxR) und Glutathionreduktase (GR) benötigten Reduktionsäquivalente liefert und vom Pentosephosphatweg aufrecht erhalten wird, kann auch direkt für Reduktionsreaktionen, insbesondere in den Mitochondrien verwendet werden. Dort entschärft NADPH toxische freie Radikale, ist aber auch an der Bildung physiologisch wichtiger radikalischer Verbindungen wie NO in den Endothelzellen beteiligt (Kirsch and De Groot, 2001). Der größte Teil des NADPH-Pools dient jedoch der Unterstützung des Thiolstoffwechsels.

¹ siehe: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC IUBMB) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/cont1bb.html>)

Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen sind nukleophile Substitutionen eines Thiols oder Thiolats (RSH oder RS^-) an einer Disulfidbrücke, die formal zu der Oxidation des Nucleophils und der Reduktion der Abgangsgruppe führen. In Proteinen des Trx- und GSH-Systems wird das Redoxpotential des Cystein-Cystin Paares durch benachbarte Aminosäuregruppen beeinflusst. Das Redoxpotentialspektrum reicht von -110 mV (*Rattus norvegicus* PDI, *protein disulfide isomerase*) (Zapun *et al.*, 1993) bis -230 mV (*Homo sapiens* Trx1) (Watson *et al.*, 2003) und spiegelt die Vielfältigkeit der Thiol-Disulfidreduktasen von Proteinreduktionen bis Disulfidbrückenbildungen *in vivo* wieder. Reversible Disulfidbrücken unterstützen die zelluläre Redoxbalance, regulieren über Glutathionierung Enzymaktivitäten, tragen zum zellulären *signaling* bei und sind Teil wichtiger Katalysen.

Mit ihrer Kombination von Thiol-Disulfid-Austausch und Elektronentransfer erhalten TrxR und GR die kontinuierliche Reduktion von Disulfiden über NADPH aufrecht. Das stark negative Redoxpotential des $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Paares von -320 mV und das hohe $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ -Verhältnis in der Zelle spielen hierbei eine entscheidende Rolle (zum Vergleich: Redoxpotential von $\text{GR}(\text{E}_{\text{ox}})/\text{GR}(\text{E}_{\text{red}}) = -255$ mV in Hefe (Rakauskiene *et al.*, 1989); Redoxpotential von $\text{TrxR}(\text{E}_{\text{red, EH}_2})/\text{TrxR}(\text{E}_{\text{red, EH}_4}) = -294$ mV in Säugern (Cenas *et al.*, 2004)). Die Thioredoxinreduktase ist bei diesen Transferreaktionen mit einem Thiol/Selenol-Selenylsulfid-Paar beteiligt. Das bei den Reaktionen gebildete NADP^+ muss möglichst bald wieder umgewandelt werden, da es selbst einen hemmenden Einfluss auf die NADPH-abhängigen Reduktionen der TrxR hat. Dieser Effekt könnte eine physiologische Rolle bei Ethanol-Intoxikationen mit einem herabgesetzten $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ -Verhältnis in der Zelle (Cenas *et al.*, 2004) sowie bei Anwendung redoxspezifischer Chemotherapeutika spielen. Im Gegensatz dazu wird die TrxR jedoch durch NADPH in physiologischen Konzentrationen ($50 - 100 \mu\text{M}$) *in vivo* destabilisiert (Schirmer *et al.*, 1999), so dass die Zelle einen Ausgleich zwischen effektiver Umsatzrate und Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität finden muss.

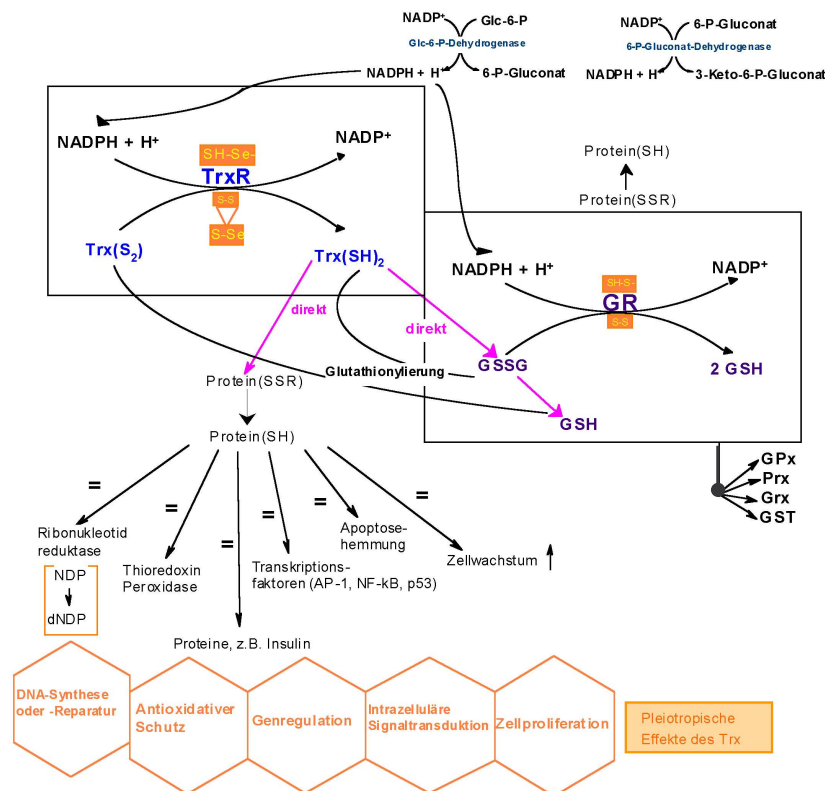


Abb. 1.1: Übersicht über den Zusammenhang zwischen NADPH-, Thioredoxin- und Glutathionstoffwechsel.

Der Methioninstoffwechsel ist auch in der Lage, den NADPH-Pool der Zelle zu nutzen. Methioninreste an der Oberfläche von Proteinen bieten ein ausreichendes antioxidatives Potential zur Aufrechterhaltung der Reduktionsqualität essentieller Proteinreste (z.B. der Glutaminsynthetase). Ein Beispiel für das Agieren mit redoxaktivem Methionin ist die Methioninsulfoxidreduktase (Kim and Gladyshev, 2004; Moskovitz, 2005a), die Methioninsulfoxid NADPH-abhängig reduziert und damit neben ihrer Rolle als Antioxidans (Lowther *et al.*, 2000b) eine wichtige Aufgabe bei der Reaktivierung oxidationssensitiver Methioninreste übernimmt (Moskovitz, 2005b).

1.1.1.1 Das Thioredoxinsystem

Das Thioredoxinsystem ist in fast allen lebenden Organismen vorhanden und besteht aus Thioredoxin (Trx), Thioredoxinreduktase (TrxR) und NADPH (Abb. 1.1). Neben dem zytosolischen Thioredoxinsystem höherer Organismen sind das mitochondriale und das testisspezifische Thioredoxinsystem bekannt (Miranda-Vizuete *et al.*, 2000; Miranda-Vizuete *et al.*, 2004; Rundlof and Arner, 2004). Thioredoxin ist ein ubiquitär exprimiertes redoxaktives Protein, das mittels der TrxR über NADPH reduziert wird und seine zelluläre Funktionen in Form von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen über das konservierte Trx-*active site*-Motif CGPC in der Trx-Domäne erfüllt. Den verschiedenen Thioredoxinsystemen entsprechend gibt es bisher acht im Menschen identifizierte Thioredoxine, darunter das zytosolische Trx1, das mitochondriale Trx2 sowie die drei spermien-spezifischen Thioredoxine Sptrx1-3. Diese Thioredoxine weisen eine große Variabilität auf, die sich auch in ihren unterschiedlichen Molekulargewichten von 12-65 kDa ausdrückt. Allen gemeinsam sind die Trx-Domänen, die aber zum Teil mit anderen Domänen gekoppelt sind. Einige Vertreter sind den *thioredoxin-like proteins* zuzuordnen, da sie keine Substrate der TrxR darstellen (Miranda-Vizuete *et al.*, 2004).

Der hohe Sekundärstrukturgrad der Thioredoxine mit zentralen β -Sheets (hydrophobe *core*-Region) und umgebenden α -Helices verleiht dem Molekül Stabilität und ist für seine regulatorischen Funktionen wichtig. Über das *active site* Cystein-Paar (Cys32 und Cys35 in hTrx1) hinaus können weitere Cysteine (Cys73 in hTrx1) im Molekül über die Trx-Dimerisierung oder ähnlichem zu regulatorischen Prozessen beitragen (Weichsel *et al.*, 1996). In den meisten Organismen trägt Trx als Elektronendonator für die Ribonukleotidreduktase (Jordan and Reichard, 1998) zur Bildung von Desoxyribonukleotidbausteinen (dNTPs) für die DNA-Synthese bei und spielt eine bedeutende Rolle in der antioxidativen Abwehr. Letztere erfolgt über die direkte Katalyse entsprechender Reaktionen zur Entschärfung von Radikalen (Nordberg and Arner, 2001) oder über die Regeneration anderer antioxidativer Enzyme wie Peroxiredoxine (Chae *et al.*, 1999) oder Methioninsulfoxidreduktase (Lowther *et al.*, 2000a). Wichtig ist Trx aber auch bei der Genregulation, kann bei oxidativem Stress in den Kern gelangen und dort einen Einfluss auf redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Hirota *et al.*, 1999), p53 (Turunen *et al.*, 2004; Ueno *et al.*, 1999) und Ref-1 (Hirota *et al.*, 1997) ausüben. Des Weiteren ist Trx an NO-Signalwegen beteiligt, über Effekte im Zusammenhang mit oxidativem Stress oder über die Regulation von NO-Synthasen und deren Isoenzymen (Zhang *et al.*, 1998). Trx selbst wird durch S-Nitrosylierung (Cys69) und Glutathionylierung (Cys73) in seiner Aktivität reguliert (Casagrande *et al.*, 2002; Haendeler *et al.*, 2002). Es kann in reduzierter Form ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Saitoh *et al.*, 1998) binden und als deren negativer Regulator den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindern. Die Bindung des Trx-ASK1-Komplexes kann bei erhöhtem oxidativen Stress gelöst werden und damit Apoptose induzieren (Kwon *et al.*, 2003). Das Zentralnervensystem (ZNS) und seine Neuronen sind besonders anfällig für oxidative Schädigung und neuronalen Zelltod durch oxidativen Stress. Aufgrund ihrer umfassenden

Expression im Gehirn sind Trx1 und Trx2 maßgeblich an dessen antioxidativer Abwehr beteiligt (Lippoldt *et al.*, 1995; Rozell *et al.*, 1985; Rybnikova *et al.*, 2000). Trx hat hier vorwiegend neuroprotektive Funktion und kann bei Stress hochreguliert werden. Es wird auch in Zusammenhang mit dem neuronalen Wachstumsfaktor (NGF) und damit mit neurotrophen Funktionen in Verbindung gebracht (Bai *et al.*, 2003). Wenig ist hingegen bekannt über eine potentielle Rolle des Trx bei zentralnervösen Karzinomen (Abschnitt 1.1.1.1.1).

Eine Zusammenfassung über den aktuellen Forschungsstand des Trx und der sog. Trx-Zyklus-Enzyme im ZNS bieten die kürzlich erschienenen Darstellungen von Patenaude *et al.*, 2005, die in Abschnitt 4.5 diskutiert werden.

Die Studien über Trx und seine vor- und nachgeschalteten Moleküle nehmen stetig zu und geben weitere Einblicke in die Interdependenz zellulärer Systeme (Trx-Update 2005 (Nakamura, 2005)).

1.1.1.1.1 Thioredoxin und Krebs

Die meisten physiologischen Effekte der TrxR-Aktivität (Abschnitt 1.1.1.1.2 und Tabelle 1-II) sind eng mit den zellulären Funktionen des Trx verbunden.

Infolge der Tumorinitiation durch Karzinogene wird die DNA in der Zelle geschädigt und es kommt zur ROS-Bildung. Die antioxidative Kombination aus Trx und TrxR ist daher zu Beginn neoplastischer Prozesse besonders wichtig. Allerdings kann ihr Agieren während des Fortschreitens des Tumors gefährlich werden, wenn die Zellproliferation über die Zulieferung von Reduktionsäquivalenten für die Ribonukleotidreduktase beschleunigt wird. Tatsächlich wurden erhöhte Trx-mRNA und/oder -Proteinkonzentrationen in verschiedenen Tumoren festgestellt und diese korrelierten positiv mit einer erhöhten TrxR-Expression (Kahlos *et al.*, 2001; Lincoln *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 1998; Soini *et al.*, 2001; Turunen *et al.*, 2004). Es existieren nur wenige Studien über den Einfluss des Trx-Systems auf den Verlauf cerebraler Neoplasien, doch konnten erhöhte Trx- und TrxR-Werte in astrozytären Hirntumoren sowie eine Assoziation mit deren Malignitätsgrad festgestellt werden (Haapasalo *et al.*, 2003). Es wird auch eine allgemeine Rolle des Trx-Systems in der Entwicklung der Glianeoplasie vermutet (Haapasalo *et al.*, 2003), hier besteht aber noch Forschungsbedarf.

Trx1 wird darüber hinaus als Inhibitor des Tumorsuppressors PTEN beschrieben, dessen Funktionsverlust in vielen Krebsarten bekannt ist (Meuillet *et al.*, 2004). Dadurch werden einige AKT-Kinase-Signalwege zum Überleben der Tumorzelle nicht mehr herunterreguliert und die Tumorprogression begünstigt.

Die Effekte, die das Trx während des Tumorgeschehens auslöst und auch die Regulation der Proliferation sind multifaktoriell sowie zell- und gewebespezifisch. Daher ist es wichtig, die Eigenschaften des speziellen Tumors mit denen des Trx zu korrelieren, um im Hinblick auf eine Medikamentenentwicklung Schwachstellen im System ausfindig zu machen. Es ist auch zu beachten, dass das Thioredoxin sowohl in den zytoplasmatischen als auch in den nukleären Kompartimenten der Krebszelle vorkommen kann. Die Kern-Trx-Fraktion nimmt bei Behandlung der Krebszellen (z.B. mit Cisplatin) deutlich zu.

Erhöhte Trx-Konzentrationen und das auf diese Weise stimulierte Tumorwachstum können durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sowie die Erhöhung der Sensitivität gegenüber Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur Chemoresistenz der Krebszellen führen (Powis *et al.*, 2000). Die Expression und die Aktivität von Trx und TrxR sind in chemoresistenten HeLa-Zellen deutlich erhöht, jedoch lässt sich die Resistenz durch deren Stilllegung (mittels der Antisense-Technologie) wieder aufheben (Sasada *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang soll auf die Möglichkeit der Sekretion des Trx aus der Zelle hingewiesen werden. Eine vermehrte Trx-Sekretion erfolgt bei hohen intrazellulären Konzentrationen an oxidiertem Trx und kann extrazellulär über chemokine und zytokine

Aktivität immunstimulierend wirken. Aufgrund der angesprochenen Eigenschaften des Trx wird der direkte Einsatz einer prooxidativen Chemotherapie interessant (Abschnitt 1.2.1).

1.1.1.1.2 Das Selenenzym Thioredoxinreduktase

Die Thioredoxinreduktase (TrxR) (EC 1.8.1.9) gehört zur Familie der homodimeren Pyridin-nukleotid-Disulfidreduktasen, zu der neben der Glutathionreduktase die Liponamiddehydrogenase, die Trypanothionreduktase und die Quecksilberionenreduktase gehören. Sie katalysiert die Übertragung von Elektronen von ihren Coenzymen NADPH und FAD auf Proteine sowie nichtproteinartige Moleküle, die diese auf Zielmoleküle transferieren und damit dem Stoffwechsel wieder als Substrate zurückgeführt werden.

Man unterscheidet zwei Typen von Thioredoxinreduktasen, die kleinen, sog. Bakterien-TrxRs (~ 35 kDa M_w Monomer) und die großen TrxRs (~ 55 kDa M_w Monomer). Die beiden TrxR-Typen können entgegen früherer Annahmen auch gleichzeitig in einem Organismus (*Chlamydomonas reinhardtii*) vorkommen (Novoselov and Gladyshev, 2003). Im Gegensatz zu den kleinen TrxRs mit einem engem Substratspektrum, das nur über Thioredoxin reagiert, wird von den großen TrxRs eine wesentlich höhere Anzahl an Substraten direkt akzeptiert. Hierzu gehören neben Trx auch Proteine wie Nk-Lysin (Andersson *et al.*, 1996), Proteindisulfidisomerase (Lundstrom and Holmgren, 1990), Calciumbindende Proteine 1 und 2 (Lundstrom-Ljung *et al.*, 1995), wahrscheinlich auch Glutaredoxin (Fernandes *et al.*, 2005) und kleine Moleküle wie DTNB (Arnér *et al.*, 1999b), Dehydroascorbat (May *et al.*, 1997), Seliendiglutathion (Bjornstedt *et al.*, 1992), Selenylsulfid (Mugesh *et al.*, 2003), Ebselen (Zhao *et al.*, 2002), Ubichinon (Nordman *et al.*, 2003), Methylseleninat (Gromer and Gross, 2002) und Quinone (Cenas *et al.*, 2004) (Abschnitt 2.2.3.2). Die TrxR ist in viele apathogene, aber auch pathogene Stoffwechselwege involviert (Arnér and Holmgren, 2000; Becker *et al.*, 2000; Mustacich and Powis, 2000) und steht seit einiger Zeit im Mittelpunkt intensiver Forschung, aus der immer wieder neue Erkenntnisse hervorgehen (Furman *et al.*, 2004; Nalvarte *et al.*, 2004). Der Grund für die hohe Akzeptanz von Substraten wird in ihrem Selenocysteingehalt und flexiblen C-terminalen Arm vermutet (Gromer *et al.*, 2003; Gromer *et al.*, 1998b). Die TrxR der Säuger gehört zur exklusiven Klasse der Selenoproteine (25 Selenoproteine wurden im humanen Organismus bis jetzt identifiziert) (Kryukov *et al.*, 2003), die typischerweise einen einzigen konservierten Selenocysteinrest (Sec) enthalten (Ausnahme ist SelP mit 10 Sec-Resten) (Gladyshev *et al.*, 2004). Da die Inkorporation des Selenocysteins (Bock *et al.*, 1991; Stadtman, 1996) während der Translation bestimmter speziesspezifischer Elemente (SECIS-Elemente)² und weiterer Faktoren bedarf, wird die rekombinante Expression der hTrxR in *E. coli* trotz einiger Fortschritte auf diesem Gebiet (Arnér *et al.*, 1999a; Rengby *et al.*, 2004) nicht im großen Maßstab durchgeführt und man ist auf die Gewebereinigung (Plazenta) angewiesen.

Die Aufrechterhaltung des Selenspiegels im Gehirn und der notwendige Einbau von Selen in die TrxR sind wichtig zur Erhaltung der Hirnfunktion (Schweizer *et al.*, 2004). In Mangelsituationen ist das Gehirn eines der wenigen Organe, die ihren Selengehalt bewahren und damit eine permanente TrxR-Aktivität gewährleisten können (Chen and Berry, 2003).

Bevor auf ihre Domänenstruktur und den katalytischen Mechanismus eingegangen wird, wird im Folgenden der genetische Ursprung der TrxR vorgestellt, um einen Gesamteindruck von ihrer komplexen physiologischen Funktion und Regulation zu bekommen.

² SECIS-Element = *Selenocystein Insertion Sequence Element*, Nukleotidsequenz im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA, die eine besondere räumliche Sekundärstruktur ("Haarnadelform") ausbildet. Es existiert eine Selenocystein-spezifische tRNA ("Sel C"), welche die tRNA für Selenocystein mit dem Antikodon ACT darstellt. Zum Insertionsmechanismus gehören weiterhin spezielle Elongations- und Bindungsfaktoren.

Genkarte für TXNRD1 GC12P103183


Quelle: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp?TXNRD1>

- TR²
- TR1²
- TRXR1²
- TXNR^{2,5,6}
- KM-102-derived reductase-like factor
- thioredoxin reductase 1^{1,2,5}
- thioredoxin reductase GRIM-12 (gene associated with retinoid interferon-induced mortality)
- Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic precursor (EC 1.8.1.9) (TR) (TR1)³

(¹ HGNC, ² Entrez Gene, ³ UniProt/Swiss-Prot, ⁴ UniProt/TrEMBL, ⁵ GDB, ⁶ OMIM, and/or ⁷ GeneLoc)

Chromosome: 12
LocusLink cytogenetic band: 12q 23-q 24.1 **Ensembl cytogenetic band:** 12q 23.3

Gene in genomic location: bands according to Ensembl, locations according to GeneLoc (and/or LocusLink and/or Ensembl if different)



(Gasdaska *et al.*, 1996)

Start: 103,183,194 bp from *pter*
End: 103,246,529 bp from *pter*
Size: 63,335 bases
Orientation: plus strand

UniProt/Swiss-Prot: TXN1 HUMAN, Q16881
Size: 499 amino acids; 54706 Da
Cofactor: Binds 1 FAD per subunit.
Subunit: Homodimer.
Subcellular location: Cytoplasmic (By similarity).
Post-translational modifications: The N-terminus is blocked.
Post-translational modifications: Contains a selenide-sulfide bond between Cys-497 and Sec-498. This bond is speculated to serve as redox active pair (By similarity).
Miscellaneous: The active site is a redox-active disulfide bond.
Caution: Ref.1 and Ref.2 sequences differ from that shown due to a stop codon in position 498.

REFSEQ proteins (4 alternative transcripts):
 NP_003321.2 NP_877393.1 NP_877419.1






REFSEQ mRNAs (4 alternative transcripts):
 (Click  for Applied Biosystems TaqMan © Gene Expression Assays)
 NM_003330.2  NM_182729.1  NM_182742.1  NM_182743.1

Abb. 1.2: Genkarte der humanen Thioredoxinreduktase als Zusammenschritt von der GeneCards® Homepage des Weizman-Institutes, Israel (www.genecards.org/).

Tabelle 1-1: Orthologe in anderen Spezies (www.genecards.org/).

Organismus	Gen	Beschreibung	Ähnlichkeit zum humanen System
<i>Pan troglodytes</i> (Schimpanse)	LOC467112 ¹	ähnlich zu KM-102-derived reductase-like factor	99.58(n) 99.37(a)
<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	Txnrd1 ¹	Thioredoxinreduktase 1	84.81(n) 89.72(a)
<i>Mus musculus</i> (Maus)	Txnrd1 ¹	Thioredoxinreduktase 1 ¹	85.51(m) ¹ 91.55(a) ¹
<i>Drosophila melanogaster</i> (Taufliege)	Trxr-2 ² Trxr-1 ¹	Antioxidans ² Thioredoxinreduktase 1 ¹	51(a) (best of 2) ² 55.88(m) ¹ 56.64(a) ¹
<i>Anopheles gambiae</i> (Afrikan. Malariaoskito)	1271658 ¹	<i>Anopheles gambiae</i> Stamm PEST ENSANGG00000014840 Gen	54.22(n) 56.22(a)
<i>Plasmodium falciparum</i> (Malaria Parasit)	PF11170c ¹	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 PF11170c Gen	53.74(n) 48.22(a)

¹ HomoloGene
² euGenes
 (n) nucleotide
 (a) amino acid

Mit der Kenntnis der *Core* Promotorregion (Rundlof *et al.*, 2001) wurde man sich der komplexen transkriptionalen Regulation des TXNRD1-Gens im Zusammenhang mit dem alternativen Exon-*splicing* (Black, 2003) bewusst. Interessanterweise hat man eine gewisse Variabilität im N-terminalen Bereich des Gens entdeckt, die sich in verschiedenen Isoformen ausdrücken lässt, von denen eine eine Glutaredoxindomäne besitzt (Rundlof *et al.*, 2004; Su and Gladyshev, 2004). Der Hintergrund der zellspezifischen Transkription des Gens und die damit verbundene Ausprägung der TrxR-Isoformen sind für das Verständnis der Funktionen des humanen Thioredoxinsystems wichtig. Die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehende Thioredoxinreduktase aus humaner Plazenta ist der Isoform 1 zuzuordnen. Dies ist die klassische Form der Säuger-Thioredoxinreduktasen und wird von TXNRD1-Transkripten mit einer Kombination der Exons III, IV, V-XV und dem Start-Methionin-Kodon in Exon III kodiert (Rundlof *et al.*, 2004).

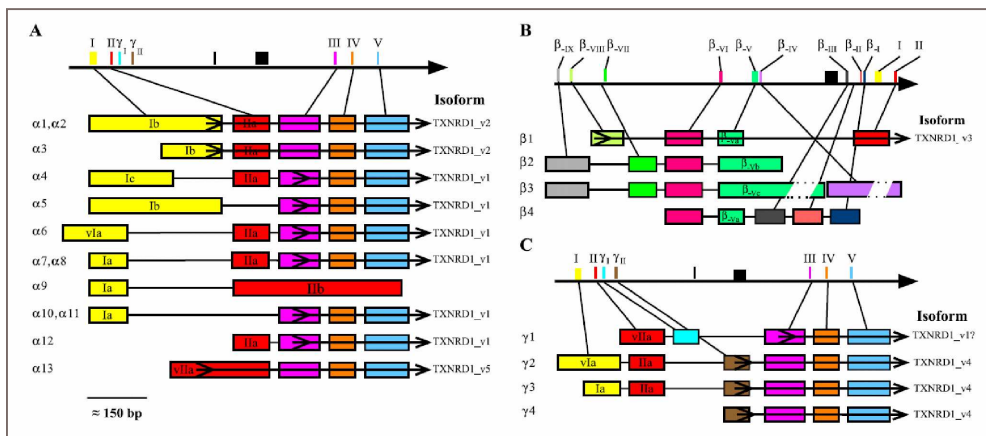


Abb. 1.3: Transkriptionsvarianten von TXNRD1 anhand verschiedener Exon-Kombinationen, die fünf potentielle Isoformen der hTrxR1 (N-terminale Varianten) kodieren. (A) Alle Varianten, die ausschließlich die klassischen α -Exons enthalten; (B) Transkripte mit upstream β -Exons; (C) Transkripte, die alternative γ -Exons besitzen (Rundlof *et al.*, 2004).

Drei verschiedene TrxR-Enzyme sind bisher identifiziert, die klassische zytosolische TrxR1 (wie diejenige aus Plazenta), eine mitochondriale TrxR2 und eine dritte, vorwiegend in den Testes exprimierte TrxR3. Diese drei Proteine basieren auf der gleichen Domänenstruktur, mit Ausnahme einer zusätzlichen N-terminalen Glutaredoxindomäne innerhalb der testisspezifischen TrxR3. Diese hat ein Monothiol *active site* Motif und ist in der Lage, neben Thioredoxin auch Glutathiondisulfid zu reduzieren (Abschnitt 1.1.1.1.2).

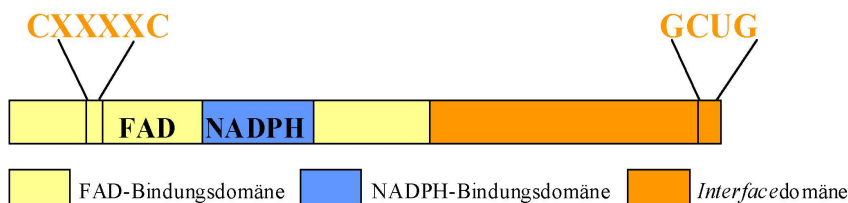


Abb. 1.4: Domänenstruktur der TrxR1. U = Selenocystein (21. Aminosäure) im Redoxzentrum in der Interfacedomäne. Die NADPH-Domäne liegt innerhalb der gelb markierten FAD-Domäne.

Allen Säuger-Thioredoxinreduktasen ist diese Domänenstruktur (Abb. 1.4) gemeinsam und sie haben ihre Besonderheit in dem zusätzlichen C-terminalen Redoxzentrum, welches die reduzierenden Äquivalente von den flavinnahen Cysteinen erhält und sie auf das finale

Substrat transferiert. Eine Spezifität dieser Art der TrxR ist ihre zweitletzte Aminosäure Selenocystein (Sec) (Stadtman, 1996), die an dem Elektronentransfer innerhalb der enzymatischen Katalyse beteiligt ist. Selenocystein bildet mit dem benachbarten Cystein ein Selenylsulfid und ist für die Säuger-TrxR essentiell, da ihre Deletion zu einem dramatischen Aktivitätsverlust des Enzyms von 90-99% führt (Fujiwara *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000; Zhong and Holmgren, 2000). Auf der anderen Seite gibt es aber auch Organismen wie *Drosophila melanogaster*, deren TrxR (DmTrxR) nicht über Selenocystein arbeitet und die anhand eines sehr ähnlichen Reaktionsmechanismus 50% der Aktivität anderer großer selenhaltiger TrxRs erreicht (Bauer *et al.*, 2003b; Kanzok *et al.*, 2001). Derzeit gibt es noch keine endgültige Erklärung, welche Kombination von Elementen aus der Mikroumgebung des Selenocysteins über die enzymatische Effizienz entscheidet (Gromer *et al.*, 2003).

Da während der Katalyse und bei der Substratbindung keine größeren Konformationsänderungen stattfinden, hat man aufgrund von Daten aus der *stopped flow*-Kinetik in Kombination mit reduktiven Titrations und spektralen Untersuchungen heute eine detaillierte Vorstellung des katalytischen Zyklus der Säuger-TrxR, der im folgenden Schema dargestellt ist (Arcscott *et al.*, 1997; Gromer, 1998; Gromer *et al.*, 2004).

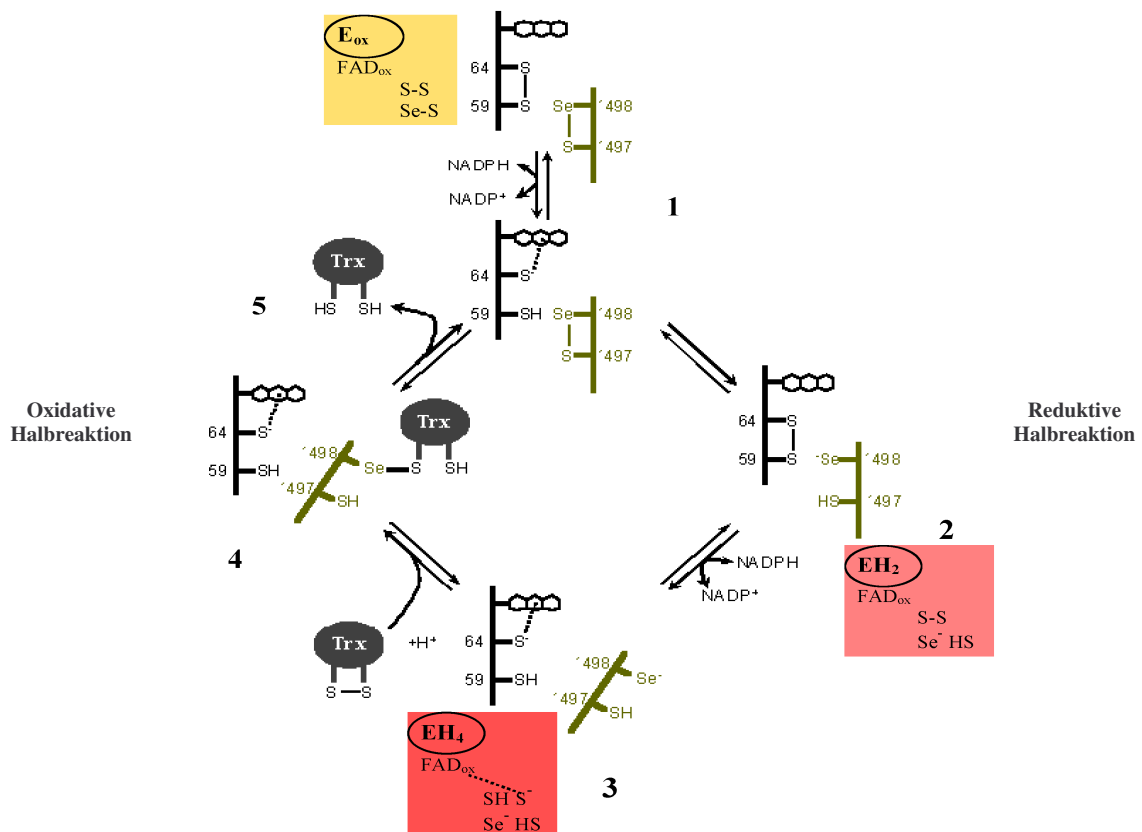


Abb. 1.5: Der katalytische Mechanismus am Beispiel der humanen Sec-haltigen TrxR. Die Flexibilität des C-Terminus (grün) ist durch das Wechseln zwischen Schräg- und Senkrechtstellung angedeutet. Dargestellt ist der Einfachheit halber nur ein Redoxzentrum, an dem das C-terminale Redoxpaar der zweiten Untereinheit (AS-Reste '497'498 in grün) beteiligt ist. Die gestrichelten Linien zwischen Flavinder und proximalem Thiolat von Cys64 deuten auf die Ladungsverschiebung der Elektronen in Form eines charge-transfer-Komplexes_{540 nm} hin. (modifiziert nach Gromer *et al.*, 2004).

Hauptmerkmal der Katalyse ist der relativ flexible 16 Aminosäuren lange carboxyterminale Teil des Enzyms, der es dem Sec-Cys Redoxpaar der einen Untereinheit ermöglicht, das verborgene Cys-XXXX-Cys-Redoxpaar in der Nähe des Flavins der anderen Untereinheit zu erreichen, seine Elektronen zu übernehmen und sie den Substraten an der Enzymoberfläche

zur Verfügung zu stellen. Die Elektronenweitergabe erfolgt nach einem Ping Pong-Mechanismus³ (Gromer, 1998). Während der reduktiven Halbreaktion bewegt sich der C-terminale Teil der zweiten Untereinheit in Richtung des N-terminalen Teils der ersten Untereinheit (1). Das oxidierte Enzym wird durch NADPH über FADH₂ zur sog. EH₂-Spezies mit einem C-terminalen Selenolat reduziert (2). Durch die Aufnahme eines weiteren NADPH-Äquivalents entsteht die EH₄-Form (3), die aufgrund ihrer starken Nukleophilität die Elektronen in der nun folgenden oxidativen Halbreaktion an das Substrat (Trx) abgibt unter Ausbildung eines gemischten Selenylsulfids (4). Nach dem Angriff des benachbarten Thiols wird das Enzym (E_{ox}) zurückgebildet und das reduzierte Substrat entlassen (5). Der niedrige pK_s-Wert des Selenols (pK_s_{Selenol} = 5; pK_s_{Thiol} = 8), die Nukleophilität und die gute Abgangsgruppe des Selenolats sprechen für die erleichterte Reaktion durch den Einsatz des Redoxpartners Selenocystein. Die Reaktivität des Selenocysteins macht man sich bei der Entwicklung spezifischer Metall-Inhibitoren der TrxR zunutze (Abschnitt 1.2).

Die Kenntnis des katalytischen Mechanismus der Thioredoxinreduktase ist zudem eine Voraussetzung für mechanistische Studien mit Enzyminhibitoren, um deren Wirkweise besser zu verstehen.

1.1.1.1.3 Die Thioredoxin-Glutathionreduktase

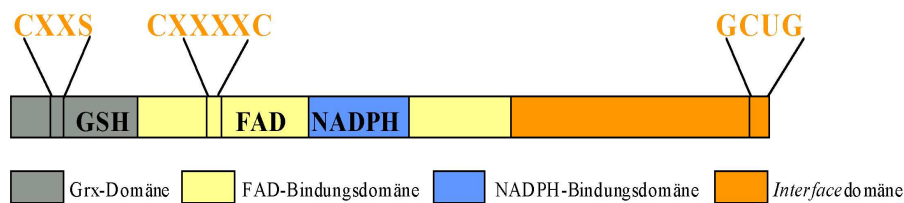


Abb 1.6: Domänenstruktur der TGR. Zusätzliche N-terminale Grx-Domäne mit dem Grx-Motiv CXXS.

Die Thioredoxin-Glutathionreduktase, kurz TGR, ist eine erst in den letzten Jahren identifizierte TrxR (TrxR3), in der die drei wichtigsten Redoxfunktionen des Thioredoxins, Glutathions und Glutaredoxins zusammengefasst sind (Sun *et al.*, 2001). Sie ist eine TrxR-GR Chimäre, besitzt aber im Gegensatz zur GR noch eine zusätzliche Glutaredoxindomäne, die von dem beweglichen, bei Säugern Selenocystein-haltigen C-Terminus der TrxR Elektronen erhalten kann (Abb. 1.6). Das humane Gen wurde *in silico* identifiziert, konnte aber in seiner Gesamtlänge bisher noch nicht erfolgreich kloniert, exprimiert und gereinigt werden (Hecker, 2004). Die TGR kann im Gegensatz zu TrxR1 und TrxR2 sowohl GSSG als auch Trx direkt reduzieren. Der genaue Ablauf des Elektronentransfers während der Katalyse ist noch nicht bekannt und kann deshalb nur in Modellen veranschaulicht werden (Salinas *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2001). Demnach werden die Elektronen über NADPH und FAD auf das Thiol-Disulfid-Zentrum, dann auf das sich annähernde Sec-enthaltende Tetrapeptid am carboxyterminalen Arm übertragen. Letzterer macht wiederum eine Bewegung in Richtung Grx-Domäne und gibt seine Elektronen dort ab, so dass diese mit einem Elektronenakzeptor (z.B. einem gemischten Disulfid mit gebundenem GSH) interagieren kann. Auf diese Weise wird das TrxR-Funktionsspektrum erweitert, indem die TGR z.B. an Isomerisierung und Bildung von Disulfidbrücken sowie an der Ausbildung von Spermienstrukturkomponenten

³ Unter Ping Pong-Mechanismus versteht man einen Mechanismus, bei dem ein Produkt zwischen den Zugaben zweier Substrate freigesetzt wird. Für die TrxR bedeutet das im *steady-state*, dass sie zunächst ihr erstes Substrat NADPH bindet, welches das Enzym wieder als NADP⁺ verlässt, um oxidiertes Trx zu binden und zu reduzieren, das dann wiederum dissoziiert, bevor neues NADPH aufgenommen wird.

zusammen mit der Phospholipidhydroperoxidase (GPx4, PHGPx) beteiligt ist (Su *et al.*, 2005).

Die Entdeckung der TGR hat gezeigt, dass Verschmelzungen des Trx- und GSH-Systems und damit eine phylogenetische Verbindung ihrer Vertreter TrxR und GR möglich sind. Heute geht man davon aus, dass der Ursprung der großen TrxRs auf die GRs in niederen Eukaryoten zurückzuführen sind, die die Fähigkeit hatten, im Verlaufe der Evolution Selenocystein einzuführen (Novoselov and Gladyshev, 2003; Novoselov *et al.*, 2002). In dieser Hinsicht entstand die große Form der TrxR durch eine Verlängerung der C-terminalen Sequenz der GR, die das dem Glutathion ähnliche GCUG-Peptid innerhalb eines neu gebildeten Redoxzentrums enthält (Novoselov and Gladyshev, 2003).

1.1.1.2. Das Glutathionsystem

Bekannt als zweiter großer Redoxindikator der Zelle ist das Glutathionsystem ebenfalls von der Zulieferung reduzierender Äquivalente in Form von NADPH abhängig (Abb. 1.1). Im engeren Sinne umfasst es daher die GR, Glutathion und NADPH, darüber hinaus sind jedoch einige andere Proteine wie z.B. Glutaredoxine (Grx) (Johansson, 2004), Glyoxalasen (Thornalley, 1993), Glutathion S-Transferasen (GST) (Salinas and Wong, 1999) und GSH-Peroxidasen (GPx) (Arthur, 2000) in das GSH/GSSG-System eingebunden. An der Rückreduktion des GSSG ist außer der Glutathionreduktase das Trx/Grx-System beteiligt. Reduziertes Trx kann unter bestimmten Bedingungen Glutathiondisulfid direkt reduzieren (Nikitovic and Holmgren, 1996). Diese Reduktion ist in Glutathion verbrauchenden Dipteren wie *Drosophila melanogaster* (Kanzok *et al.*, 2001) oder *Anopheles gambiae* (Bauer *et al.*, 2003a) ohne genuine GR von essentieller Bedeutung, was anhand von DmTrxR *knock out*-Studien belegt werden konnte (Missirlis *et al.*, 2001; Missirlis *et al.*, 2002). Der normale zelluläre Redoxzustand wird zugunsten des reduzierten GSH über das effektive Arbeiten der GR aufrecht erhalten. Der Redoxpotentialunterschied von 80 mV zwischen den Redoxpaaren GSSG/GSH und NADP⁺/NADPH und die hohe NADPH-Konzentration sorgen für ein GSSG:2GSH-Verhältnis von bis zu 1:600 unter physiologischen Bedingungen. Damit besitzt die Zelle einen empfindlichen Sensor, der auf Veränderungen (durch Störungen, ROS u.a.) mit der Bildung von gemischten Disulfiden zwischen Proteinthiolen und Glutathion reagiert, der sog. S-Glutathionylierung. Durch diese Form der reversiblen Interaktion hat die Zelle die Möglichkeit, individuelle Proteinfunktionen zu beeinflussen und innerhalb der Signaltransduktion weiterzugeben (Cotgreave and Gerdes, 1998). Glutathionylierte Proteine akkumulieren bei oxidativem Stress und können als Redoxpuffer die irreversible Oxidation von Thiolen zu Sulfin- und Sulfonsäuren verhindern (Klatt and Lamas, 2000). Die Zahl der im konstitutiven Metabolismus oder bei Stress identifizierten glutathionylierten Proteine nimmt stetig zu, darunter Chaperone und Proteine, die den Zellzyklus regulieren (Lind *et al.*, 2002) sowie die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren wie NF1 (Bandyopadhyay *et al.*, 1998), AP-1 Untereinheit c-Jun (Klatt and Lamas, 2002) und NF-κB (Pineda-Molina *et al.*, 2001) beeinflussen. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase war eines der ersten Proteine, dessen Glutathionylierung und Inaktivierung durch oxidativen Stress nachgewiesen werden konnte (Lind *et al.*, 1998). Da dieses Protein durch die Glutathionylierung nicht in seiner Aktivität herabgesetzt, sondern nur verändert wird, findet diese wahrscheinlich an Cysteinen außerhalb der *active site* statt. Die zeitweilige "Umprogrammierung" der Proteinfunktion durch Glutathionylierung stellt einen geeigneten Feedbackmechanismus des Glutathionsystems auf den NADPH-Stoffwechsel dar.

Die Grx-abhängige Deglutathionylierung gewährleistet die Rückführung der gemischten Disulfide über die Oxidierung von GSH unter normalen Bedingungen und beeinflusst seinerseits die Aktivität oben genannter Transkriptionsfaktoren (Bandyopadhyay *et al.*, 1998).

1.1.1.2.1. Die Glutathionreduktase

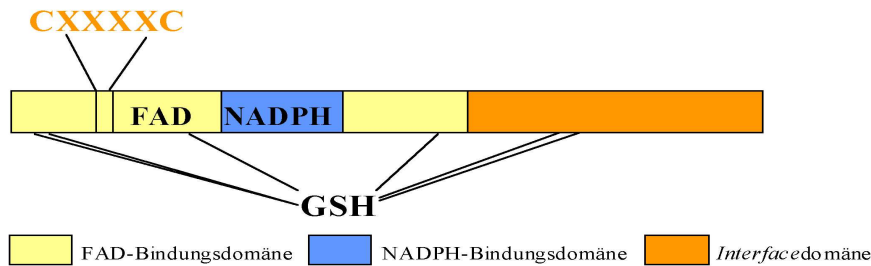


Abb. 1.7: Domänenstruktur der GR. Die GSH-Bindestelle ist diskontinuierlich über das Molekül verteilt.

Die der TrxR in Struktur und Funktion ähnliche GR (EC 1.8.1.7) (Abb. 1.7) katalysiert die Regeneration von GSSG zu GSH in Zytosol, Kern und Mitochondrien (Abb. 1.1). Sie ist in lebenden Organismen ein weit verbreitetes, aber kein ubiquitäres Enzym, denn sie fehlt manchen Dipteren (Kanzok *et al.*, 2001). Die GR ist wie die TrxR für die intrazelluläre Redoxhomöostase verantwortlich und repräsentiert die zweite Säule in der Verteidigung gegen ROS. Da Tumorzellen besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress sind, gilt die GR neben der TrxR auch als ein potentielles *drug target* (Abschnitt 1.2).

Als homodimere NADPH-abhängige Disulfidreduktase enthält jede 52.4 kDa große Untereinheit ein Molekül FAD und ist mit der anderen Untereinheit über eine Disulfidbrücke in der *intersubunit cavity* verbunden. Diese Brücke zwischen Cys90 und Cys90' in der flexiblen Region der *Interfacedomänen* ist ein Kennzeichen des humanen Enzyms, denn sie fehlt dem *E. coli*-Ortholog und die *cavity*-Regionen von hGR und GR aus *Plasmodium falciparum* weisen deutliche Unterschiede auf (Sarma *et al.*, 2003). Das aktive GR-Dimer dissoziiert auch bei großer Verdünnung nicht in seine Monomere. Einführungen von Punktmutationen im *Interface*bereich und damit verbundene Fehlfaltungen der GR gaben Aufschluss über einen möglichen Einsatz von Inhibitoren zur Untersuchung des Faltungs- und Dimerisierungsprozesses und die Entwicklung neuer *interface*-Peptidmimetika zur Hemmung dieses Prozesses. Eine Reihe weiterer GR-Inhibitoren sind mittlerweile bekannt und auch strukturell an der GR charakterisiert worden (Abschnitt 1.2).

Struktur und Katalysemechanismus des humanen Enzyms sind sehr gut untersucht und haben zu deren Aufklärung in anderen Spezies beigetragen (Bohme *et al.*, 2000; Karplus and Schulz, 1987; Karplus and Schulz, 1989; Krauth-Siegel *et al.*, 1998; Nordhoff *et al.*, 1993; Pai *et al.*, 1988; Pai and Schulz, 1983; Rietveld *et al.*, 1994; Sarma *et al.*, 2003). Ursprünglich aus humanen Erythrozyten isoliert (Krohne-Ehrich *et al.*, 1977), erreicht man durch heterologe Expression in *E. coli* eine sehr gute Ausbeute an hGR (Nordhoff *et al.*, 1993), die aufgrund ihrer Stabilität für umfangreiche Untersuchungen geeignet ist.

Im Verlaufe der reduktiven Halbreaktion werden zwei Elektronen von NADPH von der *re* Seite des Flavins auf das *active site*-Cysteindisulfid (Cys58-Cys63) auf der *si* Seite des Flavins übertragen. Dabei bildet sich durch das entstehende proximale Cys63-Thiolat ein *charge-transfer*-Komplex (CT-Komplex, 540 nm) aus. Anders als die TrxR (Abschnitt 1.1.1.1.2) ist die EH₂-Form der GR wohl die vorherrschende Enzymform *in vivo* (Bohme *et al.*, 2000). Der Elektronenfluss während der Katalyse bis zu dieser GR(EH₂)-Form kann anhand von spektralen Veränderungen über den Wellenlängenbereich von 400-600 nm verfolgt werden. Das farbige FAD sowie der CT-Komplex dienen dabei als Redoxindikatoren. In der oxidativen Halbreaktion wird der Elektronenakzeptor GSSG zu zwei Molekülen GSH reduziert und das *active site* Disulfid regeneriert. Das Thiol des distalen Cys58 bildet mit dem sich annähernden GSSG ein gemischtes Disulfid als Zwischenprodukt dieser Reaktion. Die Reoxidation des Enzyms erfolgt durch den Angriff des Cys63-Thiolats unter Bildung von

freiwerdendem GSH und zeichnet sich durch umgekehrte Absorptionsverhältnisse in den Spektren aus.

1.1.1.2.2. *Glutathion*

Glutathion ist das häufigste niedermolekulare Thiol in Säugerzellen und ist dort in millimolaren Konzentrationen (1-10 mM) vorhanden. Es handelt sich um ein Tripeptid aus γ -Glutamat, Cystein und Glycin, das in zwei Schritten mit Hilfe der γ -Glutamylcystein-synthetase (γ -GCS) (\approx Glutamat-Cystein-Ligase, GCL) und Glutathionsynthetase gebildet wird. Erstere überträgt im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt aktiviertes L-Glutamat auf L-Cystein zur Bildung von L- γ -Glutamylcystein. Die ebenfalls ATP-abhängige Glutathion-synthetase fügt anschließend das Glycin an. Der Syntheseprozess wird über die Feedbackhemmung des Endproduktes GSH reguliert (Anderson, 1998). Intrazelluläres Glutathion kann von den meisten Zellen exportiert werden, die es aber unter normalen Bedingungen nicht in signifikantem Maße aufnehmen können. Daher ist die Zelle auf die *de novo*-Synthese von GSH angewiesen, die sich unter ungünstigen Bedingungen über die Syntheseenzyme steigern lässt (Forman and Dickinson, 2003). Eine Reihe von Alternativreaktionen für die GSH-Biosynthese über die Umwandlung seiner Komponenten wurden beschrieben und gewährleisten seinen endogenen Bestand (Meister and Anderson, 1983). GSH stellt eine Speicherform für Cystein dar, bei der es auch in hohen Konzentrationen nicht mehr toxisch für die Zelle ist.

GSH ist nicht nur Substrat der GR, sondern wird auch von anderen antioxidativen Enzymen, insbesondere der Glutathionperoxidase als Kofaktor für die Reduktion von Peroxiden benutzt (Abschnitt 1.1.2.1). Des Weiteren agiert GSH nichtenzymatisch über die Modifikation von Protein-Disulfiden (Deglutathionylierung) oder über die Konjugierung von elektrophilen Verbindungen. Letztere Funktion ist für die Entgiftung von Xenobiotika (u.a. auch Kupfer) wichtig und spielt bei der Metabolisierung von Pharmaka eine Rolle (Filomeni *et al.*, 2002).

Die Zelle hat die Möglichkeit, auf oxidativen Stress anhand verschiedener Mechanismen zur GSH-Erhaltung zu reagieren. Dazu gehört eine gesteigerte GR-Aktivität sowie das Ausschleusen exzessiver GSSG-Mengen aus der Zelle. Begleitend dazu kann die γ -GCS aktiviert werden, neues GSH zu produzieren, oder der Thiol-Disulfid-Austausch wird dazu angeregt werden (Filomeni *et al.*, 2002).

Studien an isolierten Erythrozyten ergaben, dass der intrazelluläre GSH-Gehalt von extrazellulären Molekülen moduliert werden kann. Nach GSH-Gabe wurde intrazellulär mehr GSH gemessen, obwohl kein externes GSH die Erythrozytenmembran passiert hatte (Ciriolo *et al.*, 1993). Das würde einen Thiol-Disulfid-Austausch über Cysteinreste spezifischer Membranrezeptoren oder Transmembranproteine direkt voraussetzen. Neuere Studien beschäftigen sich mit dem umgekehrten Effekt, der Modulation des intrazellulären Redoxzustandes über die extrazelluläre Behandlung mit GSSG (Filomeni *et al.*, 2003).

Ein genereller GSH-Verlust kann zerstörend auf die Zelle wirken. Hierbei kann es zu einem durch Cytochrom c verursachten massiven GSH-Efflux aus der Zelle kommen (Ghibelli *et al.*, 1995). Es könnte somit einen Zusammenhang zwischen niedrigem intrazellulärem GSH-Level und dem Mitochondrienweg des programmierten Zelltods bestehen, dessen Vermittler das Cytochrom c ist. Bisher sind jedoch noch keine Linkermoleküle identifiziert worden.

1.1.1.2.3 *Glutathion und Krebs*

In Anknüpfung an die im letzten Abschnitt angesprochenen Zusammenhänge zwischen intra- und extrazellulärem GSH- bzw. GSSG-Bestand und dem Lebenszustand der Zelle soll nun speziell auf die Beeinflussung von proliferativen Zellen eingegangen werden. Da die mitochondriale Zelltodmaschinerie durch erhöhte Konzentrationen von GSSG ausgelöst werden kann, könnte die toxische Wirkung des GSSG auf Tumorzellen über die negative Regulation von TRAIL-Rezeptoren (Abb. 1.9) vermittelt werden, die in die Tumorsuppression involviert sind (Filomeni *et al.*, 2002).

Die meisten Tumorgewebe, insbesondere aber Lebertumore, weisen deutlich erhöhte GR-Aktivitäten im Vergleich zu den Ursprungsgeweben auf, was als selektiver Vorteil für die Zellen während der oxidativen Interaktion der Makrophagen angesehen werden kann (Muller *et al.*, 1993; Schirmer *et al.*, 2002). Resistenzen gegenüber antikanzerogenen Eingriffen sind häufig mit hohen GR-Aktivitäten und folglich einem hohen Gehalt an GSH verbunden, welches für die Inaktivierung von Pharmaka verantwortlich gemacht wird (Filomeni *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 2002). In manchen Fällen kann die Chemoresistenz auch auf eine durch GSH verursachte Apoptoseresistenz (Abschnitt 1.1.2.4) zurückgeführt werden (Friesen *et al.*, 2004). Kreuzresistenzen zu Medikamenten wie Mephalan, Nitrosoharnstoff oder Chinonsubstanzen werden seit längerem mit erhöhten intrazellulären GSH-Konzentrationen in Verbindung gebracht (Bachur *et al.*, 1978; Frischer and Ahmad, 1977; Suzukake *et al.*, 1983). Ein drastischer Anstieg an GSH konnte in Schuppenzellkarzinomen von Lungenzelllinien beobachtet werden, für die eine Resistenz gegen 4-Hydroxyfosfamid, Cisplatin und Methotrexat nach Langzeitbehandlung mit einer Kombination aus diesen Substanzen nachgewiesen worden war (Kawai *et al.*, 2002). In bestimmten Tumoren steigen die GSH-Level erst um ein Vielfaches an, wenn sich eine Resistenz gegenüber alkylierenden Agenzien eingestellt hat (Britten *et al.*, 1992).

Allgemein hat der GSH-Metabolismus wie auch der Trx-Metabolismus in Bezug auf das Krebsgeschehen sowohl protektive, als auch pathogene Effekte. Weiten sich die protektiven Effekte gegenüber oxidativen Stressoren bei sehr hohen GSH-Konzentrationen auf die Tumorzelle aus, hat sie die Chance zu überleben. Die Rolle des GSH bei der Tumorentwicklung hängt mit seiner Rolle als GST-Substrat bei den nukleophilen Substitutionen zu GSH-Konjugaten zusammen. Bleibt diese Umformung der Karzinogene infolge von GST-Mutationen aus, kann ein Tumor entstehen. GST-Polymorphismen gehen daher mit einem erhöhten Krebsrisiko einher (Balendiran *et al.*, 2004).

1.1.2 *Zellulärer Redoxstoffwechsel in der Tumorthherapie*

Die Beschreibungen des Trx- und Glutathionstoffwechsels weisen darauf hin, dass der Redoxstoffwechsel seine Funktionen an die Erfordernisse der Zelle anpassen kann. Dies geschieht auch dann, wenn die Zelle entartet und sich ihren normalen Kontroll- und Reparaturmechanismen entzieht. Somit spiegeln Veränderungen auf der Redoxstoffwechselebene in Form eines *pars pro toto* Veränderungen auf der Gesamtzelebene wider. Diesen Sachverhalt kann man sich auf zweierlei Art zunutze machen, indem man erstens den Redoxstoffwechsel als sensibles System begreift, seine gut nachweisbaren Komponenten auf Funktionsstörungen überprüft und kritische Komponenten gezielt ausschaltet. Zweitens können einzelne Bestandteile des Systems auch direkt für den Therapieansatz eines bestehenden Tumors genutzt werden (Abschnitt 1.2).

Im Folgenden werden wichtige Aspekte der therapeutischen Intervention und ihr Bezug zum zellulären Redoxstoffwechsel dargelegt.

1.1.2.1 Entgiftungssysteme (*Glutathionperoxidase, Glutathion S-Transferase*)

Werden im Rahmen der Tumorbehandlung fremde Substanzen in den Organismus eingebracht, reagiert er mit einer Reihe von Reaktionen, um diese entweder zu metabolisieren oder unverändert auszuscheiden. Solche Reaktionen werden von zwei Enzymen, der Glutathion S-Transferase (GST) sowie der Glutathionperoxidase (GPx) realisiert. Letzteres ist ein prominentes Antioxidans, das direkt Lipidperoxide und andere organische Hydroperoxide über GSH zu Wasser bzw. Alkohol reduzieren kann, die infolge einer prooxidativen Situation (z.B. bei Therapie) gebildet werden. Die GPx (EC 1.11.1.9) existiert in einer zytosolischen, gastrointestinalen, plasmatischen und spermien-spezifischen Form sowie in einer Phospholipidhydroperoxid-GPx-Form (Behne and Kyriakopoulos, 2001). Als Selenoprotein ist die GPx der Säuger insbesondere im Gehirn von Bedeutung, wo sie an Entgiftungsprozessen in Gliazellen und Neuronen maßgeblich beteiligt ist (Chen and Berry, 2003; Savolainen, 1978; Takizawa *et al.*, 1994). Sie wird über den Selenhaushalt reguliert, doch wird ihre Aktivität im Gehirn aufgrund der Selenretention erhalten (Gan *et al.*, 2002; Whanger, 2001). Daher könnte sie bei der Behandlung von Hirntumoren eine Rolle spielen (Abschnitt 4.5).

Das Entgiftungsprotein *per se* ist die GST (EC 2.5.1.18) (Mannervik and Danielson, 1988; Salinas and Wong, 1999). Sie detoxifiziert elektrophile Xenobiotika in Form von antikanzerogenen Substanzen, chemischen Karzinogenen und anderen Schadstoffen und inaktiviert ungesättigte Aldehyde, Chinone und Epoxide. Sie ist an Phase II-Reaktionen der Biotransformation über die Konjugation von GSH beteiligt. Die Konjugate werden über eine ATP-abhängige GS-X-Pumpe aus der Zelle eliminiert (Ishikawa, 1992). Es gibt drei verschiedene GST-Familien in Säugern, die zytosolische, die mitochondriale und die mikrosomale Familie mit spezifischen Aufgaben. Einige Vertreter der GST-Familie haben aufgrund ihrer GSH-Domäne auch GPx-Aktivität, was ein Hinweis für einen gemeinsamen evolutionären Ursprung von GPx und GST ist (Jiang *et al.*, 2004).

Im Allgemeinen gehen aus den GSH-Konjugationen reaktionsärmere Produkte hervor, die schnell ausgeschieden werden können. In wenigen Fällen entstehen aber auch reaktivere Produkte wie die Thioketene und Thionacylhalide in der Niere nach Konjugation von GSH mit Halogenalkanen in der Leber (Anders and Dekant, 1998). Diese Fähigkeit hat man sich bei der Entwicklung neuerer Chemotherapieformen (*prodrug design*) zunutze gemacht, z.B. um gegen Tumore vorzugehen, die spezielle GSTs überexprimieren (Lyttle *et al.*, 1994). Ein aktuelles Beispiel aus der Tumorforschung ist die Verbindung PABA/NO⁴, die bei Metabolisierung durch die GST aktives zytolytisches Stickoxid ergibt (Findlay *et al.*, 2004).

1.1.2.2 Regulationsmechanismen

Das Ziel der Tumorthherapie ist die Schwächung der Zelle bis hin zu ihrer Abtötung. Daher lassen sich die Chemotherapeutika in ihrer Eigenschaft als zytostatisch oder zytotoxisch charakterisieren. Zytostatika verändern die Tumorbiologie durch die Hemmung des Tumorwachstums und/oder der Metastasierung, vernichten die Zelle aber nicht direkt. Halten die hemmenden Einflüsse allerdings lange an, stirbt die Zelle schließlich auch. Zytotoxische Agenzien hingegen vermitteln den unmittelbaren Zelltod. Dieser kann über verschiedene Mechanismen wie DNA-Alkylierung oder -Crosslinking, Zerstörung von Komponenten der Mitose, aber auch über die direkte Induktion apoptotischer Signalwege (Abschnitt 1.1.2.2.2) ausgelöst werden.

⁴ PABA/NO: (O²-[2,4-dinitro-5-(N-methyl-N-4-carboxyphenylamino)phenyl] 1-N,N-dimethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolat)

Die Erforschung der molekularen Hintergründe der Regulation antiproliferativer Wirkungen auf die Zelle ist besonders wichtig für den Erfolg der Tumortherapie.

1.1.2.2.1 Zellzyklus

Eukaryotische Zellen haben ein komplexes Netzwerk von regulatorischen Proteinen entwickelt, welches die Progression zellulärer Vorgänge über den Zellzyklus steuert. Über die Variation und Kombination biochemischer Parameter lassen sich zentrale Prozesse wie die DNA-Synthese und -Replikation kontrollieren. Kontrollpunkte befinden sich an den Übergängen der verschiedenen Zyklusphasen G1, S, G2 und M. G1, S und G2 ergeben zusammen die Interphase, die in humaner Zellkultur einen Zeitraum von 24 h einnimmt. Dies ist im Gegensatz zum einstündigen Mitoseereignis in der M-Phase ein enormer Zeitaufwand, der es der Zelle in den *gap*-Phasen erlaubt, eine Art *self monitoring* durchzuführen, um sicherzustellen, dass die Bedingungen für die Reproduktionsphasen optimal sind. Dabei kann die G1-Phase je nach externem Signal in ihrer Länge stark variieren und bei ungünstigen Bedingungen erst mal eine Progression verzögern oder die Zelle gar in einen Ruhezustand versetzen (G0-Phase) (Alberts *et al.*, 2002; Lewin, 1997).

Der Verlust der Abhängigkeit der Zellzyklusprogression von externen Wachstumsfaktoren sowie der Verlust der Kontrolle an den Restriktionspunkten der Zelle ist das Charakteristikum von Tumorzellen. Die Zellzyklusphasen sind durch ihren Höchstgehalt an bestimmten Zyklinen charakterisiert. Zykline binden an eine oder mehrere Zyklin-abhängige Kinasen (cdks) und regulieren damit die enzymatische Aktivität funktioneller Kinasen. Die Aktivität von Zyklin-abhängigen Proteinkinasen wird über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen sowie über natürliche Inhibitoren reguliert. Die cdks werden über das Kernlokalisierungssignal der Zykline an ihren Wirkort gebracht (Löffler and Petrides, 1997).

Thioredoxin kontrolliert über seine redoxregulatorischen Eigenschaften einige Proteine, die mittelbar oder unmittelbar am Zellzyklusgeschehen beteiligt sind. Die Synthese der dNTPs in der S-Phase oder die Regulation von Proteinkomplexen vor deren Eintritt in die G1-Phase sowie die Zusammenlagerung der Mikrotubuli in der M-Phase sind von der Aktivität des Thioredoxins abhängig (Abate *et al.*, 1990; Jordan and Reichard, 1998; Khan and Luduena, 1991).

Kulturen von Säugerzellen entwickeln gelegentlich Mutationen, die ihnen eine erleichterte oder sogar unbeschränkte Proliferation ermöglichen. Man spricht dann auch von immortalisierten Zelllinien, die aufgrund ihrer homogenen, genetisch stabilen Eigenschaften in detaillierten zellbiologischen Studien von Vorteil sind. Die Wirkweise von Chemotherapeutika auf den Zellzyklus lässt sich anhand solcher Zelllinien ebenfalls gut nachvollziehen (Alberts *et al.*, 2002).

Eine Akkumulation der Wildtypform des Tumorsuppressors p53 führt bekannterweise zum G1-Zellzyklusarrest. Da in Tumoren, wie z.B. in Hirntumoren, häufig eine Mutation des p53-Gens vorkommt (in 30% aller Fälle von Glioblastomen) und die Sensitivität gegenüber Radio- und Chemotherapie bei solchen Tumoren herabgesetzt ist, wurden Zusammenhänge zwischen dem p53-Status und dem Ansprechen der Tumortherapie diskutiert (Birner *et al.*, 2002). Durch den Verlust der p53-Funktion könnte der G1-Arrest übergangen und somit der Tumorzelle die Möglichkeit zur Reparatur ihrer geschädigten DNA entzogen werden. Es wird vermutet, dass die Expression von p53 in Gliom-Patienten deren Sensitivität gegenüber adjuvanter Radio- und Chemotherapie erhöht und sich positiv auf deren Lebenserwartung auswirkt (Birner *et al.*, 2002; Kyritsis *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 2004).

Wie bereits erwähnt kann es vorkommen, dass die Zelle aufgrund von Zellzyklusstörungen in den permanenten Ruhezustand versetzt wird. Führen Signaltransduktionsvorgänge zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest, spricht man von dem Phänomen der zellulären Seneszenz.

Tumorzellen sind in der Lage, sich dem Seneszenzprogramm zu entziehen, können aber infolge gezielter DNA-Schädigung erneut zur Seneszenz angeregt werden. Solche Zellen bleiben metabolisch noch aktiv und produzieren Faktoren, die unterstützend oder inhibierend auf das Tumorstadium wirken können. In Lymphozyten wird das "Seneszenzprotein" Suv39h1, eine Methyltransferase, bei erhöhter Aktivität von Ras-Onkogen aktiviert und stellt einen Schutz der Zellen vor unkontrolliertem Wachstum dar. Fehlt dieses Protein, können sich aggressive Tumore entwickeln. Das Apoptoseprogramm wird dann schließlich völlig lahmgelegt. Der Einsatz von Zytostatika, die eine gezielte Seneszenz induzieren und damit das Wachstum chemoresistenter Tumorzellen stoppen sollen, stellt eine neuere Behandlungsmöglichkeit bei Krebs dar (Braig *et al.*, 2005).

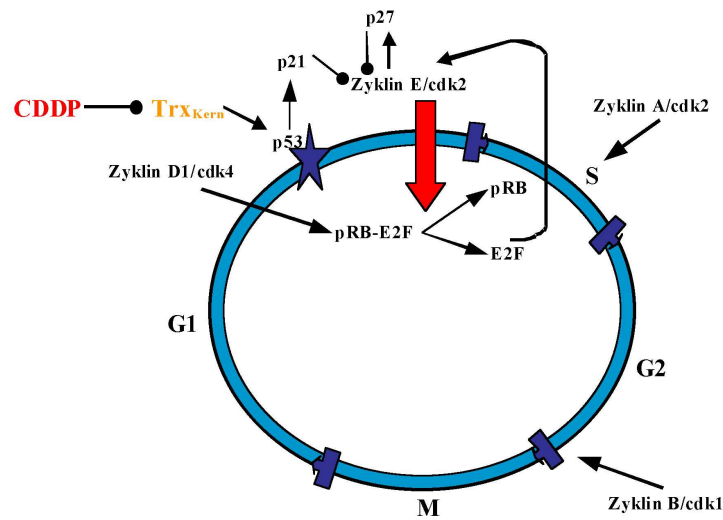


Abb. 1.8: Der Zellzyklus mit seinen Phasen und einigen redoxabhängigen und unabhängigen Kontrollpunkten (modifiziert nach Donnellan and Chetty, 1999). pRB = Retinoblastom-Protein; E2F = Transkriptionsfaktor. Verschiedene Kombinationen aus Zyklinen, Zyklin-abhängigen Kinasen und deren Inhibitoren regulieren den Phasenablauf. Zyklin E bildet mit cdk2 einen Komplex zur Regulation des Übergangs von der G1- zur S-Phase. Eine wichtige Funktion hat p53 (Abb 1.9) am zentralen Kontrollpunkt des Zellzyklus in der mittleren bis späten G1-Phase. Es konnte gezeigt werden, dass Trx bei oxidativem Stress direkt oder indirekt über Ref-1 mit p53 interagiert und eine Rolle bei der Stimulierung der p53-Funktion spielt. Durch CDDP wird die Translokation des Trx vom Zytosol in den Zellkern induziert (Seemann and Hainaut, 2005; Ueno *et al.*, 1999).

Die Seneszenz wird *in vitro* und *in vivo* am stärksten durch antikanzerogene Substanzen wie Doxorubicin, Cisplatin oder Etoposid ausgelöst, die die DNA-Struktur angreifen und weniger stark durch solche Substanzen induziert, die auf die Mikrotubuli wirken (Chang *et al.*, 1999a; Roninson, 2002). In verschiedenen Studien wurden die Hintergründe der stressinduzierten Seneszenz (STASIS, *stress or aberrant signaling-induced senescence*) erforscht. Dabei stellte sich heraus, dass Faktoren wie p53, p21 und p16, die an der Ausbildung der physiologischen Seneszenz gesunder Zellen beteiligt sind, auch eine Rolle in der Seneszenz von Tumorzellen spielen. Nach einem p53- oder p16-*knockout* in murinem E γ -myc-Lymphom ist die medikamenteninduzierte Seneszenz *in vivo* nicht mehr möglich (Schmitt *et al.*, 2002). Der gleiche Effekt wird beobachtet, wenn in Fibrosarkomzellen (HT1080) die p53-Expression gehemmt wird (Chang *et al.*, 1999b). Auf der anderen Seite kann die chemotherapeutisch-induzierte Seneszenz auch unabhängig von p53, p16 oder p21 ablaufen, so dass zusätzliche zelluläre Komponenten involviert sein müssen. Des Weiteren sei auch darauf hingewiesen, dass die genannten Tumorsuppressorgene bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielen. So beeinflussen sich die Effekte der Apoptose und des Zellzyklusarrestes auch gegenseitig (Gatti *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2004) und müssen bei der Interpretation von Zellkulturdaten berücksichtigt werden (Abschnitt 4.5).

1.1.2.2.2 Apoptose

Die Apoptose wird als aktives, inhärent programmiertes Phänomen der Zelle beschrieben, das durch physiologische oder pathologische Stimuli aus der Umgebung initiiert oder inhibiert werden kann (Kerr *et al.*, 1972). Sie wird auch als programmierter, aktiver oder kontrollierter Zelltod bezeichnet, denn sie hat im Gegensatz zur Nekrose keinen unmittelbaren tödlichen Schaden der Zelle zur Folge, sondern führt über geregelte Mechanismen zu ihrem "Selbstmord". Die Apoptose dient der korrekten Organentwicklung, ist verantwortlich für die Eliminierung von Zellen in der Embryonalentwicklung oder bewirkt das gezielte Ausschalten von infizierten, DNA-geschädigten oder entarteten Zellen (Danial and Korsmeyer, 2004; Kerr *et al.*, 1972; Norbury and Zhivotovsky, 2004).

Die im Verlaufe der Apoptose entstehenden morphologischen Veränderungen bestehen in der nuklearen und zytoplasmatischen Kondensation und damit einhergehender Zellschrumpfung, Zellmembranveränderungen, Kern(DNA)fragmentierung, Ausbildung typischer apoptotischer Vesikel, Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien sowie in der Aktivierung von sog. Cystein-Aspartat-Proteasen (Caspasen) (Gottlieb, 2001; Kerr *et al.*, 1972). Diese Veränderungen lassen sich experimentell als Apoptosemarker nachweisen (Gavrieli *et al.*, 1992).

Durch spontane Reaktionen in unbehandelten malignen Zellen, aber auch als Folge therapeutisch erzielter Tumorregression wird der apoptotische Zelltod beobachtet (Negoescu, 2000). Da die fundamentalen Mechanismen der Apoptose heute gut erforscht sind, kann man sie sich für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien einer kontrollierten Apoptose in kranken Geweben zunutze machen. Dies wird in zunehmendem Maße in der Krebsforschung berücksichtigt und umfasst u.a. Ansätze, in denen durch chemische Mimetika gezielt Protein-Protein-Wechselwirkungen zugunsten der Apoptoseinduktion manipuliert werden (Denicourt and Dowdy, 2004; Li *et al.*, 2004; Walensky *et al.*, 2004).

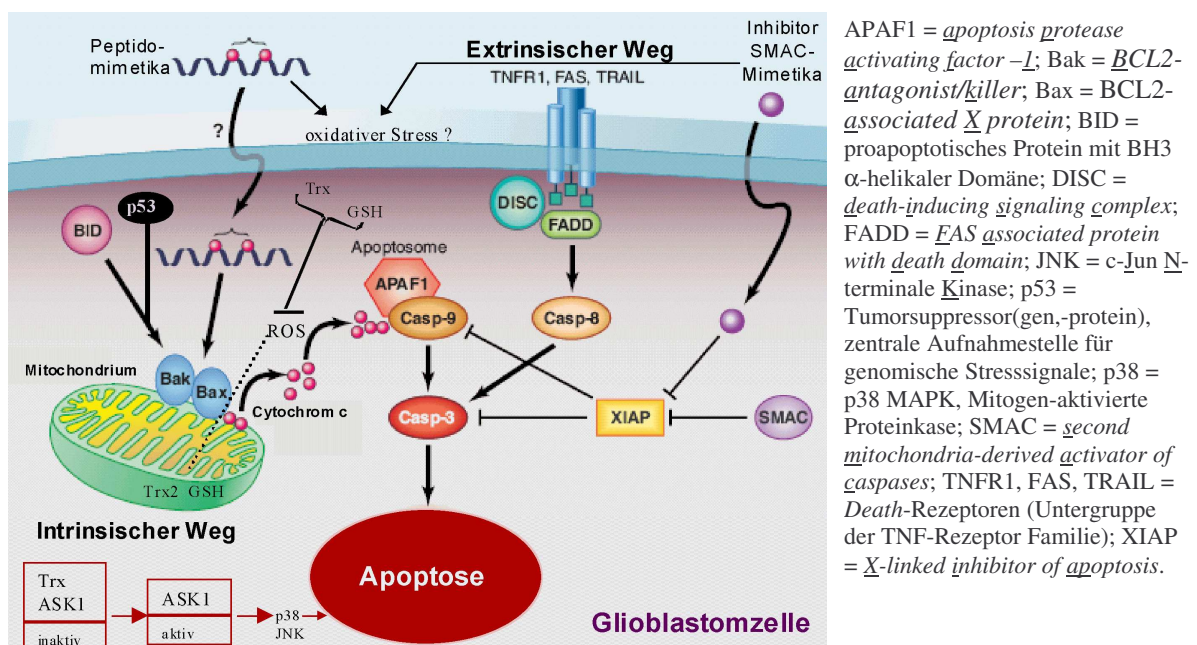


Abb. 1.9: Beeinflussung der Apoptose in Krebszellen durch Therapeutika und Redoxregulierung (modifiziert nach Denicourt and Dowdy, 2004). Die Caspase 8 ist Bestandteil der Apoptosekaskade im Rahmen der T-Zell Immunantwort, die Caspase 9 ist notwendig für die durch Pharmaka, Strahlung oder Glukokortikoide induzierte Apoptose.

Es sollte zwischen den verschiedenen Möglichkeiten der Apoptoseumsetzung unterschieden werden. So wurden Zusammenhänge zwischen der Steroidhormon-induzierten Apoptose und der antioxidativen Rolle der GST sowie der TNF- α -vermittelten Apoptose und der antioxidativen Rolle der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) beschrieben (Briehl *et al.*, 1997). Darüber hinaus weiß man heute, dass es neben dem Caspase-abhängigen Weg der Apoptose auch unabhängige letale Wege gibt, die die Zelle nutzen kann und die apoptoseähnliche Symptome hervorrufen. Es gibt eine Reihe physiologischer Zelltod-erscheinungen, die nicht der klassischen Apoptose zuzurechnen sind, wie die Autophagie oder aber die Elimination von Organellen in Zellen von Linsenfasern (Lockshin and Zakeri, 2004). Derartige Alternativen werden gewählt, wenn die Caspaseaktivierung blockiert ist. Dieses Repertoire der Zelle macht es zuweilen schwierig, eine bestimmte Reaktion durch das Ausschalten einzelner Faktoren (z.B. Hemmung eines Enzyms) hervorzurufen. Der Caspase-unabhängige Weg kann über Staurosporin, einen Proteinkinase C-Inhibitor, über den Bax-Faktor oder die hybridpolare Substanz Hexylmethylen-bisacetamid (HMBA) induziert werden (Deas *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1997; Ruefli *et al.*, 2000). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass verschiedenartige Therapeutika unterschiedliche Caspase-abhängige Aktivitäten aufweisen. Zytotoxische Therapeutika, die die DNA schädigen, lösen den Caspase-unabhängigen Zelltod u.a. über die p53-abhängige Bax-Hochregulierung und mitochondriale Stimulierung aus (Norbury and Zhivotovsky, 2004; Ruefli *et al.*, 2001). Das durch genomischen Stress stark induzierbare p53 bildet die zentrale Schaltstelle zwischen der Arretierung des Zellzyklus und der Apoptoseinduktion. Bei dem Zusammenspiel mehrerer Systeme ist das richtige *timing* wichtig, denn in der Zelle sind nicht zu jedem Zeitpunkt alle Gene oder Proteine gleichermaßen aktiv und die Rückkopplungsmechanismen benötigen eine gewisse Zeit. Die Entwicklung apoptotischer Erscheinungen kann innerhalb weniger Stunden, aber auch erst nach Tagen erfolgen und mag daher zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich beeinflussbar sein.

Es besteht Grund zu der Annahme, dass Reduktionen und Oxidationen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Apoptose und Zellzyklusarrest spielen. Das Thioredoxin- und Glutathionsystem regulieren Zellwachstum und Zelltod durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Sensitivierung der Zellen gegenüber Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie die direkte Aktivierung von Komponenten apoptotischer Stoffwechselwege (siehe Abschnitt 1.1.1.1) (Kwon *et al.*, 2003). Durch Erhöhung des Thiolgehaltes lässt sich die ROS-induzierte Apoptose beeinflussen und einer erneuter Stresssituation vorbeugen (Ueda *et al.*, 2002). Zwei Beispiele hierfür sind die GSH-Abhängigkeit des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 sowie die Inhibierung der ROS-induzierten Apoptose durch ASK1-Ubiquitinierung und -Degradation über Trx(SH)₂.

In Studien konnten negative Korrelationen zwischen der Trx/TrxR-Expression und der Apoptose bei Krebs festgestellt werden, die zu einer hohen Überlebensrate von Lungen- oder Thymuskarzinomzellen führte (Baker *et al.*, 1997; Soini *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass die antiapoptotische Wirkung die Chemoresistenz fördern kann und dass das Thioredoxinsystem mit der Tumorgenese assoziiert wird, spricht für eine gezielte TrxR-Hemmung als proapoptotischem Therapieansatz. Es ist sogar möglich, Apoptose über Trx-Inhibitoren ohne massive Störung der intrazellulären Redoxhomöostase auszulösen (Pallis *et al.*, 2003). Ein interessantes Beispiel ist auch die unmittelbare Auslösung des apoptotischen Zelltods nach dem lipidunterstützten Einbringen von derivatisierter TrxR in Tumorzellen (Anestal and Arner, 2003).

1.2 Rationale Medikamentenentwicklung

Die Entwicklung von Medikamenten ist eine langwierige und kostspielige Angelegenheit, so dass man bemüht ist, Alternativen zum sog. *high throughput screening* von Substanzen zu finden. Eine Alternative bietet das *rational drug design*, anhand dessen bestimmte Protein-Zielmoleküle aus dem Stoffwechsel ausgewählt und möglichst genau charakterisiert werden. Ein zentraler Punkt ist dabei die Strukturaufklärung dieser *targets*, um anhand der gewonnenen Informationen Kernsubstanzen aus einem Substanzbestand auszuwählen, Substratanaloga herzustellen oder neue Inhibitormoleküle zu entwickeln (Kirkpatrick *et al.*, 1999b).

Der Redoxmetabolismus als sensibles und feinreguliertes System bietet viele potentielle Targetmoleküle, die speziesspezifische Unterschiede aufweisen und bei veränderter Gesamtstoffwechsellaage z.B. infolge eines Tumors ihre Eigenschaften anpassen.

1.2.1 Redoxproteine als "drug targets"

Das Thioredoxinsystem, insbesondere die TrxR ist in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert, die einer medizinischen Intervention bedürfen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Zusammenhang zwischen Trx/TrxR und einigen pathologischen Erscheinungen.

Tabelle 1-II: Beispiele einiger Erkrankungen, in deren Verlauf Veränderungen im Trx-System beobachtet wurden.

Erkrankung	Link zum Trx/TrxR System	Referenzen
Infektionserkrankungen wie <i>Epstein-Barr Virus (EBV)</i> oder <i>HIV/AIDS</i> ; <i>Sjögren's Syndrom</i> (chronische Entzündungsreaktion, assoziiert mit EBV)	Korrelation zwischen der Produktion von EB-Virionen und der Trx-Synthese in infizierten Zellen; verminderte Synthese von TrxR und vermehrte Bildung niedermolekularer Se-Verbindungen	(Pace and Leaf, 1995) (Gladyshev <i>et al.</i> , 1999) (Saito <i>et al.</i> , 1996)
<i>Rheumatoide Arthritis (RA)</i>	Signifikant erhöhte Trx-, TrxR-Level in der Synovialflüssigkeit und in Geweben von Patienten mit RA (synoviale Trx-Level ~ Schweregrad der lokalen Entzündung)	(Saito <i>et al.</i> , 1996) (Maurice <i>et al.</i> , 1999)
<i>Krebs</i>	<u>Frühe Tumorstadien</u> : antioxidative Funktion des Trx-Systems (u.a. über Methylselenol-recycling), <u>spätere Stadien</u> : Unterstützung der Zellproliferation über die DNA-Produktionsmaschinerie; Sekretion von Trx und trunkiertem Trx aus neoplastischen Zellen (mitogene Zytokine); Trx-, TrxR-Level ↑↑↑ in Tumorzellen und -gewebe	(Gladyshev <i>et al.</i> , 1998) (Kahlos <i>et al.</i> , 2001) (Haapasalo <i>et al.</i> , 2003)
<i>Alzheimer (AD, Alzheimer Disease)</i>	TrxR-Aktivität ↑, Trx-Proteinlevel ↓ in Amygdala und Cerebellum in AD Hirnen	(Lovell <i>et al.</i> , 2000)
<i>Arteriosklerose</i>	Hochregulierung der TrxR1 in arteriosklerotischen Plaques, TrxR1-Expression in den Makrophagen-Schaumzellen, TrxR1-mRNA Level ↑↑ in oxidierten LDL, Microarray- und RT-PCR-Daten ergaben Hochregulationen von Genen des Thioredoxin- und Glutathionsystems; z.T. günstige, aber auch ungünstige Bedingungen beschrieben	(Furman <i>et al.</i> , 2004) (Hagg <i>et al.</i> , 2005)

Eine frühzeitige richtige Einschätzung der Krankheitssituation und eventuelles Eingreifen sind wichtig, durch eine spezifische Hemmung des Trx-Systems kann aber auch einer Verschlechterung der Verhältnisse vorgebeugt werden (Kirkpatrick *et al.*, 1997; Powis *et al.*, 1994).

Obwohl das Trx-System zahlreiche zelluläre Prozesse beeinflusst (Abschnitt 1.1.1.1), ist die Zahl reaktiv unterscheidbarer Inhibitoren der involvierten Enzyme noch relativ gering. Dazu kommt, dass einige Substrate der TrxR fälschlicherweise als deren Inhibitoren definiert wurden, da sie nicht direkt über den NADPH-Verbrauch und die K_M -Werterhöhung bestimmt wurden (Arteel *et al.*, 1999; Gromer and Gross, 2002).

Das Konzept der direkten Trx-Inhibition ist relativ neu und in Bezug auf Selektivität und Effektivität noch nicht ausgereift, dennoch kann es in solchen Fällen von Vorteil sein, in denen die extrazelluläre Trx-Aktivität den Verlauf einer Krankheit entscheiden kann. Als Trx-Inhibitoren gelten Alkylimidazoldisulfide (z.B. PX-12, 1-Methylpropyl-2-imidazoldisulfid) und davon abgeleitete Verbindungen, von denen angenommen wird, dass sie hTrx über eine zeit- und konzentrationsabhängige irreversible Alkylierung seines Cys73-Thiols inaktivieren und somit eine Wachstumshemmung von Krebszellen hervorrufen (Kirkpatrick *et al.*, 1997; Kirkpatrick *et al.*, 1999a).

Verschiedene natürlich vorkommende Naphthochinon-Spiroketalverbindungen sind effektive Inhibitoren des Trx-Systems, die *in vitro* spezifisch für Trx oder spezifisch für die TrxR sind und zum Teil in Konzentrationen von 350 nM bereits zu 50% Proteinhemmung führen. Betrachtet man den wachstumshemmenden Effekt auf Brustkrebszellen, sei zu vermerken, dass für diese Art von Verbindungen wohl noch andere zelluläre *targets* ausserhalb des Trx-Systems in Frage kommen (Wipf *et al.*, 2001).

Phortress ist eine neue wirksame und selektive antikanzerogene Verbindung, deren Aktivierungsmechanismus über die CYP1A1⁵-katalysierte Biotransformation von 2-(4-Amino-3-methylphenyl)-5-fluorobenzothiazol zu elektrophilen Spezies führt, die kovalent an die DNA binden und sensitive Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* schädigen (Bradshaw *et al.*, 2002). Die Analyse der durch Aminophenylbenzothiazolverbindungen ausgelösten DNA-Schädigung mit Einstrang- und Doppelstrangbrüchen und temporärem Zellzyklusarrest ergab einen signifikanten und selektiven Einfluss auf sensitive MCF-7-Brustkrebszellen (Soule *et al.*, 1973) im Gegensatz zur inhärenten Resistenz von MDA-MB-435-Brustkrebszellen (Cailleau *et al.*, 1978). Die Selektivität dieser Verbindungen für spezielle Tumore kann von Vorteil sein im Hinblick auf die Reduktion systemischer Nebeneffekte der Chemotherapie. Eine Weiterentwicklung der Substanzklasse der Benzothiazole erfolgte durch die Verbindung AW464, einem Benzothiazol-substituierten heteroaromatischen Chinol. Diese Verbindung ist aktiv gegen gegen Kolon-, Nieren- und einige Brustkrebszelllinien. Analysen des National Cancer Institutes in den USA (NCI COMPARE)⁶ ergaben mögliche Interaktionen mit dem Trx-System, welches auch unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wird. Neben den potentiellen antikanzerogenen Eigenschaften wurden auch die antiangiogenetischen Eigenschaften von AW464 untersucht (Mukherjee *et al.*, 2005). Die effektive Inhibitor-konzentration (IC_{50})⁷ in Tumor- und Endothelzellen lag bei $\sim 0.5 \mu M$. Die zytotoxischen und antiangiogenetischen Effekte auf proliferierende Endothelzellen und den endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) scheinen unter hypoxischen Bedingungen verstärkt zu sein, so dass unter diesen Bedingungen eine geringere Arzneibelastung möglich ist (Mukherjee *et al.*, 2005).

⁵ CYP1A1 = *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*; Mitglied der Cytochrom P450-Familie, einer Familie aus Monooxygenasen, die an Reaktionen zur Metabolisierung von Arzneimittelwirkstoffen beteiligt sind. CYP1A1 kann polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen zu kanzerogenen Intermediaten metabolisieren.

⁶ COMPARE = *Computerised Pattern Recognition Algorithm*

⁷ IC_{50} = Inhibitor-konzentration, die die Proliferationsrate von Zellen zu 50% senkt.

Thioredoxin wurde als molekulares Zielmolekül für AW464 und andere verwandte antikanzerogene Chinolsubstanzen anhand von enzymatischen Studien, Bindungs- und Microarrayanalysen identifiziert (Bradshaw *et al.*, 2005). Der potentielle Inhibitionsmechanismus beinhaltet eine kovalente Bindung zu einem der beiden redoxaktiven Cysteine (Cys32 oder Cys35) in hTrx mit der Bildung eines Monoschwefeladdukts und die anschließende Addition des zweiten Cys-Thiols zur Bildung eines irreversiblen Komplexes (Bradshaw *et al.*, 2005; Pallis *et al.*, 2003).

Die TrxR kann aufgrund ihres Selenocysteinbesitzes wesentlich selektiver als Trx gehemmt werden und die Zahl ihrer Inhibitoren ist deutlich größer. Die meisten irreversiblen TrxR-Inhibitoren reagieren mit einem oder mehreren redoxaktiven Resten (Cystein und Selenocystein) nur in Anwesenheit von NADPH, was die Reduktion des C-terminalen aktiven Zentrums der TrxR voraussetzt. Als Inhibitoren der TrxR mit potentieller Anwendung in der Chemotherapie gelten z.B. Nitrosoharnstoffverbindungen (Gromer *et al.*, 1997) (Abschnitt 1.2.2), Dinitrohalogenbenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzen, CDNB) (Arnér *et al.*, 1995), organische Chalkogene (Engman *et al.*, 2003a; Engman *et al.*, 2003b; Engman *et al.*, 2000; McNaughton *et al.*, 2004), Naphthazarinderivate (Dessolin *et al.*, 2001; Irmeler *et al.*, 2002) sowie natürliche Produkte spiroketalen Naphthodecalinverbindungen (Wipf *et al.*, 2004). Diese Inhibitoren sind in Zellkultur im unteren mikromolaren Bereich aktiv, doch sind sie zum Teil unselektiv, instabil und zeigen häufig unerwünschte Nebenreaktionen.

Cis-Platin(II)-Komplexe sind bekannte antineoplastische Verbindungen mit klinischer Relevanz. Cisplatin (*Cis*-Diamindichlorplatin, CDDP) ist ein potentes Elektrophil, das bevorzugt mit vorhandenen Thiolen, Selenolen oder anderen Nukleophilen reagiert. Daher ist es unter reduzierenden Bedingungen auch ein effektiver TrxR-Inhibitor (Sasada *et al.*, 1999). Derivate von (2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexen sind neuere und deutlich effektivere TrxR-Inhibitoren (Becker *et al.*, 2001). *In vitro*-Studien bestätigten, dass die Interkalation der DNA nicht der einzige Wirkmechanismus dieser Zytostatika ist. Einige Terpyridinplatin Komplexe hemmen die hTrxR in enzymatischen Assays bereits im nanomolaren Bereich und sind in malignen Zellkulturlinien im unteren mikromolaren Bereich wirksam (Becker *et al.*, 2001; Lowe *et al.*, 1999). Mercaptopyridin-Platin(II)-Komplexe und ihre *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität bei Hirntumoren standen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit und werden in den Abschnitten 3.5. und 4.5 ausführlich behandelt.

Goldverbindungen finden seit langem Einsatz in der Medizin und Gold(I)-Verbindungen wie Auranofin oder Aurothioglucose sind für ihren effektiven und selektiv hemmenden Einfluss auf die TrxR im nanomolaren Bereich und auf Tumorzelllinien im mittleren mikromolaren Bereich bekannt (Gromer *et al.*, 1998a; Smith *et al.*, 1999).

Eine völlig neue Inhibitorklasse der TrxR, aber auch der GR sind sog. Phosphorkomplexe, die als Gold-, Platin- oder Palladiumphosphor-Komplexe die Eigenschaften von Schwermetallen über ein Phosphoratom an einem Phosphacyclopentadiengerüst kombinieren und relativ leicht mit Nukleophilen wie z.B. Thiolen reagieren (Fave *et al.*, 2003; Hay *et al.*, 2003; Hay *et al.*, 2001; Irmeler *et al.*, 2002). Die Abschnitte 3.6 und 4.6 dieser Dissertation beschreiben mechanistische und strukturelle Charakterisierungen der Phosphorkomplexe anhand ihrer Interaktion mit Disulfidreduktasen.

Eine aktuelle Validierung der TrxR als *drug targets* anhand bestimmter Kriterien wie der Hemmung vitaler Signalwege oder der Zellzyklusprogression sowie der Unterstützung der Zytotoxizität identifizierte diese als ideales Zielmolekül für Chemotherapeutika, die oxidativen Stress induzieren (Smart *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Validierung wurden permanente Zellkulturen mit stabiler Überexpression des Wildtyps oder einer Cys-Ser-Mutante der TrxR verwendet, die mit einem pharmakologischen TrxR-Inhibitor und anschließend mit oxidativen Stressoren wie H₂O₂ oder ionisierender Strahlung behandelt wurden. Eine deutlich erhöhte Sensitivität der TrxR-überexprimierenden Zellen konnte festgestellt werden. Die Möglichkeit der Überexpression enzymatisch aktiver Sec-

enthaltender TrxR in transfizierten humanen Nierenzellen wurde erst kürzlich demonstriert (Nalvarte *et al.*, 2004). Diese TrxR kann ihre zellulären Effekte vollständig erfüllen. Bei der Hemmung der TrxR in Zellen geht man von einer Reihe aufeinanderfolgender prooxidativer Effekte aus. Folgen der verminderten TrxR-Aktivität sind eine ungenügende Regeneration ihrer Substrate (v. a. Thioredoxin) sowie eine herabgesetzte antioxidative Kapazität und damit eine Vermehrung der ROS. Mit Dinitrochlorbenzol (DNCB) derivatisierte TrxR bildet z.B. ihrerseits Superoxid und fördert zusätzlich den oxidativen Stress (Nordberg *et al.*, 1998). Das oxidierender werdende Milieu begünstigt auch die GSSG-Bildung und Glutathionylierung bestehender Proteinthiole. Als Folge der verminderten Bildung von funktionellem Trx steigen die Trx-Expression bzw. die Sekretion von oxidiertem Trx aus der Zelle an. Am Ende wird zudem eine vermehrte TrxR-Expression erwartet, um die enzymatische Blockade zu überwinden und das Redoxgleichgewicht wieder herzustellen (Nordberg and Arner, 2001).

1.2.2 Strukturanalyse von Redoxproteinen und Protein-Inhibitor-Komplexen

Der Strukturanalyse geht eine Kristallisation der Proteine voraus, die unter variablen Bedingungen stattfinden und zu verschiedenen Kristallformen führen kann. Die Kristallisation von Proteinkomplexen bedarf besonderer Berücksichtigung und setzt eine stabile und dauerhafte Bindung der Komponenten voraus. Die Güte der Kristalle wird erst während der Röntgenstrukturanalyse anhand ihrer Beugungseigenschaften bestimmt.

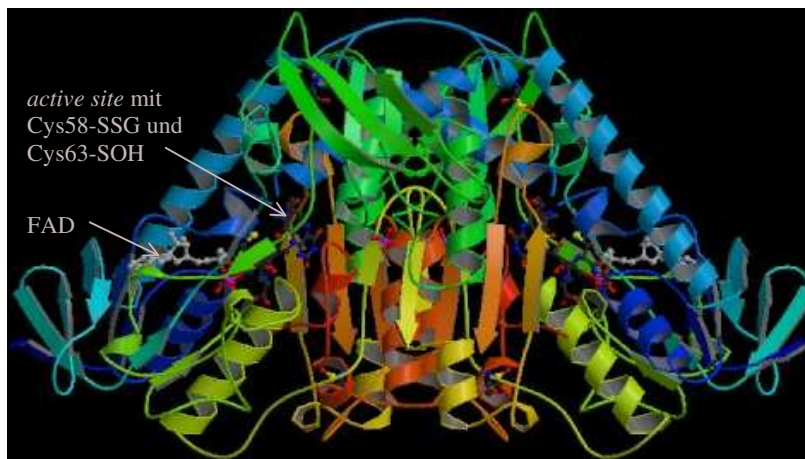


Abb. 1.10: Röntgenstruktur der mit *S*-Nitrosoglutathion modifizierten hGR (PDB-Code 1GSN) bei 1.7 Å Auflösung. Gezeigt ist das biologische Dimermolekül mit gemischtem Disulfid zwischen Cys58 und Glutathion (GSH1030). Cys63 liegt in der oxidierten Form als Sulfensäure (R-SOH) vor. In dieser Struktur wurden drei weitere lösungsmittelzugängliche Cysteine (Cys234, Cys284 und Cys423) mit Sulfensäuregruppen identifiziert (Becker *et al.*, 1998).

Die humane Glutathionreduktase als gut kristallisierendes Protein bietet sich für die Strukturforschung mit Disulfidreduktaseinhibitoren an. In der Chemotherapie zur Anwendung kommende Substanzen wie Nitrosoharnstoffverbindungen sind in mikromolaren Konzentrationen effektive Inhibitoren dieser GR *in vitro* (Becker *et al.*, 1995; Becker and Schirmer, 1995; Schallreuter *et al.*, 1990). Es wurden bereits verschiedene Kristallstrukturen der hGR nach Modifikation mit Inhibitoren gelöst, so z.B. mit 1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (BCNU = Carmustin) (PDB-Code 1 GRG (Karplus *et al.*, 1988)), *S*-Nitrosoglutathion (GSNO) und Diglutathionyl-dinitroso-Eisen (DNIC-[GSH]₂) (PDB-Code 1 GSN (Becker *et al.*, 1998)) sowie Peroxynitrit (ONOO⁻) (PDB-Code 1 K4Q (Savvides *et al.*, 2002)). Dadurch konnten die Effekte verschiedener funktioneller Gruppen der Inhibitoren auf wichtige Aminosäurereste veranschaulicht werden (Nitrierung von Tyrosinresten, Carbamoylierung oder Glutathionylierung von Cysteinresten, Oxidation von reduzierten Cysteinresten). Die Inhibitoren der GR werden ihren Zielstrukturen am dimeren Enzym entsprechend in verschiedene Gruppen eingeteilt, in solche, die die Thiole in der *active site*

modifizieren, solche, die die GSSG-Bindungsstelle blockieren und solche, die in der *interface-cavity* binden (Schirmer *et al.*, 2002).

Interessanterweise führte die Behandlung der hGR mit S-Nitrosoglutathion nicht zur Nitrosylierung eines der beiden Cysteine in der *active site*, sondern Cys63-SH wurde zur Sulfensäure oxidiert und Cys58-SH reagierte mit dem Glutathionrest zum gemischten Disulfid (Abb. 1.8). Anhand dieser Strukturuntersuchungen konnten wichtige Kenntnisse über die Modifikation von Proteinen durch NO-Carrier *in vitro* gewonnen werden, die über oxidative Reaktionen an Proteinthiolen physiologisch relevant sein können. Der nitrosative Stress kann somit in Analogie zum oxidativen Stress über die irreversible Inaktivierung Glutathion-abhängiger Enzyme die antikanzerogenen, antibakteriellen oder antiparasitären Aktivitäten von Makrophagen oder apoptotischen Zellen fördern (Becker *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 1998).

1.3 Enzymhemmung

Die Enzymhemmung stellt im Gegensatz zur relativ unspezifischen Hemmung der DNA eine Möglichkeit dar, gezielt in Mechanismen und Stoffwechselwege einzugreifen, um den Verlust gesunder Zellen möglichst gering zu halten.

Inhibitoren setzen die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion herab. Dies kann auf verschiedene Weise mit oder ohne die Beeinflussung der Substratbindung erfolgen, demzufolge die Inhibitoren in reversible (kompetitive, nicht-kompetitive, unkompetitive) und irreversible Inhibitoren eingeteilt werden. Sie binden spezifisch an definierte katalytische oder regulatorische Zentren der Enzyme. Eine irreversible Hemmung kommt entweder durch kovalente Bindungen zwischen funktionellen Gruppen oder aber durch extrem starke nicht-kovalente Komplexbindungen zustande. Unter physiologischen Bedingungen sind durchaus auch Mischformen von Inhibitoreigenschaften, zusammengefasst als *mixed-type inhibition*, möglich. Die Art oder Typisierung der Hemmung kann man anhand kinetischer Messungen analysieren, die eine grafische Darstellung und die Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten ermöglichen. Kennt man den Hemmmechanismus, lassen sich wichtige Aussagen für die Wirkstoffebene und einen möglichen Verbesserungsansatz treffen. In der Tumorforschung ist man bestrebt, möglichst effektiv Enzymmoleküle in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Dies geschieht häufig über die irreversible Blockade der Enzyme, die zeitabhängig gebildet wird und durch eine exponentielle Abnahme der Enzymaktivität gekennzeichnet ist.

1.3.1 Inhibitoren

Für die TrxR bekannte Inhibitoren sind bereits vorgestellt worden. Hierbei handelt es sich meist um mehr oder weniger komplexe chemische Verbindungen, die verschiedene Reaktivitäten aufweisen. In diesem abschließenden Kapitel sollen einige wichtige Molekülstrukturen und deren reaktive Zentren vorgestellt werden.

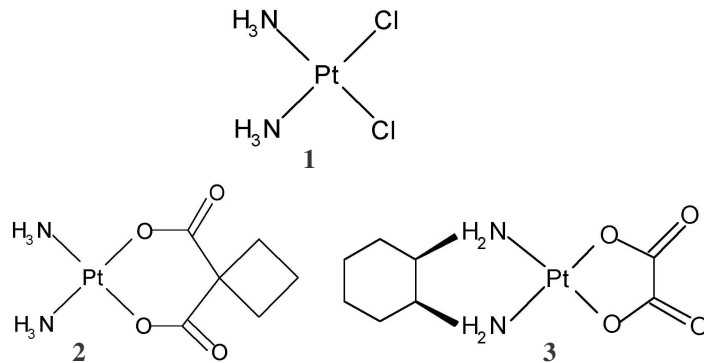


Abb. 1.11: Die drei bekanntesten und gut untersuchten Platin(II) Verbindungen Cisplatin (*cis*-DDP) (1), Carboplatin (2) und Oxaliplatin (3).

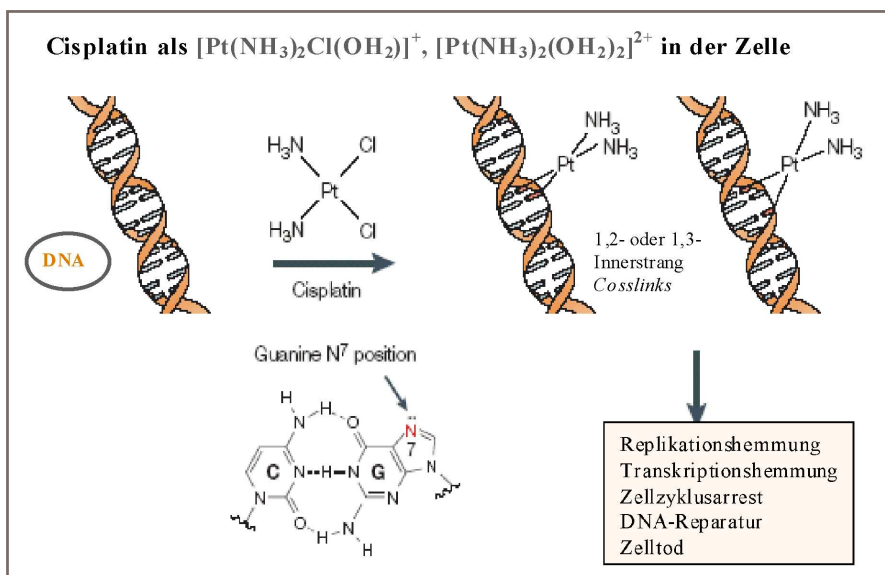


Abb. 1.12: Bildung und Effekte von Cisplatin-DNA-Addukten (Wang and Lippard, 2005).

Cisplatin hydratisiert in der Zelle unter Bildung von $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Die Wasseranlagerung wird durch die niedrige intrazelluläre Konzentration an Chloridionen erleichtert. Das Platinatom bindet kovalent an die N⁷-Position der Purine, um 1,2- oder 1,3-Pt-Crosslinks innerhalb des DNA-Einzelstranges oder des Doppelhelixstranges zu bilden.

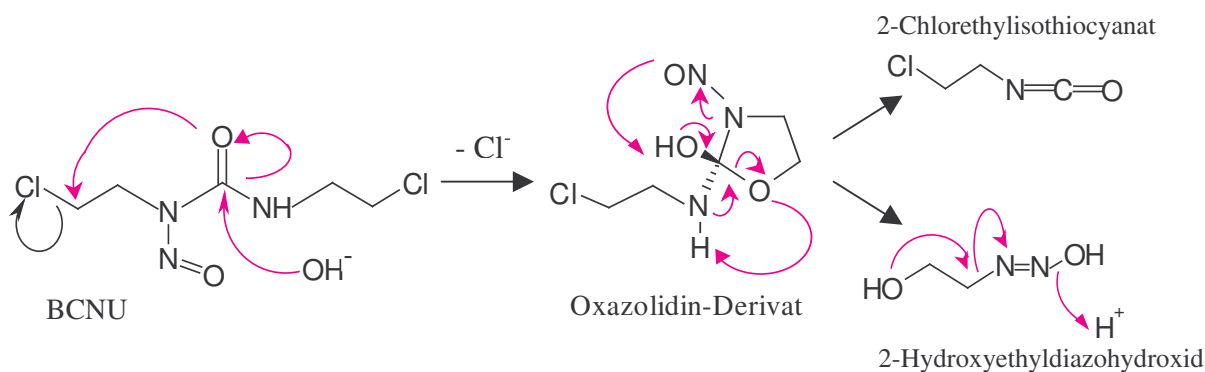


Abb. 1.13: Chemische Struktur von BCNU⁸ und seiner reaktiven Intermediate bei Reaktion mit Protein-Cystein (Karplus et al., 1988).

Die Carbamoylierung des Cys-Thiols des Enzyms durch 2-Chlorethylisothiocyanat erfolgt bevorzugt und findet z.B. am distalen Cys58 der hGR statt.

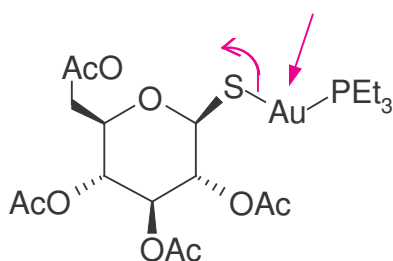


Abb. 1.14: Chemische Struktur von Auranofin⁹ mit seinem reaktiven Metallzentrum.

Bezüglich der Reaktivität von Auranofin wird angenommen, dass sowohl der Schwefel-Zuckerteil als auch der Triethylphosphinligand (PEt₃) Abgangsgruppen darstellen können, um nach vollständiger Reaktion ein Gold-Proteinthiol-Addukt zu ergeben (Abrams and Murrer, 1993).

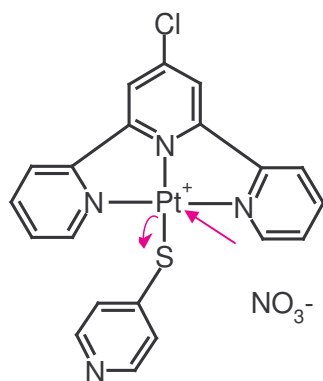


Abb. 1.15: Chemische Struktur von 4-Mercaptopyridin(4'-chlor-2,2':6',2''-terpyridin)platin (II)-Nitrat mit zentralem Pt-Atom.

(2,2':6',2''-Terpyridin)Platin(II)-Komplexe haben wie andere Platinverbindungen eine Präferenz für weiche Nukleophile wie z.B. Proteinthiole und zeigen eine ungewöhnliche Substitutionskinetik an der vierten Ligandenbindungsstelle am Metall aufgrund der starken π -Azidität ihres polyaromatischen Liganden (Ross et al., 2000). Die 4'-Halogengruppe am Terpyridinplatin-Liganden ist wichtig für die Aktivität und das Gegen-Ion (z.B. NO₃⁻) für die Löslichkeit des Inhibitor-Komplexes (Lowe et al., 1999).

⁸ 1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-Nitrosourea

⁹ [(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosato-S)triethylphosphingold(I)]; Ac = Acetyl-; PEt₃ = Triethylphosphin

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die humane Thioredoxinreduktase 1 in nativer und rekombinanter Form in ausreichender und reiner Menge für eine detaillierte biochemische Charakterisierung und für die Kristallisierung zur Verfügung zu stellen.

Im Rahmen verschiedener Inhibitorstudien sollten parallel dazu neue Substanzen auf ihre Eigenschaft als Hemmstoffe der TrxR und damit für einen potentiellen Einsatz in der redoxmodifizierenden Tumorbehandlung evaluiert werden. Dabei spielten neben umfangreichen kinetischen Untersuchungen am Enzym auch zellspezifische Untersuchungen sowie Untersuchungen auf DNA-Ebene eine Rolle. Aspekte der Induktion zellulärer Ereignisse wie Wachstumshemmung, Zellzyklusarrest oder Apoptose im Zusammenhang mit dem Krebsgeschehen standen im Mittelpunkt von *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten am Glioblastommodell¹⁰.

Des Weiteren war die Herstellung und Charakterisierung spezieller Mutanten der humanen Thioredoxinreduktase vorgesehen zur Überprüfung, ob durch eine Verkürzung des C-Terminus die Substratspezifität der TrxR1 in Richtung GR-Charakter erweitert werden und somit die evolutive Verwandtschaft beider Enzyme aufgezeigt werden kann. Mögliche Effekte der veränderten TrxR-Form sollten auch auf zellulärer Ebene eruiert werden.

Zusätzlich zur Kristallisierung der hTrxR1 wurde die Kristallisation von hGR-Inhibitorcomplexen angestrebt, um *target sites* der Inhibitoren und bindungsspezifische Modifikationen am Enzym zu identifizieren, die wichtige Informationen für die Inhibitorentwicklung im Rahmen der rationalen Medikamentenentwicklung darstellen.

Zur Verwirklichung oben genannter Ziele standen vielerlei moderne molekularbiologische, proteinbiochemische und zellbiologische Methoden zur Verfügung.

¹⁰ Ratten C6-Gliom als experimentelles Modellsystem für Glioblastoma multiforme und humane primäre Zelllinien verschiedener Patienten (NCH 37, 82 und 89).

Glioblastoma multiforme (GBM) ist einer der aggressivsten malignen primären Hirntumore bei Erwachsenen und wird dem Grad IV Astrocytoma zugeordnet. Er zeichnet sich durch ein äußerst schnelles Wachstum mit hoher Proliferationsrate, eine variable Morphologie seiner Zellen sowie durch ein hohes Migrationspotential in das Zentralnervensystem aus (Kleihues *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 1998).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Rohmaterial

Humane Glioblastomzellen	Neurochirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg
Plazenten	Entbindungsstation, Katholisches Krankenhaus Gießen
Rattengewebe	Neurochirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2- I: Bezeichnung der verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge.

Geräte, Verbrauchsgegenstände	Hersteller
ÄKTA-FPLC System (P-920; UPC-900; INV-907; M-925)	Amersham Biosciences, Freiburg
Amicon Ultrazentrifugationszelle 8200	Millipore, Eschborn
Anaerobe Arbeitsstation, THE MARK 3	Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, UK
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
BioPhotometer und UVetten	Eppendorf, Hamburg
Centricon YM-3, YM-10, YM-30, YM-50	Millipore, Eschborn
Centriprep YM-3, YM-10, YM-30, YM-50	Millipore, Eschborn
Deckgläschen, rund 21 mm Ø	Menzel, Braunschweig
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektrophoreseapp. <i>EasyCast</i> electroph. system	Owl Separation Sys., Portsmouth, USA.
Elektrophoreseapp. MiniProtean3 mit POWERPAC300	BioRad, München
FACS (Fluorescent Associated Cell Sorting) Gerät Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
FPLC-Säule HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	Amersham Biosciences, Freiburg
Fraktionssammler Frac-900	Amersham Biosciences, Freiburg
Gel-Dokumentationsanlage Gel Doc 2000	BioRad, München
Hamilton Mikroliterspritze 705N/50µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizblock neoBlock II	neoLab, Heidelberg
Inkubator Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Inkubator <i>Orbital shaker</i>	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Kristallplatten	ICN Biochemicals, Ohio, USA
Mikropipetten intramark (Kapillaren) 1-5 µl & 10 µl	Blaubrand, Wertheim
Mikroskop Axiostar	Zeiss, Jena
Mikroskop Axioskop 2Mot	Zeiss, Jena
Mikroskop Olympus BX 50	SIS Imaging Systems, Münster
<i>Microspin</i> TM G-25 Entsalzungssäulchen	Amersham Biociences, Uppsala, Schweden
Mörser	KPM, Berlin
Minischüttler MS2	Ika Werke, Staufen
Nanosep-Zentrifugensäulchen 3K, 10K	PALL, Dreieich
NAP-5 Entsalzungssäulen, Sephadex G-25	Amersham Biociences, Uppsala/Schweden u- Freiburg/GE
Nitrozellulosemembran PROTRAN	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger 12 well, 6 mm Ø	Renner, Dannstadt
Objektträger SuperFrost Color geschliffen	Menzel, Braunschweig
Parafilm 'M'	American National Can, Chicago, USA.
PCR-Gerät Mastercycler <i>gradient</i>	Eppendorf, Hamburg
PD-10 Entsalzungssäulen, , Sephadex G-25	Amersham Biociences, Uppsala, Schweden
Petrischalen 94x16 mm, steril	Greiner Cellstar, Frickenhausen
pH-Meter Modell Φ 350 pH/Temp/mV Meter	Beckmann, München
Fotokamera Modell Focus 4000	Intas, Göttingen
Pipetten Eppendorf Research (10, 20, 100, 200 und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Gilson Pipetman (P10, P20, P200 und P1000)	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen und Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen und Tubes für <i>Real Time</i> PCR	Corbett Research, Wasserburg
Quarzküvetten	Hellma, Mühlheim
Reinstwasseranlage OPTILAB-Plus	membraPure, Bodenheim
Rotorgene 3000 <i>real time DNA amplification</i>	Corbett Research, Wasserburg
Rührer RCTbasic	Ika Werke, Staufen
Skalpelli	Paragon, England

Tabelle 2- I, Fortsetzung.

Schüttler UNIMAX 2010	Heidolph Instruments, Schwabach
Stereomikroskop SM 21000	Nikon, Düsseldorf
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Sterilfilter 0.2 µm FP030	Schleicher & Schuell, Dassel
Synchrotron-Röntgenstrahlungsquelle	SLS, Villigen, Schweiz
Szintillationszähler TR 1400	Packard, Minnesota, USA
Ultraschallapp. (GM 2070; UW 2070; SH 706; MS 73)	Bandelin Electronic, Berlin
Ultrazentrifugationsröhrchen NALGENE	Nalge Nunc Int., Belgien
UV/VIS-Spectrophotometer Beckman DU 650	Beckman, München
UV/VIS-Spectrophotometer Hitachi U-2001	Hitachi, Schwäbisch Gmünd
UV/VIS-Spectrophotometer Shimadzu U-2100	Shimadzu, Duisburg
UV/VIS-Spectrophotometer Ultrospec 3000	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
UV/VIS-Spectrophotometer Varian Cary 3	Varian, Palo Alto, USA.
Waage Bosch PE626	Bosch + Sohn, Jungingen
Waage 474-32	Kern & Sohn, Balingen
Waage SBC 22 Präzisionswaage	Scaltec Instruments, Göttingen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wippe DUOMAX 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Zellkultur-Flaschen, glasklar, steril, 75 cm ²	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellzähler CASY1	Schärfe Systems, Reutlingen
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge miniSpin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Savant SpeedVac mit Gel Pump GP110	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Zentrifuge Sorvall RC5Plus (Rotor SS-34 und SLA-3000)	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Zentrifuge Optima TLX 120 Ultrac. (Rotor TLA 100.4)	Beckmann, München
Zentrifuge Sorvall RC-5B Ultrac. (Rotor 45 Ti)	Beckmann, München

2.1.3 Chemikalien, Lösungen, Proteine und Kits

2.1.3.1 Chemikalien, Fertiglösungen

Tabelle 2-II: Bezeichnungen der Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge.

Chemikalie	Hersteller	Chemikalie	Hersteller
ABTS	Sigma, Steinheim	Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe	Ethanol	Roth, Karlsruhe
ADP	Sigma, Steinheim	Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe	FAD	Sigma, Steinheim
AMS	Molecular Probes, Leiden/NL	D(+)-Glukose	Merck, Darmstadt
APS	Roth, Karlsruhe	Glycerin	Roth, Karlsruhe
Auranofin	ICN Biochem., Ohio, USA	GSH	Merck, Darmstadt
Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München	GSSG	Roche, Mannheim
Brilliant blue R250	Sigma, Steinheim	Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe	HCl	Roth, Karlsruhe
BSA-Lösung, 10 mg/ml	Promega, Mannheim	Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Butanol	Roth, Karlsruhe	HEPES	Sigma, Steinheim
CaCl ₂ •2H ₂ O	Roth, Karlsruhe	H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe	H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe
CDNB	Sigma, Steinheim	Imidazol	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe	Iodacetamid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe	I-AEDANS	Molecular Probes, Leiden/NL
Cystatin	Sigma, Steinheim	IPTG	Roth, Karlsruhe
DAPI	Boehringer, Mannheim	Kanamycin	Roth, Karlsruhe
DMEM	Life Technologies, Eggenstein	KCl	Roth, Karlsruhe
DMF	Roth, Karlsruhe	KOH	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe	Menadion	Sigma, Stockholm/Schweden
DNA-Marker 1kb Plus	Fermentas, St. Leon-Rot	Methanol	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot	Metmyoglobin	Serva, Heidelberg
DTE	Roth, Karlsruhe	2-Methyl-2,4-pentandiol	Merck, Hohenbrunn
DTNB	Roth, Karlsruhe	Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
DTT	Roche, Mannheim	Natriumcitrat•2H ₂ O	Sigma, Steinheim
EDTA•2Na•2H ₂ O	Roth, Karlsruhe	NaCl	Roth, Karlsruhe

Tabelle 2-II, Fortsetzung.

NAD(P)H	Biomol, Hamburg	Puffer O ⁺ 10x	Fermentas, St. Leon-Rot
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Roth, Karlsruhe	Puffer <i>Pfu</i> 10x	Promega, Mannheim
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Roth, Karlsruhe	Puffer R ⁺ 10x	Fermentas, St. Leon-Rot
NaOH Plätzchen	Roth, Karlsruhe	Puffer 6x für DNA	Fermentas, St. Leon-Rot
NBT/BCIP-Lsg.	Sigma, Steinheim	Puffer Y ⁺ /Tango 10x	Fermentas, St. Leon-Rot
NEM	Molecular Probes, Leiden/NL	RbCl	Roth, Karlsruhe
NH ₄ OH (NH ₃ + H ₂ O)	Roth, Karlsruhe	Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe
(NH ₄) ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe	Silikonöl 550	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Steinheim	Szintillator Rotiszent eco plus	Roth, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma, Steinheim	TEMED	Sigma, Steinheim
peqGOLD agarose	Peqlab, Erlangen	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	Fluka, Neu-Ulm
Phenol	Roth, Karlsruhe	Tris	Roth, Karlsruhe
PMSF	Roth, Karlsruhe	Triton X-100	Sigma, Steinheim
Polyethylenglycol 8000	Roth, Karlsruhe	Trolox®	Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma, Steinheim	Trypsin/EDTA	Viralex, Linz, Österreich
PPh ₃ AuCl	Fluka, Neu-Ulm	Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe	Tween 20	Roth, Karlsruhe
Proteinmarker	Fermentas, St. Leon-Rot	Vectashield M. Medium	AXXORA, Grünberg
Puffer B 10x	Promega, Mannheim	Wasserzusatz Aqua Stabil	Julabo, Seelbach
Puffer <i>Bam</i> HI 10x	Fermentas, St. Leon-Rot		

2.1.3.2 Puffer und Medien

Tabelle 2-III: Bezeichnungen der Pufferart in alphabetischer Reihenfolge.

Puffer, Medium	Zusammensetzung
Assaypuffer	
<i>Glutathionperoxidase-Puffer (GPx-Puffer)</i>	12.14 g/l TRIS (ad 100 mM), 0.372 g/l EDTA (ad 500 µM), mit 1 M HCl _{aq} bei Raumtemperatur auf pH 8.0 eingestellt.
<i>Glutathionreduktase-Puffer (GR-Puffer)</i>	2.79 g/l KH ₂ PO ₄ , 6.04 g/l K ₂ HPO ₄ · H ₂ O (ad 47 mM KP), 0.372 g/l EDTA (1 mM), 14.91 g/l KCl (ad 200 mM), mit 1 M KOH _{aq} bei Raumtemperatur auf pH 6.9 eingestellt.
<i>Stammpuffer zur Gesamtglutathionbestimmung</i>	19 g/l NaH ₂ PO ₄ (ad 143 mM), 2.34 g/l EDTA (ad 6 mM), mit NaOH bei 4°C auf pH 7.5 eingestellt.
<i>Täglicher Puffer zur Gesamtglutathionbestimmung</i>	0.3 mg/ml NADPH (ad 0.3 mM) in Stammpuffer
<i>Glutathion S-Transferase-Puffer (GST-Puffer)</i>	11.5 g/l KH ₂ PO ₄ , 3.54 g/l K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O (ad 100 mM KP), 0.372 g/l EDTA (1 mM), mit KOH _{aq} bei Raumtemperatur auf pH 6.5 eingestellt.
<i>Thioredoxinreduktase-Puffer (TrxR-Puffer)</i>	6.45 g/l KH ₂ PO ₄ , 12 g/l K ₂ HPO ₄ · H ₂ O (ad 100 mM KP), 0.744 g/l EDTA (ad 2 mM), mit 1 M KOH _{aq} bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt.
Elektrophoresepuffer	
<i>SDS-PAGE-Kammerpuffer</i>	14.42 g/l Glycin (ad 192 mM), 3.03 g/l TRIS (ad 25 mM), 1 g/l Natriumdodecylsulfat (ad 1%, w/v), mit 1 M HCl _{aq} bei Raumtemperatur auf pH 8.3 eingestellt.
<i>SDS-PAGE-Probenpuffer (= Auftragspuffer für SDS-Gele)</i>	1 g/l Natriumdodecylsulfat (ad 1%, w/v), 1.2 g/l TRIS (ad 10 mM), 100 g/l Glycerin (ad 10%, w/v), 20 mg/l Bromphenolblau (ad 0.002%, w/v), 0.772 g/l DTE (ad 5 mM), mit 1 M HCl _{aq} bei Raumtemperatur auf pH 8.2 eingestellt.
<i>SDS-PAGE-Sammelgepuffer</i>	0.5 M Tris, pH 6.8
<i>SDS-PAGE-Trenngepuffer</i>	1.5 M Tris, pH 8.8
<i>5 × TBE</i>	54 g Tris-Base (ad 0.446 M), 27.5 g Borsäure (ad 61.83 M), 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), mit <i>aqua dest.</i> auf 1000 ml auffüllen.
Färbelösungen	
<i>Coomassie Entfärbelösung</i>	75 ml/l Essigsäure (ad 7.5%, v/v), 50 ml/l Methanol (5%, v/v).
<i>Coomassie Färbelösung</i>	2.5 g/l Coomassie Brilliantblau (ad 0.25%, w/v), 92 ml/l Essigsäure (ad 9.2%, v/v), 50 ml/l Methanol (ad 5%, v/v).

Puffer zur Plasmidisolierung	
<i>P1-Puffer</i>	6,06 mg/ml Tris-Base, 3,72 mg/ml EDTA x 2 H ₂ O, 0,1 mg/ml RNase A.
<i>P2-Puffer</i>	4 M NaOH, 1% SDS (w/v)
<i>P3-Puffer</i>	7 M K-Acetat, mit Eisessig auf pH 5.5 eingestellt.
andere Puffer	
<i>TE-Puffer</i>	6,057 g/l TRIS (ad 50 mM), 0,372 g/l EDTA (ad 1 mM), mit 2 M HCl auf pH 7.6 titriert.
<i>Zellaufschlusspuffer / Ultraschallpuffer</i>	17,53 g/l NaCl (ad 300 mM), 7,657 g/l, Na ₂ HPO ₄ , 0,963 g/l NaH ₂ PO ₄ (ad 50 mM NaP), mit 1 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt.
<i>PBS</i>	1,851 g/l Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O (ad 10,4 mM), 0,430 g/l K ₂ HPO ₄ (ad 3,16 mM), 7,013 g/l NaCl (ad 120 mM), mit 100 mM NaOH _{aq} bei Raumtemperatur auf pH 7.4 eingestellt; ggf. Zugabe von 1 mM MgCl ₂ und 1 mM CaCl ₂ .
Zellkulturmedien und sonstiges	
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	<u>Anorganische Salze, Pulverform (mg/l):</u> CaCl ₂ (Anhyd.) 200; Fe(NO ₃) 9H ₂ O 0.10; KCl 400; MgSO ₄ (Anhyd.) 97.67; NaCl 6400; NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 125; <u>Andere Komponenten, Pulverform (mg/l):</u> D-Glucose 4500; Phenol Red 15.0; Natrium Pyruvat 110; <u>Aminosäuren, Pulverform (mg/l):</u> L-Arginin HCl 84.0; L-Cystin 2HCl 63.0; L-Glutamin 584; Glycin 30.0; L-Histidin HCl H ₂ O 42.0; L-Isoleucin 105; L-Leucin 105; L-Lysin HCl 146; L-Methionin 30.0; L-Phenylalanin 66.0; L-Serin 42.0; L-Threonin 95.0; L-Tryptophan 16.0; L-Tyrosin 2Na 2H ₂ O 104.3; L-Valin 94.0; <u>Vitamine, Pulverform (mg/l):</u> D-Ca Pantothensäure 4.00; Cholinchlorid 4.00; Folsäure 4.00; i-Inositol 7.20; Niacinamid 4.00; Riboflavin 0.40; Thiamin HCl 4.00.
Bakterienkulturmedium flüssig (fest), <i>Luria Bertani</i> (LB)	Für 1 l Medium: 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 10 g Typton (für Agarplatten + 15 g Agar)
4%-ige Paraformaldehydlösung (PFA)	8 g PFA in 100 ml H ₂ O _{dd} lösen, bei 60°C im Wasserbad stehen lassen, anschließend abkühlen, 100 ml 2 x PBS dazugeben (Lösung wird klar).

2.1.3.3 Kits für Proteinbiochemie, Molekular- und Zellbiologie

Tabelle 2-IV: Bezeichnungen der Kits in alphabetischer Reihenfolge.

Kitbezeichnung	Hersteller
AnnexinV-CY3 Apoptosis Detection Kit	Sigma, Steinheim
BrdU Labeling and Detection Kit III	Roche Diagnostics, Mannheim
Crystal Screen I & II	Hampton Research, Laguna Hills, U.S.A.
HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kits	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>In situ</i> Cell Death Detection Kit, AP	Roche, Mannheim
QIAprep Mini Spin prep Kit	Qiagen, Hilden
QIA PCR Cloning Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR, Gel Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Quick Ligation Kit (enthält rekombinante T4 DNA Ligase)	New England Biolabs, Frankfurt
Silver Stain Kit	Merck, Darmstadt

2.1.3.4 Proteine und Peptide

Tabelle 2-V: Protein- und Peptidbezeichnungen in alphabetischer Reihenfolge.

<i>Bam</i> HI	(5'...G↓GATCC...3')	Fermentas, St. Leon-Rot
BSA		Sigma, Steinheim
DNaseI		Roche, Mannheim
<i>Dp</i> I	(5'...G ^{met} A↓TC...3')	Promega, Mannheim
<i>Eco</i> RI	(5'...G↓AATTC...3')	Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 2-V, Fortsetzung.

<i>hGR</i>		AG Becker-Brandenburg
<i>HindIII</i>	(5'...A↓AGCTT...3')	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>hTrx</i>		AG Becker-Brandenburg
Insulin		Roche, Mannheim
Lysozym		Sigma, Steinheim
M-MuLV RT-Polymerase		Finnzymes, Heidelberg
<i>NdeI</i>	(5'...CA↓TATG...3')	Fermentas, St. Leon-Rot
PfGR		AG Becker-Brandenburg
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase		Promega, Mannheim
Proteinase K		Roth, Karlsruhe
RNase A		Roth, Karlsruhe
Schweinetrypsin, modifiziert, <i>Seq. grade</i>		Promega, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase		Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4 Säulenmaterialien

Tabelle 2-VI: Bezeichnung des Materials in alphabetischer Reihenfolge.

Bezeichnung	Quelle
2',5'-ADP-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DEAE-52-Zellulose	Whatman International, Maidstone (UK)
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Sephadex G-25	Amersham Biosciences, Freiburg
Superdex G-200	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.5 Plasmide und Primer

2.1.5.1 Plasmide

Tabelle 2-VII: Bezeichnung, Quelle und Verwendungszweck der Plasmide.

Bezeichnung	Quelle	Verwendungszweck
pDrive Cloning Vector	Qiagen, Hilden	Klonierung
pET28a(+), pET3d	Novagen, Bad Soden	Überexpression (T7-Promotor) in <i>E. coli</i>
pQE-30	Qiagen, Hilden	Überexpression (T5-Promotor) in <i>E. coli</i>

2.1.5.2 Primer für Klonierungen, Sequenzierungen und Mutagenesen

Tabelle 2-VIII: Bezeichnung, Sequenz und Restriktionsstelle bei Klonierungsprimern (MWG-Biotech, Ebersberg). Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Bezeichnung	Primersequenz 5' → 3'	Verwendung
<i>hTrxR5</i> BamHI	TTGGATCCAACGGCCCTGAAGATCTTC (<i>Bam</i> HI)	Klonierung
5' <i>hTrxRNdeI</i> pETneu	AGCTAGCCATATGAACGGCCCTGAAGATC (<i>Nde</i> I)	
<i>hTrxR3</i> Hind3	TTAAGCTTTTAACCACAGCAGCCAGCCTGG (<i>Hind</i> III)	
p(dT) ₁₅	P-TTTTTTTTTTTTTTTT (phosphoryliert)	cDNA-Synthese
<i>hTrxR5</i> BamHI	TTGGATCCAACGGCCCTGAAGATCTTC (<i>Bam</i> HI)	Mutagenese
<i>hTrxR3</i> -8HindIII	CGAAGCTTAGCTTGCCCCAGAGCGCTT (<i>Hind</i> III)	
<i>hTrxR3</i> -16HindIII	CGAAGCTTAAGACAATGTTGTGAATACCTC (<i>Hind</i> III)	
<i>hTrxRmutKR5</i> ''sense	GGTCTGGCAGCTGCTAGGGAGGCAGCC	Site-directed Mutagenese
<i>hTrxRmutKR3</i> ''asense	GGCTGCCTCCCTAGCAGCTGCCAGACC	
<i>hTrxRmutHY5</i> ''sense	GCTGTACAGAATTACATTGGCTCTTTG	
<i>hTrxRmutHY3</i> ''asense	CAAAGAGCCAATGTAATTCTGTACAGC	
<i>hTrxRmutVE5</i> ''sense	GTCTGTGCAGAGGAATTCACAACATTG	
<i>hTrxRmutVE3</i> ''asense	CAATGTTGTGAATTGCTCTGCACAGAC	
2. <i>hTrxR</i>	TGGAAAGTCGAGGAGACA	
3. <i>hTrxR</i>	GGTATTGGTTTAGGCGTCAC	
4. <i>hTrxR</i>	GATAAGGTGGAGCTCACCC	
5. <i>hTrxR</i>	TCAGAGTAGTAGCTCAGTCC	

2.1.5.3 Primer für Real Time-PCR

Tabelle 2-IX: Liste der verwendeten Primer für die Real Time-PCR. Die Primer wurden, soweit nicht anders vermerkt (RTPrimerDB ID-Datenbank (medgen.ugent.be/rtpriimerdb/)), selbst gestaltet. Die für die Primer angegebenen Positionen beziehen sich auf die Datenbankeinträge. Die Genbank-Einträge bezeichnen die Zugriffsnummern zu den Datenbankeinträgen (accession number) der *humanen* Sequenzen (gemäß HUGO) in der Gen-Datenbank „Nucleotide“ des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Zielsequenz	Genbank	Name	Position	Primersequenz 5' → 3'
ARPC3 (actin related protein 3)	NM_005719	OhARP3s OhARP3as	435 599	GCAATTTATGCCAAACCTGCA ATGAACTGTCTCTTCACAAAGC
BAX (BCL2-assoziiertes X Protein)	NM_004324	OhBaxs OhBaxas	459 661	GGAAGTATCAGAACCCATCATG ACTGTGACCTGCTCCAGAAG
BCL2 (B-cell CLL/Lymphoma 2)	NM_000633	Bcl2 2 s Bcl2 2 as RT-DB ID: 582	1653 1765	TCCGCATCAGGAAGGCTAGA AGGACCAGGCCTCCAAGCT
CCNB1 (Cyclin B1)	BC_006510	OhCCNB1s2 OhCCNB1as2 RT-DB ID: 598	70 160	AGCTGCTGCCTGGTGAAGAG GCCATGTTGATCTTCGCCTTA
CCNE1 (Cyclin E1)	NM_001238	CyclinEs3 CyclinEas3 RT-DB ID: 1665		CCACACCTGACAAAGAAGATGATGAC GAGCCTCTGGATGGTGCAATAAT
CDKN1A (Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1A)	NC_000006	Ocdks Ocdkas	5726 5837	GACCTGTCCTGTCTTGTACCCTT GTAGAAATCTGTCATGCTGGTCTG
CLU (Clusterin)	NM_001831	Ohclus Ohclusas	1176 1323	CTCCAGGTCGCTGAGAGGTT CTTCGCCTTGCCTGAGGT
FAS (TNF receptor superfamily, member 6)	NM_000043	Fass3 Fasas3 RT-DB ID: 2715	1234 1413	AGCTTGGTCTAGAGTGAAAA GAGGCAGAATCATGAGATAT
GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha)	NM_001924	OhGADD45As OhGADD45Aas	389 560	AGTCAGCGCACGATCACTGT TGTTGATGTCGTTCTCGCAG
GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)		Ogaps Ogapas	317 438	GTGGTCTCCTCTGACTTCAACA CTGTAGCCAAATTCGTTGTCATAC
GPX1 (Glutathionperoxidase)	NM_000581	hOgpxs hOgpxas	392 557	GTTCGAGCCCCAAGTTCATGCT ATCGTTGCGACACACCCGGAG
GSPT1 (G1-S Phase Übergang Protein 1)	NC_000016	Ogspas Ogspas	29098 30246	AAAGACAGCAGGTGTAACACACC AGCAGGGCATAAAGTGAATGTCC
GSR (Glutathionreduktase)	X15722	OhGRs OhGRas	1297 1443	AGACCTATTCAACGAGCTTTACC CCTGCAGCATTTCATCACACC
NDRG1 (N-myc downstream regulated gene 1)	NM_006096	OhNDRG1s OhNDRG1as	850 1008	TGGAGATTGAGCGACCAATG CACAGTCCGCCATCTTGAG
18S rRNA (ribosomale RNA)	M10098	Oh18Ss Oh18Sas	1678 1828	GTAACCCGTTGAACCCCATTC CCATCCAATCGGTAGTAGCG
RUNX1 (runt-related Transkriptionsfaktor 1)	NM_001001890	Ohrunx1s Ohrunx1as	1980 2124	CAGGTTTGTGCGGTGCAAGTGG TTTCTGCCGATGTCTTCGAGG
SEPHS2(Selenophosphat-Synthetase 2)	NC_000016	Ospss Ospas	831 995	CCTTGGATTATAATCGGTGGAGTTG TATCCATCTTCAGGATTATCCAGC
STMN1 (Stathmin 1/Oncoprotein 18, transcript variant 3)	NM_005563	OhSTMN1s OhSTMN1as	236 391	TGAGCTGATTCTCAGCCCTC GTGCTCTCGTTTCTCAGCCA
TXN (Thioredoxin 1)	NM_003329	OhTrxs OhTrxas	240 373	GGATGACTGTCAGGATGTTGC ATTCATTAATGGTGGCTTCAAGC
TXNDC5 (Thioredoxin domain containing 5)	NM_030810	OhTxn5s OhTxn5as	1027 1200	TCGATGACACCATTCAGAAAG TGCTGCAGATATTCCGTTTCAG
TRXRND1 (Thioredoxinreduktase 1)	NM_003330	OhTrxRs OhTrxRas	1021 1172	TGCCACTGGTGAAAGACCAC CAAGAAATCCAGCGCACTCC

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden etablierten Protokollen bzw. den Herstellerangaben der Enzyme und Kits entsprechend durchgeführt.

2.2.1.1 Klonierungen

Die Klonierung der Cysteinmutante der humanen Thioredoxinreduktase (hTrxR^{U498C}, *Selenocystein (U) ist durch Cystein (C) ersetzt*) aus einer humanen cDNA-Bank wurde von Verena Hofmann im Rahmen ihrer Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ernährung, AG Becker-Brandenburg, der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die beiden Konstrukte hTrxR^{U498C}/pDrive sowie hTrxR^{U498C}/pQE30 standen als Ausgangsbasis für Umklonierungen und weitere Mutagenesen im Rahmen der vorliegenden Dissertation zur Verfügung.

Zur Umklonierung in den Überexpressionsvektor pET28a(+) (Tabelle 2-VII) wurde das hTrxR^{U498C}-Gen in pDrive mittels PCR mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert und das Amplifikat mittels Gelextraktion (QIAquick Gel Extraction Kit) aufgereinigt. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme wurden über die Primer (Tabelle 2-VIII) eingefügt. PCR-Produkt und Vektor wurden mit *NdeI* und *HindIII* den Empfehlungen des Enzymherstellers entsprechend verdaut, erneut gereinigt und mit Hilfe des Quick Ligation Kits ligiert. Das Ligationsprodukt wurde mittels der Hitzeschock-Methode in XL1-Blue kompetente *E. coli* Zellen (*endA1 hsdR17(r_{K12}⁻m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15:Tn10(Tc^R)]*) transformiert und auf Kanamycin-enthaltende LB-Agarplatten ausplattiert. Positive Klone mit korrektem Insert hTrxR^{U498C} in pET28a(+) wurden nach erfolgter Übernachtskultur und Plasmidisolierung (Minipräparation) mittels Kontrollrestriktion und Agarosegelelektrophorese identifiziert und sequenziert.

Eine weitere Möglichkeit der Umklonierung beinhaltet eine Zwischenklonierung in den T-Überhangsvektor pDrive (sog. AU-Klonierung). Hierbei werden dem hergestellten PCR-Produkt mittels Polymerase Adeninreste angefügt (Qiagen A-Addition Kit, 30 minütige Inkubation bei 37°C), um es in der anschließenden Ligation mit dem Vektor zu verknüpfen und das Ligationsprodukt zu transformieren, zu vermehren und mittels Plasmidpräparation zu isolieren und zu analysieren. Das fertige Konstrukt kann dann für eine *sticky end*-Klonierung in den pET-Vektor verwendet werden. Die beiden letztgenannten Methoden kamen im Rahmen der Masterarbeit von Johanna Lieske zur Anwendung und dienten zur Herstellung weiterer hTrxR-Mutanten (siehe Abschnitt 2.2.1.2) als Expressionskonstrukt in pET28a(+).

2.2.1.2 Mutagenesen (Deletionen, AS-Austausche)

Zur Herstellung der verkürzten Formen der Thioredoxinreduktase wurde der C-terminale Sequenzbereich der hTrxR^{U498C} um 24 bp (hTrxR - 8 Aminosäuren, hTrxRΔ8) bzw. um 48 bp (hTrxR - 16 Aminosäuren, hTrxRΔ16) deletiert. Die Deletionen wurden durch entsprechend bindende 3'-Primer mit *HindIII*-Schnittstellen (Tabelle 2-VIII) mittels PCR mit *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Das Konstrukt hTrxR^{U498C}/pDrive diente als *template* in der PCR. Nach der Aufreinigung des PCR-Produkts mittels des QIAquick PCR Purification Kits wurden PCR-Produkt und Vektor pQE30 (Tabelle 2-VII) mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* verdaut und erneut gereinigt. Nach der Ligation (Quick Ligation) erfolgte

die Transformation in XL1-Blue kompetente *E. coli* Zellen und das Anwachsen der Klone auf Ampicillin-LB-Platten. Die Klone wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben auf das Vorhandensein des korrekten Konstruktes überprüft und anschließend durchsequenziert.

Zusätzlich zu den Deletionen wurden innerhalb der verkürzten hTrxR-Mutante hTrxRΔ16 weitere Punktmutationen mittels zielgerichteter Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) eingeführt. Dies geschah im Rahmen der Masterarbeit von Johanna Lieske. Das mittels PCR mit den Mutagenese-Primern (Tabelle 2-VIII) amplifizierte Produkt wurde aufgereinigt und die methylierten nichtmutierten Matrizenplasmide mit *DpnI* verdaut und wieder gereinigt. Nach Re-Ligation des mutierten Plasmids pQE30 erfolgten die Schritte Transformation, Selektion, Identifizierung und Sequenzierung gemäß der in Abschnitt 2.2.1.1 beschriebenen Klonierung.

Um eine höhere Ausbeute bei der Proteinexpression zu erreichen, wurde das hTrxRΔ16-Gen aus dem Vektor pQE30 mit T5-Promotor in den Vektor pET28a(+) mit T7-Promotor umkloniert (Abschnitt 2.2.1.1).

Insgesamt wurden folgende Konstrukte von TrxR-Mutanten hergestellt:

hTrxRΔ8/pQE30, hTrxRΔ16/pQE30, hTrxRΔ16^{K29R}/pQE30, hTrxRΔ16^{K29R,H108Y}/pQE30, hTrxRΔ16^{K29R,H108Y,A119N,V478E}/pQE30, hTrxRΔ16/pET28a(+), hTrxRΔ16^{K29R}/pET28a(+), hTrxRΔ16^{K29R,H108Y}/pET28a(+), hTrxRΔ16^{K29R,H108Y,A119N,V478E}/pET28a(+).

2.2.1.3 Real Time-PCR

Als weitere molekularbiologische Methode im Rahmen eines Teilprojektes der vorliegenden Arbeit kam die *Real Time*-PCR (Heid *et al.*, 1996; Higuchi *et al.*, 1993) zur Anwendung. Bei dieser Methode kann die Nukleinsäure-Produktbildungskurve in Echtzeit verfolgt und innerhalb der exponentiellen Phase deren Ausgangsmenge quantifiziert werden. Die Produktzunahme wird durch Messung der produktabhängigen Fluoreszenz erfasst. Als Fluoreszenzfarbstoff für dsDNA wurde SYBR Green I innerhalb des QuantiTect SYBR Green PCR Kits (Tabelle 2-IV) verwendet. Die in den PCR-Versuchen eingesetzte humane cDNA wurde mittels M-MuLV Reverser Transkriptase und dT15 Primer aus humaner Gesamt-RNA (isoliert aus humanen Glioblastomzellen) nach dem Herstellerprotokoll synthetisiert. Zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen und Überprüfung der Annealingeigenschaften der Primer wurde eine Standard-PCR vor dem jeweiligen *Real Time*-PCR-Lauf durchgeführt und die Produktbildung mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die 20 µl-Pipettieransätze der zu untersuchenden verdünnten und unverdünnten Proben wurden nach einem selbst erstellten Pipettierplan durchgeführt, der eine probenindividuelle cDNA Verdünnungsreihe sowie eine Vierfachmessung der jeweiligen Probe vorsah. Die *Real Time*-PCR erfolgte in der Rotorgene PCR-Maschine anhand eines den Erfordernissen der jeweiligen Gene entsprechend programmierten Amplifikations- und Analyseprofils. So konnten am Ende die Schmelzpunkte der PCR-Produkte, die Amplifikationseffizienz und der Fluoreszenzsignal-Schwellenwert der exponentiellen Amplifikation (C_t -Wert) bestimmt werden. Verglichen wurden diese Werte zwischen den auf ein Referenzgen normalisierten behandelten und unbehandelten Proben, um den relativen Expressionsunterschied (*Ratio*) zu erhalten. Als Referenzgene dienten die *housekeeping*-Gene für 18S rRNA und GAPDH.

2.2.2 Expression, Reinigung und Charakterisierung rekombinanter Proteine

2.2.2.1 Expression und Proteinreinigung

Neben der Herstellung der bereits beschriebenen rekombinanten Proteine hGR (Nordhoff *et al.*, 1993) und PfGR (Farber *et al.*, 1998) wurden die hTrxR-Mutantengene sowie zwei Mutantengene der murinen TrxR (rTrxR Δ 16, rTrxR Δ 16^{I478E}) im entsprechenden Expressionssystem unter den in der folgenden Tabelle beschriebenen Bedingungen exprimiert.

Kompetente *E. coli* Zellen wurden kurz vor der Expression frisch transformiert und auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Von jeweils einem Klon wurde eine Tages- und Übernachtskultur (3 und 200 ml) mit antibiotikahaltigem LB-Medium bei 37°C angeimpft. Am nächsten Tag wurde mit der Übernachtskultur 1 l LB-Medium angeimpft und die Bakterienkultur bis zu einer OD_{600nm} ~ 0.8 bei 37°C wachsen gelassen. Dann wurde die Expression durch Zugabe von 0.4-1.0 mM IPTG induziert und die Kulturen auf die gewünschte Expressionstemperatur eingestellt.

Tabelle 2-X: Expressionsbedingungen in *E. coli*.

Plasmid	<i>E. coli</i> Stamm	Antibiotika ^a	Temp [°C]	IPTG [mM]	Dauer [h]
hTrxR Δ 16/pQE30	M15[pREP4] ^b	50 mg/l K, 100 mg/l C	37	1.0	4
hTrxR Δ 16/pET28a(+)	BL21[Rosetta] ^c	50 mg/l K, 35 mg/l Ch	37	0.2	4
hTrxR Δ 16 ^{K29R} /pET28a(+)	BL21[Rosetta]	50 mg/l K, 35 mg/l Ch	30	0.2	4
hTrxR Δ 16 ^{K29R,H108Y} /pET28a(+)	BL21[Rosetta]	50 mg/l K, 35 mg/l Ch	30	0.2	4
hTrxR Δ 16 ^{K29R,H108Y,A119N,V478E} /pET28a(+)	BL21[Rosetta]	50 mg/l K, 35 mg/l Ch	30	0.2	4
hTrxR Δ 8/pQE30	M15[pREP4]	50 mg/l K, 100 mg/l C	37	1.0	4
hTrxR ^{U498C} /pQE30	M15[pREP4]	50 mg/l K, 100 mg/l C	37	1.0	4
hTrxR ^{U498C} /pET28a(+)	BL21[Rosetta]	50 mg/l K, 35 mg/l Ch	37	0.5	4
rTrxR Δ 16/pET3d	BL21(DE3) gor ^{-d}	12 mg/l Tet, 50 mg/l C	25	0.4	16
rTrxR Δ 16 ^{I478E} /pET3d	BL21(DE3) gor ⁻	12 mg/l Tet, 50 mg/l C	25	0.4	16

^a Abkürzungen der Antibiotika: K = Kanamycin; C = Carbenicillin; Ch = Chloramphenicol; Tet = Tetracyclin

^b M15[pREP4], *thi-1 lac F*[pREP]

^c BL21(DE3)pLysS, F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysS

^d gor⁻: Gen für Glutathionreduktase deletiert

Um den Verlauf der erstmaligen Expression mittels SDS-PAGE zu verfolgen, wurden Probenaliquots vor und stündlich nach Induktionsbeginn entnommen. Nach der erforderlichen Expressionszeit von 4-16 h wurden die Zellen für 15 min bei 6000 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet aus 1 l Kultur wurde mit 4 ml US-Puffer mit oder ohne 10 mM Imidazol pro Gramm Nassgewicht resuspendiert. Die Suspension wurde mit Lysozym (~ 1 mg/l), einer Spatelspitze DNase I sowie einem Proteaseinhibitorcocktail (150 nM Pepstatin, 40 nM Cystatin, 10 μ M PMSF) und ggf. mit 2% Triton X-100 versetzt und 30 min bei 4°C gerührt. Unter Verwendung von 5 \times 30 s Ultraschallstößen (Sonifier Stufe 1, 70% *duty cycle*, mit intermediären Pausen) wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Das Zellysate wurde für 30 min bei 17000 rpm (34300 g) und 4°C zentrifugiert und der klare Überstand langsam auf eine mit US-Puffer äquilibrierte Säule mit Ni-NTA-Agarose aufgetragen.

Das Säulenvolumen wurde der zu erwartenden Proteinausbeute angepasst (Kapazität ~ 10 mg Protein pro ml Ni-NTA-Agarose bei einem Molekulargewicht von 20 kDa). Nach der Auftragung des Zentrifugationsüberstandes wurde mit 4-8 SV US-Puffer/10 mM Imidazol gewaschen, bevor das Protein mittels eines Imidazolgradienten bis zu 500 mM Imidazol eluiert wurde. Die qualitative Analyse der einzelnen Proteinfractionen erfolgte mittels nichtreduzierender SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blue-Färbung oder Silber-

färbung der Proben. Die reinsten Fraktionen wurden vereinigt und durch wiederholtes Einengen und Waschen im Centriprep30 oder durch Dialyse umgepuffert und standen für kinetische und weitere Charakterisierungen sowie für Kristallisationsversuche zur Verfügung. Da es sich bei den murinen TrxRs nicht um *His-tag*-Proteine handelte, wurden diese mittels 2',5'-ADP-Sepharose-Affinitätschromatographie (siehe auch 2.2.4.4) in einem *single chromatographic step*-Verfahren aufgereinigt. Nach dem langsamen Auftrag auf die mit TE-Puffer äquilibrierte Säule wurde intensiv mit TE-Puffer gewaschen (bis die Waschfraktionen keinen Proteingehalt bei 280 nm mehr zeigten). Anschließend wurde das Protein in einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl in TE-Puffer eluiert und mittels eines Fraktionssammlers fraktioniert.

2.2.2.2. Kinetische Untersuchungen

Die kinetischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, beziehen sich fast ausschließlich auf den *steady-state*-Bereich der enzymatisch katalysierten Reaktion. Hierbei kamen die für die Thiothioninreduktase bekannten Reduktionsreaktionen mit dem physiologischen Substrat Thiothionin sowie dem artifiziellen Substrat DTNB, als auch mit weiteren Substraten (Menadion (Vitamin K₃, 2-Methyl-1,4-Naphthochinon, GSSG, Dehydroascorbat, Selenenylid) in Frage (Abschnitt 2.2.3.2).

Die Michaelis-Menten Komponenten K_M und V_{max} sowie daraus abgeleitete Größen wie *turnover number* (katalytische Konstante, k_{cat}) oder spezifische Aktivität [U/mg Protein] konnten bestimmt werden. Im Rahmen der Inhibitor-Kinetiken wurden analog der Michaelis-Menten Kinetik die maximale Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung (k_{inact}), die Inhibitionskonstanten K_I^* (Inhibitor-Konzentration bei halbmaximaler Inaktivierung ($k_{inact}/2$)) und K_i sowie die Halbwertszeit der Inaktivierung, $t_{1/2}$ ($t_{1/2} = \ln 2/k_{inact}$) bestimmt. Dabei wurden nicht-lineare und lineare Regressionsanalysen angewendet, die in den Abschnitten 3.2-3.6 näher beschrieben werden. Weiterführende Untersuchungen außerhalb des *steady-state*-Bereiches sind ebenfalls diesen Abschnitten zu entnehmen.

2.2.2.3 Versuche zur Redoxpotentialbestimmung

Redox-titrations

Um die rekombinante Thiothioninreduktase (hTrxR^{U498C}, rTrxRΔ16) in verschiedenen Redoxzuständen zu titrieren, wurde vor dem jeweiligen Alkylierungsprotokoll (siehe folgenden Abschnitt) eine Äquilibrierung in verschiedenen NADP⁺/NADPH-Redoxpuffern mit definierten Redoxpotentialen durchgeführt. Die Redoxpotentiale der Puffer wurden mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnet ($\Delta E = E_0 + RT/nF \cdot \log [NADP^+]/[NADPH]$, wobei $E_0 = -320$ mV bei pH 7.0, $R \cdot T/n \cdot F = 29.5$ mit $n = 2$ für die Übertragung von 2 Elektronen). Die TrxR (6 µg) wurde in verschiedenen Ansätzen in TrxR-Puffer (Tabelle 2-III) bei pH 7.0 in Anwesenheit variabler NADPH/NADP⁺-Konzentrationen und Konzentrationsverhältnissen bei 25°C unter aeroben oder anaeroben Bedingungen für 1 h inkubiert. Zur Bestimmung des Anfangs- und Endpunktes der Titration (vollständig reduziertes bzw. oxidiertes Enzym) wurde ein Ansatz nur mit 100 µM DTT bzw. nur mit 100 µM DTNB inkubiert. Anschließend wurden die TrxR-Proben mit oder ohne vorherige Proteinpräzipitation (in kalter 1 N Aceton-Salzsäurelösung (98:2,v:v)) unter Zugabe von 1 mM Alkylator 30 min bei RT alkyliert. Die Proben wurden mittels nichtreduzierender SDS-PAGE aufgetrennt, deren Fluoreszenz mit UV-Licht detektiert und danach die Proteinbanden mit Coomassie Blue gefärbt.

Thiolspezifische Markierung mit Alkylatoren

Versuche zur Alkylierung der TrxR (Blockierung freier Thiole) wurden im Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-Verfahren durchgeführt und alkylierende Agenzien wie 1,5-I-AEDANS (5-[2-(Iodacetamid)ethylamino]naphthalen-1-sulfonsäure) und NEM (N-Ethylmaleimid) wurden hierfür verwendet. Bei der Alkylierung in einem Schritt wurden redoxäquilibrierte TrxR-Proben (6-16 µg) im Dunkeln mit 1 mM I-AEDANS für 30 min bei RT inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Bei der Alkylierung in zwei Schritten wurden die Proben zunächst mit 1.3 mM NEM für 30 min bei RT inkubiert, über eine Sephadex G-25 Säule entsalzt und dann mit 1 mM DTT versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde wieder entsalzt, mit 2 mM I-AEDANS für 30 min bei RT alkyliert und eine SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzanalyse durchgeführt.

2.2.2.4 Gelfiltrationsversuch mit markiertem Glutathion ($^3\text{H-GSSG}$)

Zur Herstellung von Tritium-markiertem oxidiertem Glutathion, $^3\text{H-GSSG}$ wurde käuflich erworbenes reduziertes Glutathion, $^3\text{H-GSH}$ (ad 24 µM, 41.5 Ci/nmol, in 10 mM DTT) mit 15 mM Wasserstoffperoxid über Nacht inkubiert. Die Aktivität der daraus entstandenen Stammlösung von 24 µM $^3\text{H-GSSG}$ wurde 1:4 mit einer Stammlösung aus unmarkiertem GSSG (31.4 mM) verdünnt, so dass am Ende eine Lösung von 10 mM $^3\text{H-GSSG}$ (250000 dpm/nmol) vorlag. Die Redoxenzyme TrxR (rTrxRΔ16) und GR (hGR Wildtyp) wurden zuvor mit einem Überschuss an NADPH bzw. NADP^+ unter anaeroben Bedingungen zur Reduktion bzw. Oxidation inkubiert. Nach Entsalzung über eine Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule wurden 250 µl des jeweiligen Proteineluates mit 5 µl 10 mM $^3\text{H-GSSG}$ (ad 200 µM $^3\text{H-GSSG}$) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Um den Diffusions- und Sedimentationseigenschaften entgegenzuwirken, wurden die Ansätze in regelmäßigen Abständen durchmischt. Nach der Inkubationszeit wurde eine Gelfiltration (NAP-5 oder PD-10 Sephadex G-25 Säule) zur Entfernung überschüssiger freier $^3\text{H-GSSG}$ -Moleküle durchgeführt. Von den Elutionsfraktionen (200 oder 500 µl) wurden 5 µl für die Bradford-Proteinbestimmung (Abschnitt 2.2.3.1) entnommen und das restliche Volumen mit 5 ml Szintillator versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler zweimal für je 1 min gezählt.

2.2.2.5 Titrations mit NADPH

Alle Titrations wurden in TrxR-Assaypuffer (Tabelle 2-III) durchgeführt. NADPH wurde in TrxR-Assaypuffer gelöst und seine Konzentration spektrophotometrisch vor der Titration bestimmt. Die verschiedenen TrxR-Varianten (15 µM) wurden unter aeroben Bedingungen mit 0, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 2, 3 und 6 Äquivalenten NADPH (0-90 µM) titriert und die Absorptionsspektren mit einem Beckman DU 650 UV/VIS-Spektrophotometer ermittelt.

2.2.3 Analytische Verfahren

2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Der Quick Start BioRad Bradford Assay basiert auf der pH-abhängigen Farbänderung von Brilliant Blue G-250 bei Reaktion mit Proteinen. Dabei bindet der Farbstoff in erster Linie an

basische und aromatische Aminosäurereste (Compton and Jones, 1985). Mit einer Albumin Standardlösung (Rinderserumalbumin, 2 mg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe (1-20 µg/ml) sowie von der zu bestimmenden Probe eine ungefähre Verdünnung innerhalb der Messreihe hergestellt. Die Standardproben, eine Leerprobe und die TrxR-Probe wurden mit der fertigen BioRad-Farbstofflösung versetzt und nach 15 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Von allen Ansätzen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Nach Abzug der Leerwertabsorption wurde der Probenwert in die Geradengleichung der Eichkurve eingesetzt.

Andere Proteinbestimmungen

Eine einfache Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen ist die Messung der Absorption bei 280 nm, die im Wesentlichen vom Gehalt an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, aber auch von Cystin (je nach Oxidationszustand) bestimmt wird. Bei bekannter Aminosäuresequenz kann der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ ermittelt werden (Pace *et al.*, 1995). Er ergibt sich aus der Summe der Absorptionen von Tryptophan-, Tyrosin- und Cystinresten bei 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} [\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}] = n_{\text{Trp}}\cdot 5.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} + n_{\text{Tyr}}\cdot 1.49 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} + n_{\text{Cys-S-S-Cys}}\cdot 0.125 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Enthält das Protein FAD, muss dessen Eigenabsorption bei 280 nm mit berücksichtigt werden. Unter Einbeziehung des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Konzentration berechnet werden. Da die Absorption bei 280 nm relativ stark ist, wird diese Berechnung für verdünnte Proben herangezogen.

Konzentrationen von Flavoproteinen wie der TrxR (Gromer *et al.*, 1998) können auch allein aufgrund des Absorptionsmaximums ihres Cofaktors FAD bei 463 nm ($\epsilon_{463\text{nm}} = 11.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) photometrisch bestimmt werden. Diese Konzentrationsberechnung gilt in der Regel für unverdünnte Proteinlösungen.

2.2.3.2 Enzymatische Assays

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Enzymaktivitäten in *Unit* [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$] bei 25°C (37°C bei Gewebeproben) in einem Assayvolumen von 500 µl und in 1 cm Polystyrolküvetten bestimmt. In jedem Assaysystem diente eine Referenzküvette mit allen Komponenten außer der Enzym(Gewebe-, Blut-)Probe als Kontrolle.

2.2.3.2.1 DTNB-Reduktionsassay (Holmgren and Bjornstedt, 1995)

Eines der Substrate, die direkt von großen (Säuger-) Thioreduktasen mittels NADPH reduziert werden können, ist DTNB oder Ellmann's Reagenz (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat)).

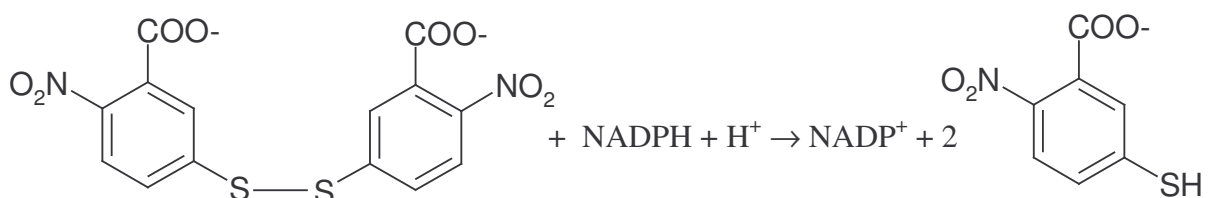


Abb. 2.1: Reaktionsgleichung der DTNB-Reduktion durch die Thioredoxinreduktase.

Gemessen wird die durch das Thiolat des gebildeten TNB⁻ entstehende Absorptionzunahme bei 412 nm ($\epsilon_{412\text{nm},\text{TNB}^-} = 13.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Da pro NADPH zwei TNB⁻ entstehen und die

TrxR-Aktivität auf den NADPH-Verbrauch bezogen wird, muss die Absorptionsänderung halbiert werden.

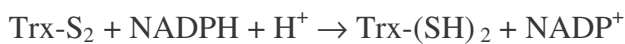
$$\text{Aktivität in der Küvette [U/ml]} = \frac{\Delta A / \text{min} \cdot V_o}{13.6 \cdot 2 \cdot d \cdot v_i}$$

Gleichung 2.1: Aktivitätsberechnung der TrxR in Bezug auf DTNB-Reduktion, bezogen auf NADPH-Verbrauch.

V_o ist das Gesamtvolumen in der Küvette, v_i das eingesetzte Enzymvolumen und d die Schichtdicke der Küvette (1 cm). Die Absorption wurde während der ersten 1-2 min beobachtet und im Standard DTNB-Assay kamen 5-10 mU/ml TrxR, 200 μ M NADPH und 3 mM DTNB in TrxR-Assaypuffer (Tabelle 2-III) zum Einsatz. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Reaktion mit DTNB gestartet, so dass der erste Reduktionsschritt des Enzyms mit NADPH bereits stattgefunden hatte und das DTNB direkt umgesetzt werden konnte.

2.2.3.2.2 *Thioredoxin-Reduktionsassay (Irmler et al., 2002)*

Oxidiertes humanes Thioredoxin wird in diesem Assay NADPH-abhängig umgesetzt.



Gemessen wird die durch den NADPH-Verbrauch entstehende Absorptionsabnahme bei 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

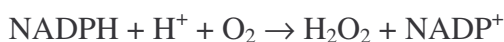
$$\text{Aktivität in der Küvette [U/ml]} = \frac{\Delta A / \text{min} \cdot V_o}{6.22 \cdot d \cdot v_i}$$

Gleichung 2.2: Aktivitätsberechnung der TrxR in Bezug auf NADPH-Verbrauch während der Trx-Reduktion.

Im Standard Trx-Assay kamen 5-10 mU/ml TrxR, 100 μ M NADPH und 20 μ M Trx in TrxR-Assaypuffer zum Einsatz. Zur Überprüfung auf eine mögliche durch Luftsauerstoff bedingte NADPH-Oxidaseaktivität der TrxR (Abschnitt 2.2.3.2.3) wurde diese zunächst mit NADPH reduziert und für 1-2 min am Photometer beobachtet. Zum eigentlichen Reaktionsstart wurde dann Trx zugegeben. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ist die Reaktion sehr schnell, damit der lineare Messbereich deutlich limitiert und die *steady-state*-Bedingungen werden leicht überschritten. Die Absorptionsänderung wurde während der ersten Minute der Reaktion verfolgt.

2.2.3.2.3 *Oxidaseaktivitätsassay*

Die Oxidaseaktivität im Rahmen einer NADPH-abhängigen Reaktion kann als Nebenreaktion in sauerstoffhaltiger Umgebung vorkommen.



Im allgemeinen ist die Oxidaseaktivität der Säugerthioredoxinreduktasen zu vernachlässigen, kann aber durch zusätzliche Faktoren wie alkylierende Substanzen induziert oder deutlich erhöht werden (Nordberg *et al.*, 1998). Zur Bestimmung wurde die TrxR-Probe mit 100-200

μM NADPH in TrxR-Assaypuffer inkubiert und der NADPH-Verbrauch im Photometer bei 340 nm verfolgt.

2.2.3.2.4 *Glutathionreduktaseassay (Krohne-Ehrich et al., 1977)*

Glutathiondisulfid (GSSG) wird mittels der Glutathionreduktase NADPH-abhängig zu Glutathion (GSH) reduziert.

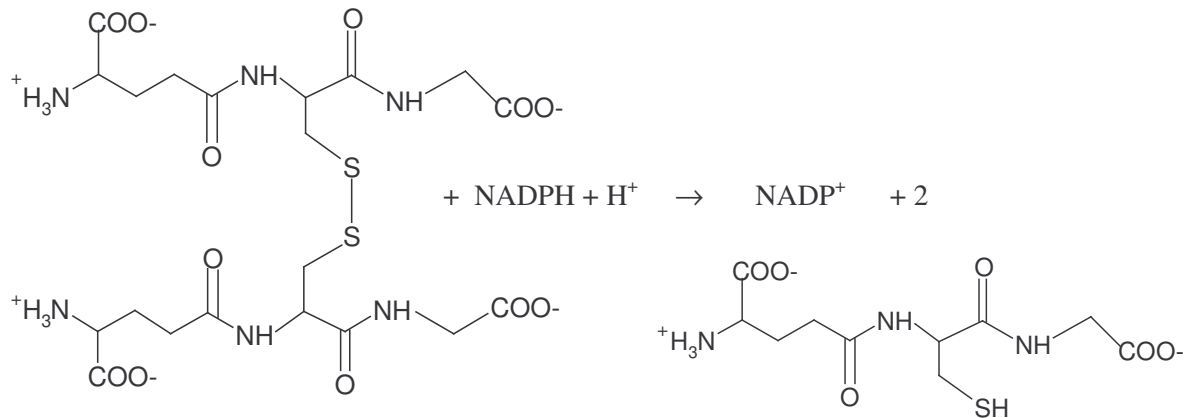
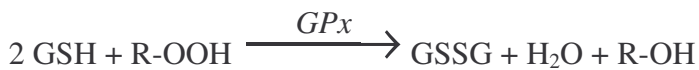


Abb. 2.2: Reaktionsgleichung der GSSG-Reduktion durch die Glutathionreduktase.

Die GR-Probe wurde mit 100 μM NADPH in GR-Assaypuffer (Tabelle 2-III) inkubiert und die Reaktion mit Glutathiondisulfid ad 1 mM gestartet. Der NADPH-Verbrauch konnte wie beim Trx-Assay direkt bei 340 nm verfolgt werden ($\epsilon_{340\text{nm},\text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Gleichung 2.2). Bei den Messungen mit den verschiedenen TrxR-Proben (Tabelle 2-X) wurden höhere GSSG-Konzentrationen eingesetzt (1-50 mM).

2.2.3.2.5 *Glutathionperoxidaseassay (Beutler, 1984)*

Peroxide werden von der Glutathionperoxidase glutathionabhängig zu ihren Alkoholen reduziert.



Das bei der Reaktion erhaltene GSSG wird im Assay durch die Glutathionreduktase NADPH-abhängig reduziert und das GSH wiedergewonnen. Die damit verbundene Absorptionsabnahme wird bei 340 nm photometrisch verfolgt.



Die Enzymprobe wurde mit 100 μM NADPH und anschließend mit GR (ad 1 U/ml) und GSH (ad 2 mM) in GPx-Puffer (Tabelle 2-III) für insgesamt 5-10 min vorinkubiert, bevor die Reaktionsabfolge durch Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid (*tert*-BOOH, ad 70 μM) initiiert wurde. Die Berechnung der Aktivität erfolgt analog derer im GR-Assay.

2.2.3.2.6 *Glutathion S-Transferaseassay (Beutler, 1984)*

Die Glutathion S-Transferase reduziert CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzen) mittels Glutathion unter Bildung von Phenylglutathion (DNP-S-Glutathion).



Die Reihenfolge der Reaktandenzugabe wurde im Rahmen dieser Arbeit umgestellt, da biologische Proben häufig eine deutliche Hintergrundaktivität aufweisen, die berücksichtigt werden muss.

Die zu bestimmende Enzym- oder Gewebeextraktprobe wurde zunächst mit GSH (ad 1 mM) in GST-Puffer (Tabelle 2-III) inkubiert bis die *baseline*-Aktivität einen konstanten Wert erreicht hatte. Dann wurde mit CDNB (ad 0.5 mM) inkubiert, um die Absorptionszunahme durch die Bildung des DNP-S-Glutathions bei 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{DNP-S-GSH}} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) zu verfolgen.

$$\text{Aktivität in der Küvette [U/ml]} = \frac{\Delta A / \text{min} \cdot V_0}{9.6 \cdot d \cdot v_i}$$

Gleichung 2.3: Aktivitätsberechnung der GST über die Bildung von modifiziertem Glutathion.

2.2.3.2.7 *Selenenyliodid-Reduktionsassay (Mugesh et al., 2003)*

Die NADPH-abhängige Reduktion von Selenenyliodid ist eine weitere Reaktion zur Charakterisierung der Thioredoxinreduktase. Hierbei wird die hohe Affinität des Selenols in der TrxR gegenüber der elektrophilen Spezies (Selenenylhalid) ausgenutzt. Die Reaktion kann auch in Anwesenheit von Thioredoxin erfolgen, wird dadurch aber nicht maßgeblich aktiviert.

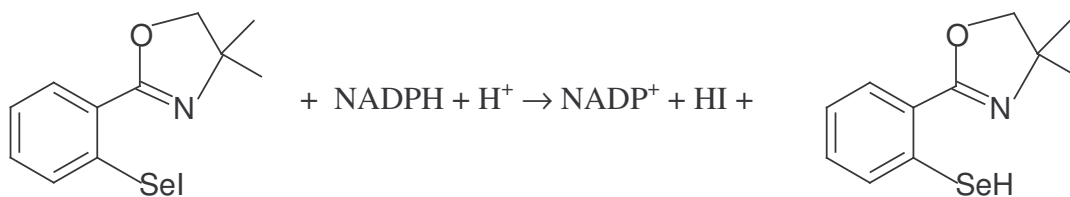


Abb. 2.3: Reaktionsgleichung der Selenenyliodid-Reduktion durch die Thioredoxinreduktase.

Die Reaktion wurde in TE-Puffer mit 50 nM Untereinheiten TrxR (UE-hTrxR), 5-100 μM oxidiertem Selenenyliodid (OxSeI) und 100 μM NADPH bei 340 nm verfolgt und die NADPH-Oxidaseaktivität analog den Abschnitten 2.2.3.2.2-2.2.3.4 bestimmt.

2.2.3.2.8 *Dehydroascorbat-Reduktionsassay (May et al., 1997)*

Die TrxR-vermittelte NADPH-abhängige Dehydroascorbatreduktion stellt eine Möglichkeit dar, unabhängig vom Glutathionsystem Ascorbat (A) zu regenerieren.



Die Reaktion wurde in TE-Puffer mit 0.05-4.0 μM UE-hTrxR, 2 mM Dehydroascorbat (DHA) und 100 μM NADPH bei 340 nm für 2-10 min verfolgt und die NADPH-Oxidaseaktivität analog den Abschnitten 2.2.3.2.2-2.2.3.4 bestimmt.

2.2.3.2.9 *Menadion-Reduktionsassay (Cenas et al., 2004)*

Die NADPH-abhängige Reaktion von Thioredoxinreduktase mit Menadion (Vitamin K₃, 2-Methyl-1,4-Naphthochinon) läuft über die Zwischenstufe des Semichinons (1 Elektronen-reduziertes Zwischenprodukt) bis zum Produkt des Hydrochinon (2 Elektronen-reduzierte Form).

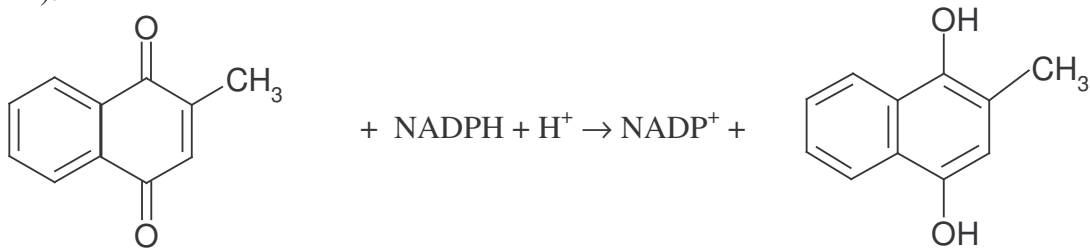


Abb. 2.4: Reaktionsgleichung der Menadion-Reduktion durch die Thioredoxinreduktase.

Die Reaktion wurde mit 0.28 μM UE-hTrxR, 0.01-1.2 mM Menadion und 300 μM NADPH in TE-Puffer durchgeführt und die Absorptionsabnahme bei 340 nm für 30 min verfolgt. Die NADPH-Oxidaseaktivität wurde analog den Abschnitten 2.2.3.2.2-2.2.3.4 bestimmt.

2.2.3.3 *Selen- und Platinbestimmungen*

Selen- und Platingehalte in Geweben wurden mittels der radiochemischen Methode der Neutronenaktivierungsanalyse bestimmt. Diese Methode erlaubt die Bestimmung von Spurenelementen in kleinen Proben (Nachweisgrenzen liegen im ppm- bis ppb-Bereich). Ihr Prinzip beruht darauf, dass die Proben (zusammen mit geeigneten Standards) in einem Reaktor mit Neutronen bestrahlt werden. Die dadurch entstehenden radioaktiven Isotope zerfallen unter Aussendung charakteristischer Gammastrahlung (= analytisches Signal). Energie und Intensität dieser Strahlung werden gemessen, mit Standardwerten verglichen und verrechnet.

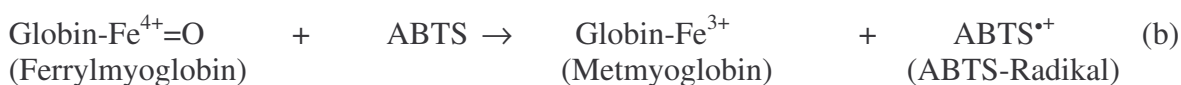
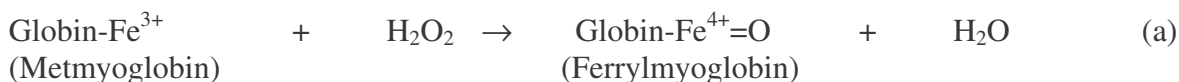
Die Untersuchungen von Rattengewebeproben erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Dorothea Alber am Hahn-Meitner Institut in Berlin (Urig *et al.*, 2005). Für die Bestimmung des Platingehaltes wurden die Intensitäten der Gammalinien 158 keV und 208 keV des Isotops Au-199 (Halbwertszeit 3.14 Tage) benutzt. Die Selengehalte wurden über die Gammalinien 136 keV und 265 keV des Isotops Se-75 (Halbwertszeit 120 Tage) bestimmt.

2.2.3.4 *Bestimmung antioxidativer Parameter in Blut und Gewebe*

Die Aufarbeitung der Rattengewebe für Glutathion- und Enzymbestimmungen wird im Abschnitt 2.2.5 ausführlich beschrieben. Bei den Bestimmungen der Vollblutproben wurde dem Puffer Digitonin ad 40 $\mu\text{g/ml}$ beigemischt zur Lyse der Erythrozyten (Lysepuffer).

2.2.3.4.1 *Totaler Antioxidativer Status (TAOS)* (Rice-Evans and Miller, 1994)

Dieser biochemische Parameter wurde im Blutplasma nach dem sog. ABTS-Assay bestimmt. Der Assay beruht darauf, dass Antioxidantien die Bildung von Radikalen ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) unterdrücken und die daraus resultierende Verzögerung einer Absorptionzunahme photometrisch gemessen werden kann. Metmyoglobin wird zunächst mit Wasserstoffperoxid zu Ferrylmyoglobin oxidiert (a) und dieses reagiert mit ABTS unter Bildung des $\text{ABTS}^{\bullet+}$ Radikals (b). Das $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikal hat eine charakteristische Farbe, die relativ stabil ist und bei 600 nm gemessen werden kann.



Für die TAOS-Bestimmung wurden zuvor eine sog. Chromogenlösung (PBS Puffer mit 7.45 μM Metmyoglobin und 745 μM ABTS), eine Trolox[®] Standardlösung aus einem synthetischem Vitamin E Analogon (0.5 mM 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure) sowie eine Substratstammlösung (1.5 mM Wasserstoffperoxid in PBS-Puffer) hergestellt. Dann wurden 200 μl der Chromogenlösung bei 37°C mit 8 μl Plasmaprobe, Trolox[®] Standard oder einer Leerprobe (Wasser) vermischt und die Absorption bei 600 nm bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μl Wasserstoffperoxidlösung gestartet und exakt 3 min später die Endabsorption gemessen. Die Temperatur der Proben wurde durch entsprechende Vorinkubation im Photometer konstant gehalten. Alle Absorptionsmessungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert zur Berechnung des TAOS herangezogen ($\text{TAOS} = F \cdot (\Delta A_{\text{Leerwert}} - \Delta A_{\text{Probe}})$ [mM], wobei F der Standardisierungsfaktor ist ($F = \text{Konzentration des Standards} / (\Delta A_{\text{Leerwert}} - \Delta A_{\text{Standard}})$)).

2.2.3.4.2 *Erythrozyten Glutathionreduktase Aktivierungskoeffizient (EGRAC)* (Becker et al., 1991)

Die Grundlage zur Berechnung des EGRAC bildet die Glutathionreduktase-katalysierte Reaktion von GSSG und NADPH (Abschnitt 2.2.3.2.4) mittels des Cofaktors FAD. Hierbei werden die Proben auf ihre Glutathionreduktaseaktivität ohne FAD (Holo-GR Aktivität) und mit FAD (Holo-GR und Apo-GR Aktivität) bestimmt und zueinander in Relation gesetzt. Dadurch lässt sich der Gehalt an freiem FAD in einer Blutprobe bestimmen, der ein Maß für den Riboflavinstatus ist. Im Rahmen der EGRAC-Bestimmung kann zusätzlich auch der Hämoglobinwert des Blutes bestimmt werden (Abschnitt 2.2.3.4.3).

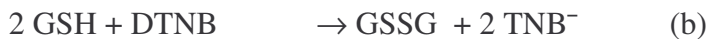
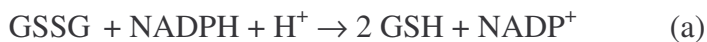
Zunächst wurde die Blutprobe (10 μl) in 5 ml GR-Assaypuffer mit Digitonin verdünnt, so dass nach Erythrozytenlyse eine klare Lösung für die photometrische Messung zur Verfügung stand. Je 2 ml Hämolysat wurde in zwei Küvetten gegeben und eine davon sofort mit 10 μl FAD versetzt zur Sättigung der GR. Nach Volumen- und Temperaturengleich der beiden Küvetten (Inkubation im Photometer bei 25°C) wurde die GR-Aktivität bei 340 nm bestimmt. Dazu wurden die Proben zunächst mit NADPH ad 100 μM reduziert und zur Stabilisierung der Absorption 3 min inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch GSSG-Zugabe ad 1 mM gestartet und die Absorptionsabnahme über 5-10 min beobachtet.

2.2.3.4.3 *Hämoglobinbestimmung (Becker et al., 1991)*

Der Hb-Gehalt des Blutes wurde in der vorbereiteten Küvette (Abschnitt 2.2.3.4.2) durch direkte Absorptionsmessung bei 340 nm bestimmt. Als Leerwert diente eine Küvette mit Lysepuffer. Die Konzentration des Hämoglobins in g/dl wurde mit Hilfe seines Extinktionskoeffizienten und des Verdünnungsfaktors D der Probe berechnet (Konz. (Hb) = $(A_{340\text{nm,Probe}} - A_{340\text{nm,Puffer}}) \cdot D / 18.5$ [g/dl]) ($\epsilon_{340\text{nm,Hb}} = 18.5$ (g/dl) $^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.2.3.4.4 *Gesamtglutathion in Geweben und Erythrozyten (Becker et al., 1994)*

Bei der Glutathionbestimmung kommt die Glutathionreduktasereaktion (a) erneut zur Anwendung. Das auf diese Weise reduzierte Glutathion (GSH) kann in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit DTNB unter Entstehung des gelben TNB⁻-Ions oxidiert werden (b). Das Reaktionsprodukt TNB⁻ wird bei seiner charakteristischen Wellenlänge von 412 nm detektiert (Abschnitt 2.2.3.2.1). Bei konstanter Temperatur sowie GR-, DTNB- und NADPH-Überschuss ist die Geschwindigkeit der TNB⁻-Produktion der absoluten Gesamtglutathionkonzentration (GSSG + GSH) proportional.



Die Aufbereitung der Proben zur Glutathionbestimmung wird im Folgenden beschrieben. Zur Zellyse und Proteinpräzipitation wurden 200 µl frisches EDTA-Blut mit 600 µl 5%-iger Sulfosalicylsäure versetzt. Nach kräftigem Mixen wurde das Gemisch abzentrifugiert (10 min, 10000 g) und der klare Überstand für die Messungen abgenommen. Zunächst wurde eine Glutathioneichkurve mit Hilfe eines GSH-Standards ad 0.5-5 µM im Assay bestimmt. Die Probenanalyse erfolgte mit 10 µl der frisch aufbereiteten Probe. Nach Zugabe des DTNB-Substrates zur GSH-Standardreihe, einem Puffer-Leerwert oder der GSH-Probe in Puffer wurde der Ansatz 5-10 min bei 25°C inkubiert und danach die enzymatische Reaktion mit 100 U/ml GR gestartet. Der lineare Bereich der Reaktion (innerhalb der ersten 30-60 s) wurde für die Absorptionsbestimmung ($\Delta A/\text{min}$) bei 412 nm herangezogen. Jede Probe wurde doppelt bestimmt und der Wert der Leermessung ohne GSH-Standard und ohne Probe von jedem einzelnen Messwert abgezogen. Die Gleichung der Eichgeraden wurde für die Berechnung der Gesamtglutathionkonzentration im Vollblut entsprechend umgeformt und die Gesamtverdünnung der Probe berücksichtigt. Auf der Basis dieses Wertes und unter Berücksichtigung des Hämatokritwertes ($\text{Hk} = 3 \cdot \text{Hb}$) konnte die Glutathionkonzentration in den Erythrozyten berechnet werden ($[\text{GSH}]_{\text{Erythrozyten}} = [\text{GSH}]_{\text{Vollblut}} \cdot 100/\text{Hk}\%$).

2.2.4 *Reinigung der Thioredoxinreduktase aus humaner Plazenta*

Eine Reinigungsmethode der Thioredoxinreduktase aus humaner Plazenta wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Stephan Gromer, Biochemiezentrum Heidelberg, etabliert und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf Ausbeute- und Reinheitserhöhung optimiert werden. Die von der Entbindungsstation des Katholischen Krankenhauses, Gießen, zur Verfügung gestellten Plazenten wurden entsprechend den folgenden Schritten aufbereitet und die TrxR daraus extrahiert. Bis zu 17 bei -80°C tiefgefrorene Plazenten wurden 48 h vor Beginn der Präparationsprozedur auf -20°C umgelagert.

2.2.4.1 Chloroform-Butanol-Extraktion

Die Plazenten wurden einzeln gewogen zur Bestimmung des Extraktionspuffervolumens von 1 ml pro Gramm Plazenta. Je fünf Plazenten wurden in einem Gefrierbeutel mit Extraktionspuffer (TE-Puffer mit 40 μ M PMSF) versetzt und in einem warmen Wasserbad angetaut. Dann wurden die Plazentenportionen nach und nach herausgenommen, das Gewebe in ca. 4 cm dicke Scheiben geschnitten und in einem Mixer unter Zugabe von TE-Puffer und 10 μ M PMSF homogenisiert. Die Gesamtmasse wurde auf Eis gekühlt und zur Stabilisierung der Proteine mit 5 M Ammoniaklösung unter Rühren auf pH 8.3 eingestellt. Dann wurden unter Rühren pro Gramm Plazenta 0.12 ml einer -20°C kalten Chloroform-1-Butanol-Mischung (2:5, v:v) zugegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Das dann entstandene braune Homogenat wurde bei 8000 g und 4°C für 60-90 min zentrifugiert. Der rotbraune Überstand wurde über Glaswolle filtriert und die Pellets mit dem restlichen Extraktionspuffer im Mixer rehomogenisiert, wieder zentrifugiert und nach Filtrierung mit dem ersten Extrakt vereinigt. Der Chloroform-Butanol-Extrakt wurde mit 1 M Ammoniaklösung auf pH 8.3 eingestellt.

2.2.4.2 Acetonpräzipitation

Pro 1ml Chloroform-Butanol-Extrakt wurden 0.85 ml eiskaltes Aceton unter Rühren im Eisbad zugegeben. Die Lösung flockte sofort aus und wechselte ihre Farbe nach hellbeige. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde abzentrifugiert (3500 g, 4°C , 15 min) und der erhaltene Zentrifugationsüberstand verworfen. Die Pellets wurden in kleineren Mengen TE-Puffer unter Rühren im Becherglas bei 4°C resuspendiert. Die dabei entstehende braune Suspension wurde portionsweise in ca. 60 cm lange Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht im Kühlraum gegen den 20-30 fachen Überschuss an 1:4 mit Wasser verdünntem TE-Puffer (~30 l) dialysiert. Die Dialyse wurde am nächsten Morgen mit frischem 1:2 verdünntem TE-Puffer für 2-3 h fortgesetzt. Das Dialysat wurde einem Ultrazentrifugationsschritt (100 000 g, 4°C , 50 min) unterzogen, um eine erste Vorreinigung durch Entfernung von z.B. Membranresten zu erreichen. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und in einem Becherglas gesammelt. Die festen braunen Pellets wurden in TE-Puffer resuspendiert, erneut ultrazentrifugiert und dieser Überstand ebenfalls zur Lösung ins Becherglas gegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M Ammoniaklösung auf 8.3 eingestellt, eine Probe zur Bradford-Proteinbestimmung und eine Probe für das spätere SDS-Gel entnommen.

2.2.4.3 Ionenaustauschchromatographie, DEAE-Zellulose

Das acetongefällte Dialysat wurde langsam (1 Tropfen/s) auf eine mit TE-Puffer bei 15°C äquilibrierte DEAE-Zellulosesäule aufgetragen (2 l Säulenvolumen, SV). Diese wurde mit zwei SV TE-Puffer und einem SV 50 mM NaCl-TE-Puffer gewaschen und verschiedene Waschfraktionen getrennt aufgefangen. Die Elution erfolgte anschließend in 1 SV 90 mM NaCl-TE-Puffer und die je nach Proteinzusammensetzung unterschiedlich gefärbten Eluate wurden in 12 verschiedenen Fraktionen gesammelt. Während der Wasch- und Elutionsvorgänge konnten Proben entnommen und in Aktivitätsassays (TrxR-DTNB-Assay, GR-Assay (Abschnitt 2.2.3.2)) auf das Vorhandensein von TrxR und GR getestet werden. Der Pool der Fraktionen (~ 1.8 l) mit höchster TrxR-Aktivität wurde über Nacht gegen 1:2 verdünnten TE-Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde dann mit 100 mM HCl auf pH 7.6 eingestellt.

2.2.4.4 Affinitätschromatographie, 2',5'-ADP-Sepharose 4B

Dieser Reinigungsschritt wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt und die 2',5'-ADP-Sepharosesäule (60 ml SV; Kapazität ~ 0.4 mg Protein pro ml Sepharose) zusätzlich mit einem Kühlmantel mit Wasseranschluss versehen. Der DEAE-Pool wurde langsam (1 Tropfen/s) auf die mit TE-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen und anschließend mit 3 SV TE-Puffer gewaschen. Dann wurde mit 2 SV 100 mM KCl, 3 SV 1:1 mit Wasser verdünntem TE-Puffer, 2 SV TE/H₂O mit 500 µM NADH, 1 SV 1:1 TE/H₂O sowie am Ende mit 1 SV unverdünntem TE-Puffer gewaschen. Um weitere, der TrxR verwandte NADP⁺/NADPH-abhängige Proteine abzutrennen, wurde mit 2 SV 100 µM NADP⁺ in TE-Puffer voreluert. Der dabei entstehende Verlust einer kleinen TrxR-Menge wurde wegen der höheren Reinheit des Proteins in der Hauptelution in Kauf genommen. Die Elution wurde mit zwei weiteren SV 300 µM NADP⁺/TE gestartet, die fraktioniert gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Dann wurde mit 2 SV 700 µM NADP⁺/TE eluiert und 10 ml-Fractionen gesammelt. Diese Fractionen wurden alle auf TrxR-Aktivität getestet (Abschnitt 2.2.3.2) und davon Probenaliquots für die SDS-PAGE entnommen. Die 2',5'-ADP-Sepharosesäule wurde noch mit 2 SV 2 mM NADP⁺/TE nachgewaschen. Die Eluate mit höchster TrxR-Aktivität und Reinheit wurden vereinigt und in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle unter Stickstoff-Vakuumdruck bis auf ein Minimalvolumen von 5-8 ml eingengt. Die konzentrierte goldgelbe Proteinlösung wurde über Nacht gegen TE-Puffer mit 2-10 mM DTT und 150 mM NaCl dialysiert.

2.2.4.5 FPLC-Gelfiltrationschromatographie, Superdex 200

Die über Nacht im Dialyseschlauch reduzierte rötliche Proteinlösung wurde für 30 min bei 10000 g zentrifugiert, einer Proteinbestimmung unterzogen und in Auftragsvolumina von 2 ml (~ 10 mg Gesamtprotein) aufgeteilt. Für den letzten Reinigungsschritt der Plazentenpräparation wurde eine an ein FPLC-System angeschlossene HiLoad 16/60 Superdex 200-Gelfiltrationssäule (120 ml SV) verwendet. Diese wurde zuvor mit Proteinen bekannter Molekularmasse kalibriert, so dass die ermittelte Eichgerade zur Berechnung des Molekulargewichts aus dem Elutionsprofil verwendet werden konnte.

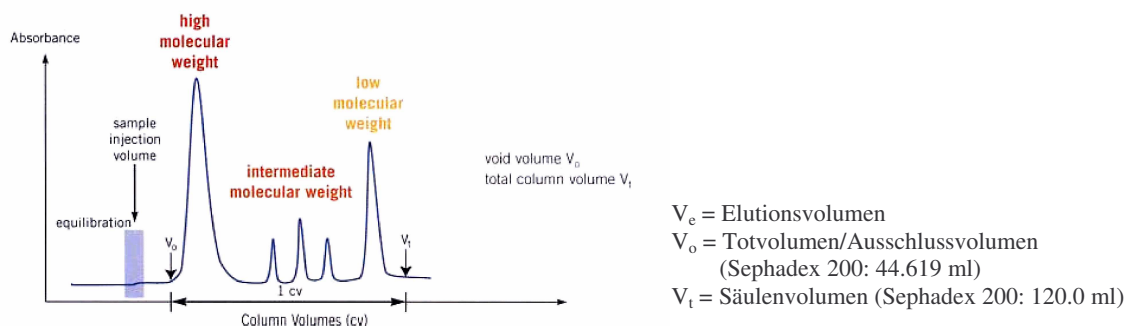


Abb. 2.5: Theoretisches Chromatogramm einer Fraktionierung mit hoher Auflösung (UV-Absorption).

$$\log(M_w) = \frac{K_{av} - 2.2446}{-0.38172}$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Gleichung 2.4: Gleichung der Kalibrierungsgeraden der Superdex 200.

Da die Differenz ($V_t - V_0$) das Volumen der für lösliche Moleküle undurchdringbaren Matrix beschreibt, ist K_{av} kein echter Teilungskoeffizient. Bei einem gegebenen Medium ist das Verhältnis von $K_{av}:K_d$ konstant und unabhängig von der Natur und der Konzentration des Moleküls. K_{av} ist leicht zu bestimmen und definiert (wie K_d) das Verhalten der Probe unabhängig von Säulendimensionen und Säulenpackung.

Nach Äquilibration der Säule mit TE-Puffer, 2-10 mM DTT, 150 mM NaCl bei 15-20°C wurde die Probe mittels einer Spritze in das FPLC-System eingebracht und das Programm zum Probendurchlauf gestartet (Flussrate 1 ml/min, Drucklimit 0.3 MPa, Äquilibrationvolumen 0.02 SV, *Empty Loop* 2 ml, Elutionsfraktionen 2-4 ml, Elutionsvolumen 1.5 SV). Die Proteinproben wurden bei 280 nm photometrisch detektiert und das Elutionsprofil *online* verfolgt. Nach dem Lauf wurden die Peakfraktionen auf ihren Proteingehalt bestimmt sowie ihre Reinheit auf einem SDS-Gel überprüft. Da zur TrxR-Reinigung aus dem Gesamtansatz der Plazentenpräparation mehrere FPLC-Läufe notwendig waren, musste nach fünf Läufen eine Regeneration der Sephadexsäule mit 0.5 SV 0.5 N NaOH und 1 SV H₂O erfolgen. Die reinsten TrxR-Fractionen wurden vereinigt, im Centriprep30 eingengt und mit TE-Puffer mehrmals gewaschen.

2.2.5 Aufarbeitung von Rattengewebe

Im Rahmen des Glioblastom-Projektes innerhalb dieser Arbeit wurden Gewebe von mit Platinkomplexen behandelten und unbehandelten Ratten mit *Glioblastoma multiforme* von der AG Herold-Mende, Uniklinikum Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Die tiefgefrorenen Gewebe Darm, Haut, Herz, gesundes Hirngewebe, Hirntumorgewebe, Leber, Lunge, Milz, Muskel, Niere wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver zerrieben, aliquotiert (50 – 100 mg) und mit TrxR-Puffer (siehe Tabelle 2-III) versetzt. Der Zellaufschluss wurde durch dreimaliges Frieren und Tauen vorbereitet (nach jedem *freezing-thawing*-Schritt Mix- und Zentrifugationsvorgang) und erfolgte mittels Ultraschall (Sonifier, Stufe 1, 50% *duty cycle*, 3 x 10 s, mit intermediären Pausen). Der nach einem anschließenden 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 34300 g und 4°C erhaltende klare Überstand wurde für Protein-, Enzymaktivitäts- und Antioxidantien-Bestimmungen eingesetzt.

2.2.6 Inhibitorstudien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Inhibitorstudien mit verschiedenen Klassen von Inhibitoren durchgeführt, die im Folgenden methodisch näher erläutert werden. Dabei sollten der Einfluss auf das Thioedoxinsystem, insbesondere auf die Thioedoxinreduktase in Wildtyp- und Mutantenform im Vordergrund stehen, und darüber hinaus die Bindungs- und Hemmeigenschaften der Inhibitoren gegenüber Redoxproteinen wie der Glutathionreduktase anhand von Strukturuntersuchungen aufgeklärt werden.

Die Strukturformeln der synthetischen Substanzen sind in den nachfolgenden Tabellen (Tabellen 2-XI – 2-XIII) innerhalb der Abschnitte 2.2.6.1 und 2.2.6.2 aufgeführt.

2.2.6.1 Platinkomplexe

Zwei Arten von Platinkomplexen, Derivate von *Cis*-Diamindichlorplatin und Terpyridinplatin standen im Mittelpunkt erster Inhibitorstudien innerhalb der Promotionsarbeit.

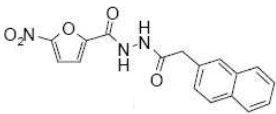
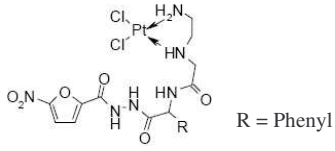
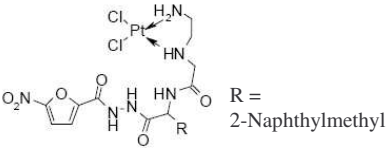
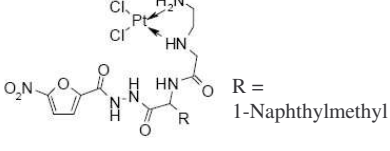
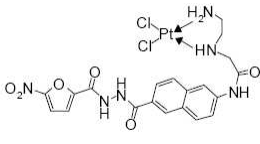
2.2.6.1.1 *Cis-Diamindichlorplatin Komplexe*

Eine Nitrofuranverbindung und vier daraus abgeleitete Cisplatin-Komplexe (Verbindungen **8**, **13a-c**, **20**, Tabelle 2-XI) wurden von Dr. Elisabeth Davioud-Charvet (Biochemie-Zentrum, Universität Heidelberg) synthetisiert (Millet *et al.*, 2005). Die Eigenschaften dieser Verbindungen als mögliche TrxR-Inhibitoren sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die Substanzen wurden kurz vor den Untersuchungen eingewogen, daraus Stammlösungen (10 mM) in DMF hergestellt und je nach erforderlicher Konzentration verdünnt. Alle Untersuchungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Hemmkinetiken im *steady-state*-Bereich wurden im Thioredoxin- als auch im DTNB- Reduktionsassay durchgeführt. Zunächst wurden die Inhibitorkonzentrationen ermittelt, die eine halbmaximale Enzymhemmung ($i_{0.5}$, früher IC_{50}) (Cortes *et al.*, 2001) bewirken. Dazu wurden 2-10 mU/ml TrxR 10 min mit NADPH (100 μ M, Trx-Assay; 200 μ M, DTNB-Assay) und variierenden Inhibitorkonzentrationen bei 25°C vorinkubiert: Die Restaktivität des Enzyms wurde nach Zugabe von Substrat (20 μ M Trx oder 3 mM DTNB) bestimmt. In den Kontrollassays wurde DMF anstatt Inhibitor verwendet und als weiterer Vergleich wurde der Hemmeinfluss auf nicht selenabhängige Enzyme wie die TrxR aus *Drosophila melanogaster* sowie die humane GR getestet.

Zur Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten wurden 5-10 mU/ml hTrxR mit 100 μ M NADPH und 0-36.6 μ M Inhibitor bei 25°C inkubiert (2% DMF in der Reaktionsmischung). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots von 5 μ l entnommen und in einem Reaktionsansatz mit Thioredoxin bei 25°C gemessen.

Tabelle 2-XI: Namen, Strukturformeln und Molekulargewicht von 5-Nitro-2-furancarbohydrazid und den verschiedenen CDDP-Komplexen.

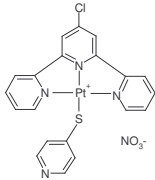
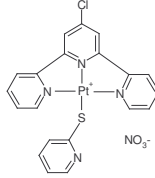
Name	Verbindung	M _w [g/mol]	Strukturformel
8	5-Nitro-2-furancarbohydrazid	339.3	
13a	(N'-[2-(Amino)ethyl-Gly-DL-phenylglyciny]-5-nitro-2-furancarbohydrazid) Dichlorplatin (II)	670.6	
13b	(N'-[2-(Amino)ethyl-Gly-2-DL-(naphthyl)alaniny]-5-nitro-2-furancarbohydrazid) Dichlorplatin (II)	734.5	
13c	(N'-[2-(Amino)ethyl-Gly-1-DL-(naphthyl)alaniny]-5-nitro-2-furancarbohydrazid) Dichlorplatin (II)	734.5	
20	N-[6-(2-[(5-Nitro-2-furyl)carbonyl]hydrazino-carbonyl)-2-naphthyl]-2-[(2-aminoethyl)amino]acetamid Dichlorplatin(II)	706.4	

Zur weiteren Charakterisierung der Hemmung wurden Hemmtyp und Inhibitionskonstante (K_i) der Verbindungen **8-20** bestimmt. Die Reaktionen wurden mit NADPH (100 oder 200 μM) gestartet und die K_M -Werte für Trx und/oder DTNB bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (0-250 μM) analysiert.

Untersuchungen zur Reversibilität der Hemmung wurden an der inaktivierten TrxR durchgeführt. Dazu wurden 20.6 nM Untereinheiten hTrxR (UE-hTrxR) mit 2 μM Inhibitor in Anwesenheit von NADPH 10 min inkubiert, um minst. 90% aller Enzymmoleküle im Vergleich zur inhibitorfreien Kontrolle zu inaktivieren. Anschließend wurden alle Ansätze erschöpfend (mind. 3 · 3 h) dialysiert und auf die Reaktivierung des Enzyms hin untersucht. Darüber hinaus wurde in einem zweiten Ansatz nach der Enzyminaktivierung ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit 10 mM DTT für 2 h durchgeführt. Nach erfolgter Dialyse wurde die Aktivität der TrxR gegenüber einer DMF-Kontrolle bestimmt.

2.2.6.1.2 Terpyridinplatin-Komplexe

Tabelle 2-XII: Namen, Strukturformeln und Molekulargewicht der beiden Terpyridinplatin-Komplexe.

Name	Verbindung	M_w [g/mol]	Strukturformel
I₂₃2N	4-Mercaptopyridin(4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridin)platin(II) Nitrat	697	
I₂₅2N	2-Mercaptopyridin(4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridin)platin(II) Nitrat	697	

Die Verbindungen in Tabelle 2-XII wurden von Prof. Gordon Lowe, Pharminox/Oxford, im Rahmen einer Kooperation mit der AG Becker-Brandenburg synthetisiert und wurden bereits erfolgreich als spezifische TrxR-Inhibitoren mit antiproliferativen Eigenschaften gegenüber Glioblastomzellen getestet (Becker *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effekte von behandelten und unbehandelten Zellen auf transkriptionaler und translationaler Ebene untersucht werden. Methoden wie die cDNA-Microarrayanalyse und *Real Time*-PCR als Genexpressionsanalysen (Abschnitt 2.2.1.3) sowie die 2D-Gelelektrophorese mit anschließender MALDI-TOF Massenspektrometrie kamen hierbei zur Anwendung. Die Microarray-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Steiner, DKFZ Heidelberg und die 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie im Rahmen der Promotionsarbeit von Saša Končarević durchgeführt (Abschnitt 3.5.6 und 3.5.8). Darüber hinaus wurden die mit **I₂₃2N** behandelten Glioblastomzellen auf das Vorhandensein apoptotischer Marker hin untersucht. Hinweise zur Bioverfügbarkeit der Terpyridinplatin(II)-Komplexe sollten durch *in vitro*-Untersuchungen mit ihren Glutathion- und Serumalbumin-Konjugaten (Abschnitt 2.2.3.2) gewonnen werden.

Neben den *in vitro*-Studien sollten die *in vivo*-Effekte der Terpyridinplatin(II)-Komplexe untersucht werden. In Kooperation mit der AG Herold-Mende, Neurochirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg, wurde ein Glioblastom-Rattenmodell (Grobben *et al.*, 2002; Harting *et al.*, 2003) etabliert, das als Untersuchungsobjekt für chemotherapeutische Anwendungen der Platinkomplexe diente (Abschnitt 3.5.1). Die Gewebe der Ratten wurden in

Gießen auf antioxidative enzymatische und nicht-enzymatische Redoxparameter untersucht und für Selen- und Platinbestimmungen mittels Neutronenaktivierungsanalyse (Abschnitte 2.2.3.2.-2.2.3.4) vorbereitet.

Apoptosetests an behandelten Glioblastomzellen

Die Kultivierung von primären Glioblastomzellen der Zelllinie NCH89 wurde bereits beschrieben (Herold-Mende *et al.*, 1999). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen gesplittet, indem sie mittels Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturgefäßoberfläche abgelöst, aliquotiert und in einer Dichte von $6.5 \cdot 10^5$ Zellen pro 12 ml Medium und Petrischale neu ankultiviert wurden. Am darauffolgenden Tag hatten sich die Zellen erholt, waren angewachsen und konnten mit dem Inhibitor behandelt werden. Zu 12 ml Kulturmedium wurden 3 bzw. 15 μM $\text{I}_{232\text{N}}$ (in DMSO) gegeben und die Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert. Kontrollansätze, bestehend aus mit 1.0 μM Staurosporin bzw. 3 U/ml DNase I inkubierten Positiv-Kontrollkulturen und substanzfreien Negativ-Kontrollkulturen sowie Kulturen mit DMSO, wurden parallel unter den gleichen Kultivierungsbedingungen mitgeführt. Die Morphologie der Zellen wurde während der Wachstums- und Behandlungsphase durch lichtmikroskopische Aufnahmen dokumentiert.

Nach der Inkubationsdauer wurden die Zellen mittels Trypsinierung geerntet, 20 μl der Zellsuspension mit 10 ml CASYton versetzt und Zellen ab einer Größe von $\sim 10 \mu\text{m}$ im elektrischen Pulszähler gezählt. Der Rest der Kulturüberstände wurde bei 400 g und 5°C 10 min lang zentrifugiert, mit PBS (10 ml) gewaschen, erneut zentrifugiert, in einer kleinen Menge PBS (1 ml) aufgenommen und für die Apoptosetests in zwei Ansätze aufgeteilt.

Zur Vorbereitung der Apoptosetests wurden spezielle Zellkultur-Objektträger mit Poly-L-Lysin zur positiven Aufladung ihrer Oberflächen beschichtet (Jacobsen and Branton, 1977). Die 12 *well*-Objektträger wurden zunächst mit Aceton gewaschen. Die Poly-L-Lysin-Stammlösung (1 mg/ml) wurde 1:100 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und von der Verdünnung jeweils 50 μl in die Objektträgervertiefungen eingebracht und 15 min bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Objektträger getrocknet und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Zellfixierung für TUNEL-Test und DAPI-Färbung

Eine Zellsuspension von $2 \cdot 10^5$ Zellen wurde mit 4%-iger Paraformaldehydlösung versetzt und für 30 min leicht schwenkend bei RT inkubiert. Der Überstand der sich anschließenden Zentrifugation (400 g, 10 min, 5°C) wurde verworfen und das Pellet in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1/5 des vorherigen Waschvolumens an PBS (200 μl) resuspendiert. Davon wurden 50 μl für die DAPI-Färbung (siehe unten) abgenommen und auf Polylysin beschichtete Objektträger aufgetragen. Der Rest der Zellsuspension wurde nochmals zentrifugiert und für den TUNEL-Test verwendet (siehe unten).

DAPI-Färbung

Für die DAPI-Färbung wurde die DAPI-Stammlösung (1 mg/ml) 1:1000 in PBS (Tabelle 2-III) verdünnt. Mindest. 25 μl der Zellsuspension wurden in die Vertiefungen des Objektträgers pipettiert, für 10 min bei RT inkubiert und der Überstand anschließend vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach mikroskopischer Überprüfung des Zellrasens und ggf. Auftragen weiterer Zellen wurde mit 50 μl PBS pro Vertiefung gewaschen und dann dasselbe Volumen an 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI-Lösung aufgetragen und etwa 1 h

in einer feuchten dunklen Kammer bei RT inkubiert. Die überschüssige Färbelösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor die Zellen mikroskopiert und fotografiert wurden.

TUNEL-Test

Für den TUNEL-Test wurde der "*In situ Cell Death Detection Kit, AP*" entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dazu musste die Membran der Zellen für Substanzen durchlässig gemacht werden. In Optimierungstests wurde ermittelt, dass für die Permeabilisierung der Glioblastomzellen eine 10-minütige Inkubation bei RT in PBS mit 0.1% Natriumcitrat und 0.1% Triton X-100 notwendig ist. Das Pellet der fixierten Zellen wurde in 200 µl Permeabilisierungslösung resuspendiert und wie beschrieben inkubiert. Der Permeabilisierungsvorgang wurde in 1 ml eiskaltem PBS verlangsamt und die Zellen sofort bei 4°C 10 min lang zentrifugiert. Nach ihrer Resuspension in ~ 50 µl PBS wurden die Zellen auf entsprechend vorbereiteten Objektträgern an Poly-L-Lysin gebunden (10 min Inkubation bei RT).

Als Positivkontrolle diente ein Zellansatz, der für 10 min bei RT mit 50 µl DNase I (3 U/ml) behandelt und dann in die *wells* der Objektträger pipettiert wurde. Der Überstand aller Ansätze wurde mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der mit 50 µl Markierungslösung ohne terminale Desoxyribonukleotidyltransferase versetzt wurde, wobei alle anderen Ansätze den kompletten TUNEL-Reaktionsmix mit dUTP Nukleotiden und Transferase (50 µl) erhielten. Die Objektträger wurden in einer feuchten dunklen Kammer bei 37°C 1 h inkubiert und anschließend durch dreimaliges Waschen in PBS für die anschließende Markierung vorbereitet. Nach Zugabe von 50 µl Converter-AP (mit Alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Fluoreszein Antikörper, *Sheep Fab-Fragment*) pro Vertiefung wurde der Objektträger in einer dunklen feuchten Kammer bei 37°C für 30 min inkubiert. Der Objektträger wurde dreimal mit PBS gewaschen und dann mit der Substratlösung NBT/BCIP versetzt (10 min, RT). Die überschüssige Substratmenge wurde durch Waschen entfernt und der Objektträger unter Zugabe von *Vectashield-Mounting Medium* für die Lichtmikroskopie präpariert.

Annexin V-Assay

Die Untersuchung auf Externalisierung des Phosphatidylserin als frühapoptotischer Marker wurde mit dem "*AnnexinV-FLUOS Staining Kit*" nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Eine Suspension von $1 \cdot 10^6$ Zellen wurde in PBS gewaschen und anschließend für 5 min bei 200 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Annexin-V-FLUOS Markierungslösung (mit Annexin-V-FLUOS Reagenz, HEPES Inkubationspuffer, 1 µg/ml Propidiumiodid) resuspendiert und für 10-15 min bei 15-25°C in einer dunklen Kammer inkubiert. Anschließend standen die Proben für Fluoreszenzmikroskopie und Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) zur Verfügung. Für letztere Analyse wurden die Ansätze mit je 10^6 Zellen mit 400 µl Inkubationspuffer versetzt und in einem entsprechend kalibrierten Durchflußzytometer analysiert (488 nm Exzitationswellenlänge, 515 nm Bandpassfilter zur Fluoreszenzdetektion, Filter > 600 nm zur Propidiumiodid-Detektion).

2.2.6.2 Phosphol-Komplexe

Die Phospholverbindungen **1-4** wurden von Prof. Régis Réau, Universität Rennes synthetisiert und mittels NMR analysiert (Fave *et al.*, 2003; Fave *et al.*, 2004; Leca *et al.*, 2004). Triphenylphosphin-Gold(I)chlorid (**5**) wurde käuflich erworben und diente als Vergleichssubstanz. Die Verbindungen **6** und **7** aus früheren Studien (Irmeler *et al.*, 2002) standen ebenfalls als Vergleichssubstanzen zur Verfügung.

Die Inhibitorstudien an der hTrxR und ihren Varianten sowie an der hGR umfassten zeitabhängige Inaktivierungsversuche, Hemmtyp- und Hemmkonstantenbestimmungen sowie Untersuchungen zur Reversibilität der Hemmung. Ebenso sollte versucht werden, einen Enzym-Inhibitor-Komplex zu kristallisieren.

Tabelle 2-XIII: Namen, Strukturformeln und Molekulargewicht von Triphenylphosphin-Goldchlorid und der verschiedenen Phosphol-Komplexe.

Name	Verbindung	M _w [g/mol]	Strukturformel
1	[1-Phenyl-2,5-di(2-pyridyl)phosphol]gold(I)chlorid	600.4	
2	[1-Phenyl-2-(2-pyridyl)-5-(2-thienyl)phosphol]gold(I)chlorid	605.4	
3	[1-Phenyl-2,5-di(2-pyridyl)phosphol]dichlorplatin(II)	633.96	
4	[1-Phenyl-2-(2-pyridyl)-5-(2-thienyl)phosphol]dichlorplatin(II)	638.96	
5	[PPh ₃ AuCl], (Triphenylphosphin)gold(I)chlorid	494.72	
6	1-Phenyl-2,5-di(2-pyridyl)phosphol	368.0	
7	1-Phenyl-2-(2-pyridyl)-5-(2-thienyl)phosphol	373.0	

Die Inaktivierung der hTrxR erfolgte wie bereits beschrieben (Abschnitt 2.2.6.1.1) und wurde im Trx- und DTNB-Assay, die Inaktivierung der hGR wurde im GSSG-Reduktionsassay (Abschnitt 2.2.3.2.4) am Photometer verfolgt.

Zur Bestimmung der halbmaximalen Enzymhemmung ($i_{0.5}$) wurden Wildtyp-hTrxR (4.8-24 nM UE), hTrxR-Mutanten (0.1-1.8 μ M UE) bzw. hGR (1.4 nM UE) mit NADPH (100-200 μ M) und Inhibitor (0.5-500 nM bzw. 1-40 μ M) 10 min bei 25°C inkubiert. Dann wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von Trx (20 μ M), DTNB (3 mM) oder GSSG (100 μ M) bestimmt. Die Hemmtypbestimmung erfolgte in analoger Weise wie in Abschnitt 2.2.6.1.1 beschrieben, ergänzt durch K_M -Bestimmungen für GSSG. Die Ansätze der Inhibitorkinetik wurden mindestens in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Um die Irreversibilität der Hemmung der TrxR zu bestimmen, wurden 250 nM UE-Plazenta-TrxR mit 200 μ M NADPH in Anwesenheit von 1-10 μ M Inhibitor oder ohne Inhibitor für 10 min inkubiert. Diese Ansätze wurden anschließend mit oder ohne *British-Anti-Lewisite* (BAL, 2,3-Dithiopropyl) für weitere 20 min inkubiert und dann über Gelfiltrationssäulen (Sephadex G-25) entsalzt. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden auf TrxR-Restaktivität untersucht.

Kristallisationsversuche wurden mit der humanen Glutathionreduktase und den Verbindungen **1** und **3** durchgeführt. Die GR (50 μ g/ml) wurde mit NADPH (100 μ M) reduziert und bis zur vollständigen Hemmung mit 20 μ M Inhibitor **1** und 1 mM Inhibitor **3** für 20 min bei 25°C inkubiert. Die hGR-Inhibitor-Mischung wurde von überschüssigem freien Inhibitor durch mehrmaliges Waschen im Centriprep30 entfernt und anschließend auf eine GR-Konzentration von 20 mg/ml eingestellt. Diese konzentrierte Lösung konnte für die Kristallisation mittels der *hanging drop*-Methode (Abschnitt 2.2.7.1) eingesetzt werden. Als Reservoir dienten 800 μ l einer 720 mM konzentrierten Ammoniumsulfatlösung in Phosphatpuffer (100 mM KP, pH 7.5). Die GR-Lösung wurde mit 120 mM Ammoniumsulfat-Phosphatpufferlösung auf 10 mg/ml verdünnt und in einem Volumen von 5 μ l als hängenden Tropfen im Kristallisationsprozeß (siehe folgenden Abschnitt) eingesetzt.

2.2.7 Kristallisation der humanen Thioredoxinreduktase

Die Proteinkristallisation kann nicht definitiv determiniert werden, sondern ist hauptsächlich ein *trial and error* Prozess, in dessen Verlauf das Protein langsam aus seiner Lösung präzipitiert. Dabei können verschiedene Parameter wie Puffer und damit Ionenart und -stärke, Temperatur, pH-Wert, Proteinkonzentration, Verunreinigungen sowie organische Lösungsmittelzusätze einen Einfluss auf den Kristallisationsprozess haben. Anhand von sog. Screeningexperimenten können günstige Bedingungen für das Kristallwachstum selektiert und durch Modifikation einzelner Parameter das Ergebnis der Kristallisation optimiert werden.

2.2.7.1 Die Hangig drop-Wasserdampf-Diffusionsmethode

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kristallisation der Thioredoxinreduktase und Glutathionreduktase ausschließlich mittels der *hanging drop*-Methode nach dem Prinzip der Wasserdampfdiffusion durchgeführt. Hierfür wurden auf Deckgläschen Tropfen bestehend aus 2-5 μ l Proteinlösung mit dem selben Volumen an Präzipitanlösung vorbereitet. Das Deckgläschen wurde umgekehrt über eine am Rand silikonisierte Vertiefung einer 24-Loch-Kristallplatte gelegt und luftdicht abgeschlossen. In den Vertiefungen befanden sich bereits

0.5-1 ml der Reservoir(Präzipitans)-Lösung. So konnte der Wasserdampf im Laufe der Zeit aus dem Proteintropfen in Richtung Reservoir diffundieren, da die Präzipitanskonzentration im *hanging drop* nur halb so hoch wie im Reservoir war. Durch die Volumenverringerung und die dadurch bedingte Konzentrationserhöhung bis zur Übersättigung des Proteins sollte die Kristallbildung begünstigt werden.

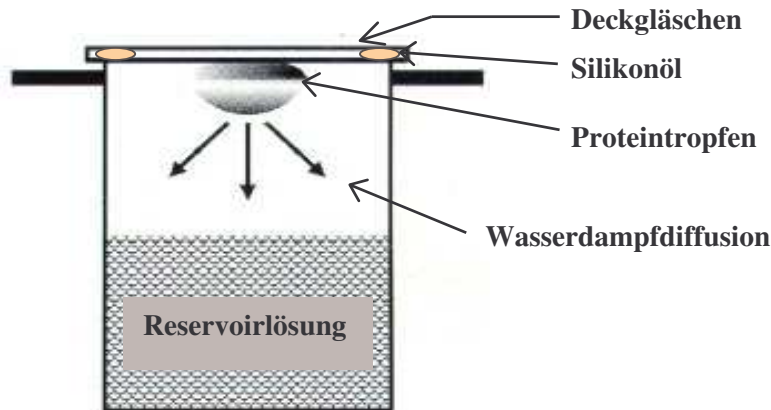


Abb. 2.6: Schematische Darstellung eines Kristallisationsansatzes nach der *hanging drop*-Methode.

Die Screeningexperimente erfolgten mit Hilfe von zwei *Crystal Screen*-Kits (Tabelle 2-IV), bestehend aus je 48 Lösungen mit unterschiedlichen Puffern und Präzipitantien oder durch Variation der Kristallisationsbedingungen für die Cysteinmutante der murinen Thioredoxinreduktase (Zhong *et al.*, 2000). Für die Kit-Ansätze wurde eine Lösung der rekombinanten TrxR dreimal 30 min gegen frischen TE-Puffer dialysiert und aufkonzentriert. Die frisch aufgereinigte native TrxR aus Plazenta lag bereits in TE-Puffer vor. Für die Kristallisationsansätze wurden 600 μ l Screeninglösung mit 200 μ l bidestilliertem Wasser als Reservoirelösung gemischt und davon 2 μ l im Tropfen mit 2 μ l der Proteinlösung vermischt.

2.2.7.2 Optimierung der Kristallisation

Die Bedingungen, die in den Screeningexperimenten zur Entstehung von Kristallisationskeimen führten, wurden weiter verfeinert. Eine Möglichkeit war das Einbringen zusätzlicher Nährlösungen aus Zuckern und/oder Aminosäuren aus einem sog Additiva-Kit, um die Kristallkeime zum Wachstum anzuregen. Zur weiteren Optimierung wurde die Proteinkonzentration im Tropfen variiert, das Präzipitans-Wasserverhältnis sowie das Tropfenvolumen bei Substratzugabe verändert. Einige Ansätze mit Pufferbedingungen für die Kristallisation der hTrxR-Cysteinmutante (50 mM KP, mit und ohne 20% w/v PEG, mit und ohne NADPH bzw. NADP⁺) wurden im pH-Bereich 7-9 variiert. Zusätzlich wurden zu einigen Ansätzen mit NADPH-reduzierter TrxR Thioredoxin im dreifachen molaren Überschuss zugegeben und das Tropfenvolumen auf insgesamt 6 μ l erhöht (3 μ l TrxR_{red.} + 2 μ l Reservoir + 1 μ l Trx). Die Kristallplatten wurden bei 4°C, RT und 30°C gelagert und der Kristallbildungsprozess beobachtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 *Optimierte Reinigung der Thioredoxinreduktase*

3.1.1 *Rohmaterial und Vorbereitung*

Die erste Säuger-Thioredoxinreduktase wurde bereits 1982 aus Rattenleber isoliert (Luthman and Holmgren, 1982). Daraufhin folgten Reinigungen aus humaner Plazenta (Oblong *et al.*, 1993) sowie humanen Tumorgeweben wie Lungenadenokarzinomen (Schallreuter and Wood, 1988) und Melanomen (Tamura and Stadtman, 1996). Die Plazenta hat sich hinsichtlich Verfügbarkeit und Ausbeute als das beste Gewebe erwiesen (Gromer *et al.*, 2002), welches im Gegensatz zu den anderen Geweben in der Regel ohne operativen Eingriff zu erhalten ist. Eine Zustimmung der Bioethikkommission über die Verwendung der Plazenten für biomedizinische Forschungszwecke liegt vor; die Sicherheitsschutzauflagen für das Arbeiten mit potentiell kontagiösem humanem Material wurden eingehalten.

Die Plazenta dient dem Austausch von Stoffwechselprodukten und Gasen zwischen dem mütterlichen und fetalen Blut sowie als endokrine Drüse und beinhaltet daher eine Vielzahl verschiedenster Proteine und Enzyme. Die Enzymaufarbeitung aus solchen blutreichen stoffwechselaktiven Geweben gestaltet sich daher oft schwierig und bedarf genauer Vorbereitung. Im Laufe der Zeit fand aufgrund von Erfahrungswerten immer wieder eine Optimierung statt. Dies gilt in besonderem Maße für den Zweck der Kristallisation der TrxR.



Abb. 3.1: Fötus in der Fruchtblase, der von der mütterlichen Plazenta über die Umbilicalgefäße mit Nährstoffen versorgt wird.

Die Plazenten wurden nach Erhalt in der Geburtsklinik direkt einzeln in Plastikbeutel verpackt und unzerkleinert mit Nabelschnur und Amnion¹¹ bei -80°C tiefgefroren, um ihren natürlichen Zustand zu erhalten.

3.1.2 *Chloroform-Butanol-Extraktion und Acetonpräzipitation*

Durch das Zerkleinern der in warmem Wasser kurz angetauten Plazenten kann der für Proteine schädliche Auftauvorgang deutlich verkürzt werden. Die anschließende Homogenisation des Gewebematerials erfolgte unter Zugabe des Serinproteaseinhibitors PMSF und des Metallchelators EDTA, um die Proteine vor Degradation durch Serin- und Metalloproteasen zu schützen. Da ein neutraler bis leicht alkalischer pH-Wert vor Aspartatproteasen schützt und viele Proteine in alkalischem Milieu stabiler gegenüber organischen Lösungsmitteln sind, wurde das Plazentahomogenat vor der Chloroform-Butanol-Extraktion auf pH 8.3 eingestellt. Die Temperatureinhaltung um die 4°C ist ebenso wichtig, um den Aktivitätsverlust der Proteine zu minimieren. Das Lösungsmittelgemisch bewirkt die Lyse der Zellmembran und setzt die gesamten zytosolischen Enzyme frei. Es kommt gleichzeitig zur Denaturierung von Hämoglobin, anderen störenden Proteinen und Mikroorganismen. Durch die Rehomogenisierung des abzentrifugierten Proteinpellets kann die Ausbeute um 10 - 20%

¹¹ Amnion = Haut um die Leibesfrucht, im Stadium der zweikeimblättrigen Keimscheibe zwischen Trophoblast und Ektoderm entstehende Zellschicht, die zusammen mit dem Ektoderm des Embryos die Amnionhöhle bildet (aus Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, Berlin: de Gruyter, 1998).

gesteigert werden. Es ist an dieser Stelle zu vermerken, dass durch den Zellaufschluss sowohl die zytosolische als auch die mitochondriale TrxR freigesetzt werden. Die mitochondriale TrxR wurde allerdings nicht durch eine entsprechende fraktionierte Zentrifugation abgetrennt (Ejima *et al.*, 1999), da sie bei chromatographischen Trennverfahren ein anderes Verhalten aufweist (Rigobello *et al.*, 1998). Man kann davon ausgehen, dass ihr Anteil in der TrxR-Probe nach der Aufreinigung gering ist. Da der Extraktionsüberstand mit enthaltender TrxR zunächst in einem großen Volumen vorlag und noch Lösungsmittel enthielt, die die Bindung an das DEAE-Säulenmaterial stören konnten, war der Acetonpräzipitationsschritt als Reinigungs- und Konzentrationsschritt notwendig. Ein Optimierungsschritt stellte die durchgeführte Ultrazentrifugation dar, die zu einer klaren und homogenen Proteinlösung führte.

3.1.3 DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie

Das in diesem Schritt eingesetzte Säulenmaterial enthält positiv geladene Diethylaminoethylgruppen, die über einen weiten pH-Bereich protoniert vorliegen. Die bei pH 7.6, dem Säulen-pH-Wert nach Äquilibrierung, vorliegenden kationischen Proteine können somit abgetrennt werden.

Nach dem Auftrag des acetongefällten Dialysats war die DEAE-Säule den verschiedenen Gemischen an Häm- und Nicht-Hämproteinen entsprechend bandenförmig von rot bis tiefbraun gefärbt (Abb. 3.4 b). Die Hauptfraktion der TrxR eluierte in einer tiefroten Bande und konnte in ihrer Hauptaktivität von der etwas früher eluierenden GR getrennt werden.

3.1.4 2',5'-ADP-Sepharose-Affinitätschromatographie

Diese Art der Affinitätschromatographie dient speziell der Reinigung pyridinnukleotid-abhängiger Proteine und eignet sich daher für die TrxR mit NADPH als Cofaktor. Beim 2',5'-ADP-Sepharose 4B-Säulenmaterial ist das mit Diaminohexan über das N6-Atom gebundene 2',5'-ADP an Sepharose 4B immobilisiert. Die Proteinbindung erfolgt spezifisch bei neutralem pH-Wert. Zur Vermeidung unspezifischer Interaktionen wird eine Ionenstärke von mindestens 150 mM Salz empfohlen.

Da die Proteinlösung durch den vorhergehenden Schritt bei pH 7.6 größtenteils von den positiv geladenen Proteinen getrennt vorlag, waren unspezifische Bindungen nicht-pyridinnukleotidabhängiger Proteine bei diesem pH-Wert und einem Waschschrift bei höherer Ionenstärke kaum zu erwarten. Spezifisch, doch weniger fest gebundene NAD(H)-abhängige Proteine wurden durch das Waschen mit NADH-haltigem Puffer von ihrer Bindungsstelle kompetitiv verdrängt. Dies geschah ebenso mit spezifisch gebundenen NADP(H)-abhängigen Proteinen unter Ausnutzung der unterschiedlichen Affinitäten während eines NADP⁺-Stufengradienten. Es zeigte sich auf einem anschließenden SDS-Gel, dass die Hauptaktivität der TrxR bereits unter den Fraktionen mit mittlerer NADP⁺-Konzentration von 300 µM zu finden war (Abb. 3.3 b). Die Reinheit des Proteins wird zu diesem Zeitpunkt auf etwa 90% geschätzt.

3.1.5 Gelfiltration-Molekulargewichtschromatographie an der FPLC-Anlage

Noch verbleibende Verunreinigungen wurden mittels Gelfiltration abgetrennt. Es erfolgte eine Modifikation zu früheren Aufreinigungen, da die Proteinlösung vor dem Auftrag mit DTT reduziert wurde. Dadurch erhoffte man sich eine homogenere Proteinlösung, zumal bekannt

war, dass die Cysteine in den aktiven Zentren der TrxR (Cys59, Cys64, Cys497 und Cys498 bzw. Sec498) durch die Reduktion mit DTT zugänglich werden (Zhong *et al.*, 2000a) und angenommen wird, dass der flexible C-terminale Arm nach Reduktion eine dem Lösungsmittel exponierte Stellung einnimmt (Gromer *et al.*, 1998) (Abb. 1.5).

Durch Gelfiltrationsläufe mit verschiedenen DTT-Gehalten im Puffer stellte sich heraus, dass es bei DTT-Konzentrationen von mehr als 2 mM zu einer klaren Trennung der Peakfraktionen kommt und eine Unterscheidung zwischen Monomer und Dimer möglich ist.

3.1.6 Reduzierende und nicht-reduzierende Gelfiltration, Elutionsprofile

Die Gelfiltrationsläufe der aus Plazenta isolierten Proteinlösung mit mehr als 90% reiner TrxR wurden als letzte Reinigungsschritte verwendet und der Einfluss des Reduktionsmittels DTT auf das Laufverhalten und den Reinigungserfolg getestet. Bei der reduzierenden Gelfiltration wurden dem Laufpuffer 2, 4 oder 10 mM DTT zugegeben, um der zuvor gleichermaßen mit DTT reduzierten TrxR einheitliche Bedingungen während des zwei- bis dreistündigen FPLC-Laufs zu gewährleisten. Die Elutionsprofile zeigten den verschiedenen DTT-Konzentrationen entsprechende Verschiebungen zwischen TrxR-Monomer- und Dimergehalt auf. Da alle Elutionsprofile mehrere Peaks aufwiesen, mussten die Fraktionen nach Aufkonzentrierung auf DTNB-Reduktionsaktivität überprüft werden, um die TrxR-Peakfraktionen eindeutig zuzuordnen. Es erfolgte auch ein Vergleich der Fraktionen auf einem SDS-Gel (Abschnitt 3.1.7).

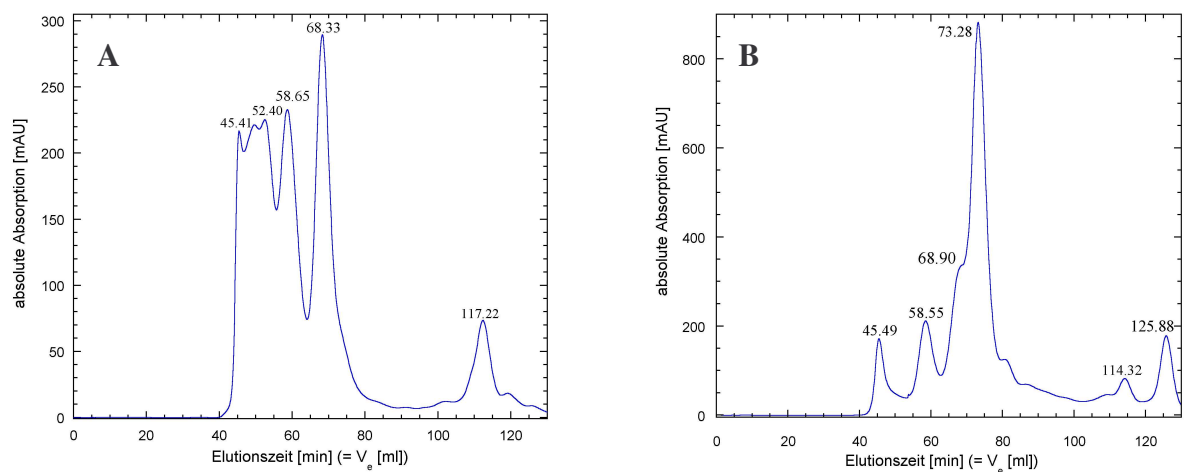
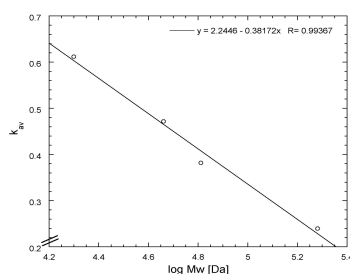
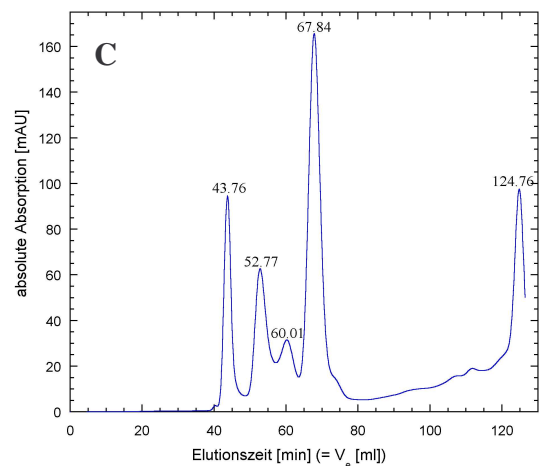


Abb. 3.2: Oxidierende (A) und reduzierende (B, C) Gelfiltration der Plazenta-Proteinfraktion mit TrxR. (A) Das Elutionsvolumen V_e von 68.33 ml entspricht der stärksten TrxR-Bande auf dem SDS-Gel (vgl. Abb. 3.3). (B) Die mit 4 mM DTT reduzierte TrxR eluiert in der stärksten Peakfraktion bei $V_e = 73.28$ ml. (C) Die TrxR eluiert in Anwesenheit von 10 mM DTT bei $V_e = 67.84$ ml in ihrer Hauptaktivität. Die absoluten Absorptionen hängen mit den verschiedenen Auftragsmengen zusammen.



Kalibrierungsgerade der Superdex 200-Gelfiltrations-säule: Verwendete Eichproteine (von oben nach unten): Aldolase (191 kDa), Albumin (64.7 kDa), Ovalbumin (45.8 kDa), Chymotrypsinogen (19.9 kDa)



Die theoretische Masse der FAD-haltigen TrxR aus Plazenta beträgt 55.2 kDa pro Unter-einheit. Die im Rahmen der Gelfiltration bestimmte apparente Molekülmasse der TrxR-Peakfraktion beträgt 113.8 kDa (Abb. 3.2 A, Peak bei $V_e = 68.33$ ml), 76.6 kDa (Abb. 3.2 B, Peak bei $V_e = 73.28$ ml) bzw. 118.4 kDa (Abb. 3.2 C, Peak bei $V_e = 67.84$ ml). Die Elutionsprofile der oxidierenden und reduzierenden Gelfiltration unterscheiden sich deutlich, mit einer besseren Auftrennung bei steigenden Konzentrationen an Reduktionsmittel. Die Ergebnisse aus früheren Gelfiltrationsstudien mit oxidiertem TrxR aus humaner Plazenta konnten bestätigt werden, die ebenfalls Dimer-Molekulargewichte mittels Gelfiltration (160 kDa) ermittelten, aber auch die teilweise Dissoziation in Monomerspezies beschrieben (Oblong *et al.*, 1993). Interessanterweise erhält man einen eindeutigen Monomerpeak nur bei niedrigeren DTT-Konzentrationen (2-4 mM).

3.1.7 Reinheitsüberprüfung der Präparation, SDS-PAGE

Um die Reinheit der TrxR zu überprüfen und die Unterschiede in den Chromatogrammen aufzuklären, wurde eine reduzierende SDS-PAGE durchgeführt.

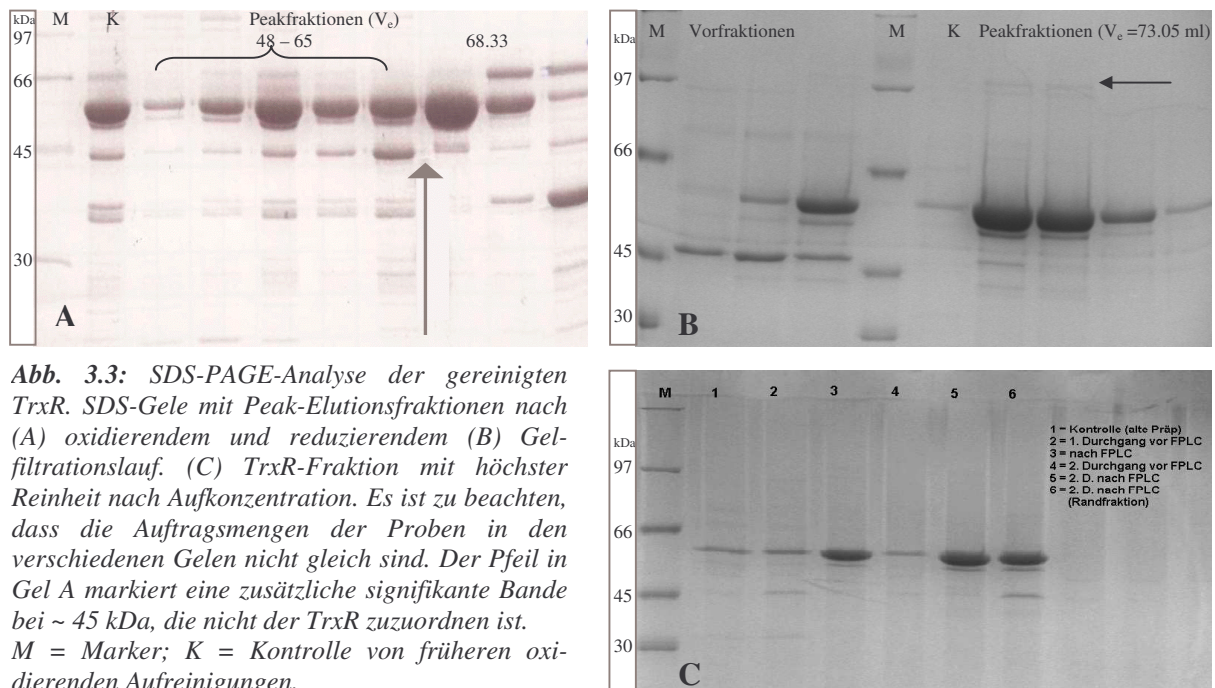


Abb. 3.3: SDS-PAGE-Analyse der gereinigten TrxR. SDS-Gele mit Peak-Elutionsfraktionen nach (A) oxidierendem und reduzierendem (B) Gelfiltrationslauf. (C) TrxR-Fraktion mit höchster Reinheit nach Aufkonzentration. Es ist zu beachten, dass die Auftragsmengen der Proben in den verschiedenen Gelen nicht gleich sind. Der Pfeil in Gel A markiert eine zusätzliche signifikante Bande bei ~ 45 kDa, die nicht der TrxR zuzuordnen ist. M = Marker; K = Kontrolle von früheren oxidierenden Aufreinigungen.

Die TrxR konnte in allen SDS-Gelen anhand ihres Monomermolekulargewichts identifiziert werden. Deutlich höhere Banden (> 97 kDa) konnten bei größeren Protein-Auftragsmengen beobachtet werden. Diese können stabilen Dimerbanden zugeordnet werden, da sie sich nicht durch Reduktion und Denaturierung im Rahmen der SDS-PAGE entfernen lassen. Insgesamt war der Reinigungseffekt nach der reduzierenden Molekulargewichts-Chromatographie deutlich besser und die TrxR in wenigen Fraktionen konzentriert mit einer Reinheit von mehr als 95%.

3.1.8 Gesamtübersicht über die Präparation

3.1.8.1 Bildliche Dokumentation der präparativen Schritte

a)



b)

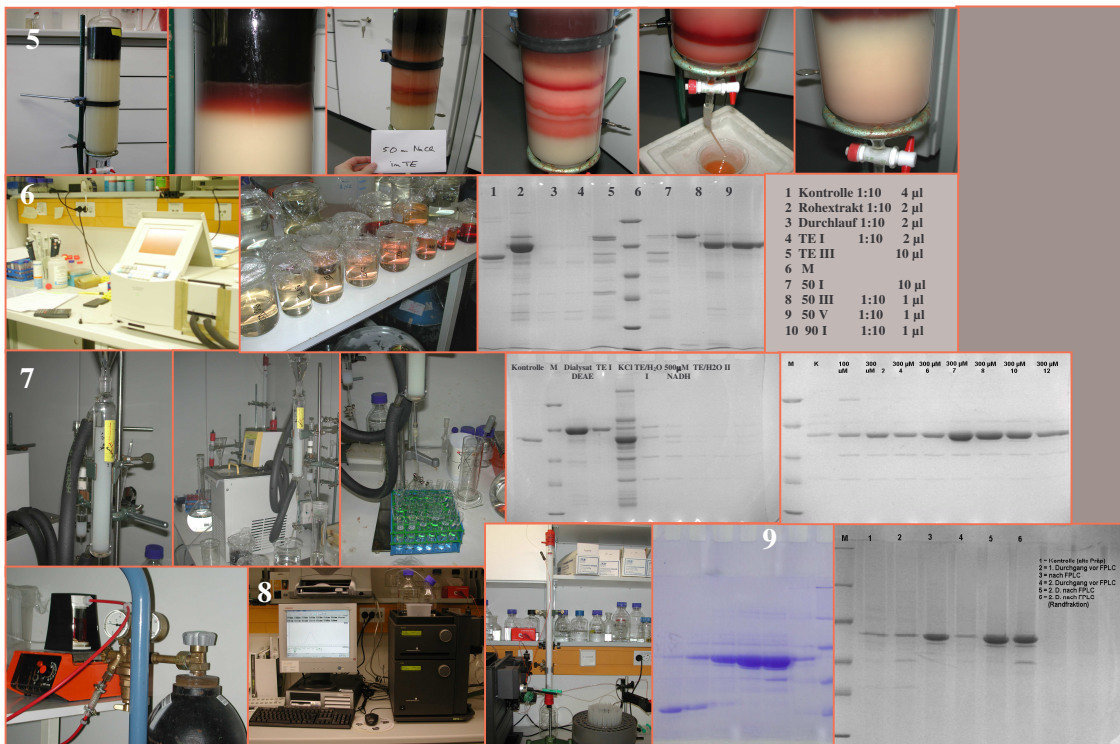


Abb. 3.4: a) Vorbereitung des Materials¹, Extraktionen², Dialyse³, Vorbereitung der DEAE-Säule⁴
 b) DEAE-Ionenaustauschchromatographie⁵, Aktivitätsmessungen⁶,
 2'5'-ADP Sepharose-Affinitätschromatographie⁷, Gelfiltration (FPLC)⁸ und SDS-PAGE⁹

3.1.8.2 Ausbeutetabelle

Tabelle 3-I: Tabelle der bei einzelnen Präparationsschritten bestimmten Parameter einschließlich der relativen Gesamtausbeute. Die Angaben beziehen sich auf eine Menge von 8500 g Plazenta (entspricht dem Gewicht von 17 Plazenten mit jeweils 500 g Durchschnittsgewicht). Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Aktivitäten im DTNB-Assay gemessen; U = units [$\mu\text{mol min}^{-1}$], * verschiedene Fraktionen, Ø durchschnittlich.

	Volumen [ml]	Gesamt- protein [g]	Protein- konzent- ration [mg/ml]	Gesamt- aktivität [U]	Volumen- aktivität [U/ml]	Spezi- fische Aktivität [U/mg]	Schritt- Ausbeute [%]	Gesamt- ausbeute [%]
Dialysat der Aceton- fällung	2200	79.2	36	1366.2	0.62	0.017	100	97
DEAE- Pool	1980	33.7	17	1035	0.47	0.028	76	75
2'5'-ADP Sephrose- Pool	8	40	* Ø 4	491.2	61.4	15.4	47.5	36
Superdex 200-Pool	* 4 x 0.7	17.8	* 4-17	* Ø 300	* 222.1 (DTNB)	13.1 (DTNB) 18.4 (Trx)	61	22

3.2 Charakterisierung verschiedener rekombinanter Mutanten der eukaryotischen Thioredoxinreduktase

Die oben beschriebene Gewebereinigung stellte im Rahmen dieser Promotionsarbeit die einzige Möglichkeit dar, die authentische, selenhaltige Thioredoxinreduktase zu erhalten. Alle Mutanten, die in kinetischen und kristallographischen Studien zum Einsatz kamen, wurden rekombinant hergestellt und waren nicht selenhaltig (Selenocystein durch Cystein ersetzt oder ganz deletiert). In diesem Kapitel werden die Mutanten genauer charakterisiert, während im nächsten Kapitel (Abschnitt 3.3) ihre Eigenschaften denen der Plazenta-TrxR gegenübergestellt werden.

3.2.1 Optimierung der Herstellung rekombinanter Thioredoxinreduktasen

Bei der rekombinanten Herstellung von Mutantenproteinen können häufig Fehlfaltungen vorkommen und daher liegt stets ein gewisser Anteil an schlecht löslichem Protein vor.

Nach der erfolgreichen Klonierung lagen die verschiedenen TrxR-Mutanten (Abschnitte 2.2.1.1-2.2.1.2) zunächst im pQE30-Expressionsvektorsystem mit T5-Promotor vor. Dieses Expressionsystem in *E. coli* M15-Zellen war bzgl. der Ausbeute nicht sehr effektiv (Abb. 3.5 A zeigt die Aufreinigung der hTrxR Δ 16). Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das stärkere *high level*-pET-System und *E. coli* BL21-Zellen verwendet, die Expressionsbedingungen optimiert (Tabelle 2-X) und der Zellaufschlusspuffer mit 2% Triton versetzt.

Neben den humanen TrxR-Mutanten wurden im Rahmen eines Teilprojektes zwei murine TrxR-Mutanten (rTrxR Δ 16, rTrxR Δ 16^{I478E}) im pET-BL21-Expressionssystem hergestellt. Die Ausbeute der murinen TrxRs war mit 10-20 mg pro Liter Zellkultur bis zu einem Faktor 4 höher als die der entsprechenden humanen Proteine. Auch war der Anteil an unlöslichem Protein (Pellet) um bis zu 25% niedriger.

Die Cysteinmutante der hTrxR (hTrxR^{U498C}) wurde nach Optimierung in löslicher Form in Mengen von bis zu 10 mg pro Liter Zellkultur erhalten (Abb. 3.5 B).

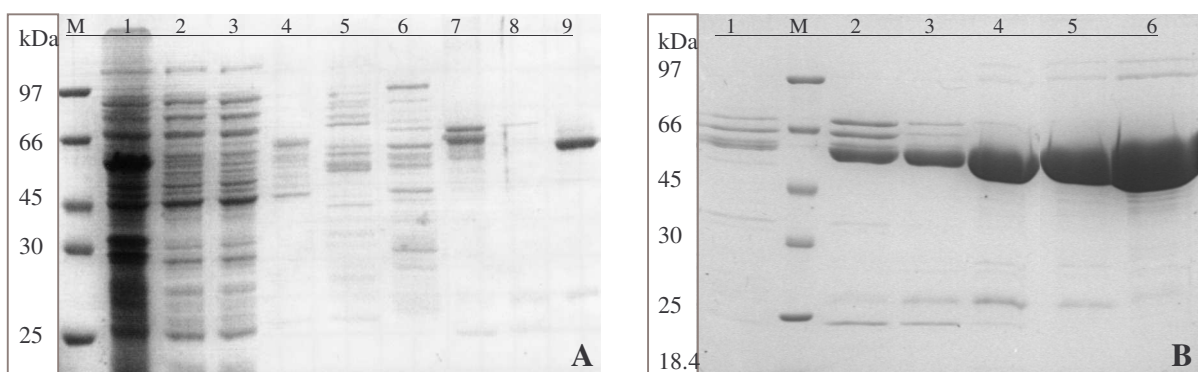


Abb. 3.5: Analyse der Reinigung rekombinanter TrxRs. Die SDS-Gele zeigen die einzelnen Eluate. (A) Aufreinigung der hTrxR Δ 16: M Marker, 1 Pellet, 2 Auftrag, 3 Durchlauf, 4 Waschfraktion, 5-8 10-50 mM Imidazol, 9 Elution mit 75 mM Imidazol; (B) Aufreinigung der hTrxR^{U498C}: M Marker; 1-2, 75, 3-4, 100; 5-6, 150 mM Imidazol.

3.2.2 Die Selenocystein → Cystein Mutante

Die heterologe Expression und Reinigung der hTrxR ohne Selenocystein führen entgegen früherer Annahmen (Bar-Noy *et al.*, 2001; Gasdaska *et al.*, 1995) zu einem aktiven, FAD in stöchiometrischen Mengen enthaltenden Enzym. Wie bereits im Abschnitt 1.1.1.1.2 erwähnt, führt der Austausch des Selenocysteins gegen Cystein in der C-terminalen *active site* dennoch zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Dies ist u.a. in dem größeren Kovalenzradius des Selen und damit in einem besseren Bindungszustand innerhalb des Selenylsulfids begründet. Werte von 1-11% Restaktivität sind in der Literatur für die rTrxR^{U498C} beschrieben und konnten im Rahmen dieser Arbeit für die hTrxR^{U498C} bestätigt werden. Ebenso ergaben Absorptionmessungen den typischen FAD-Peak bei 463 nm und spektrale Untersuchungen die für den *charge-transfer*-Komplex typische Absorptionzunahme bei 540 nm.

Die murine Cysteinmutante der TrxR (rTrxR^{U498C}) und andere *active site*-Mutanten der rTrxR sowie der DmTrxR wurden bereits charakterisiert (Bar-Noy *et al.*, 2001; Fujiwara *et al.*, 2001; Gromer *et al.*, 2003; Zhong and Holmgren, 2000). In Anlehnung an die Arbeiten mit den Mutanten sollten für die in dieser Arbeit verwendete hTrxR^{U498C}-Mutante die verschiedenen Charakteristika bestimmt und durch weitere Untersuchungen ergänzt werden. Dies war essentiell, da die hTrxR^{U498C} als Vergleichsmodell in den kinetischen (Inhibitor)Studien diente und in Kristallisations- und Zellkulturexperimenten zum Einsatz kam.

Anhand von kinetischen Parametern aus *steady-state*-Kinetiken lassen sich allgemeine Aussagen zur Substratspezifität und Substrataffinität ableiten, die für spezielle Inhibitorinetiken von Bedeutung sind. Die *turnover number* k_{cat} [min^{-1}], definiert als die Anzahl Mole an Substrat, die pro Minute und Mol katalytischem Zentrum des Enzyms unter optimalen Bedingungen umgesetzt wird, kann darüber hinaus bestimmt werden. Im kinetischen Optimum k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] wird die Katalysegeschwindigkeit des Enzyms nur durch die Geschwindigkeit beschränkt, mit der es in der Lösung seinem Substrat begegnet (Diffusionsgeschwindigkeit). Die K_M - und V_{max} -Werte verschiedener Substrate der hTrxR^{U498C} wurden anhand nicht-linearer Regression ermittelt sowie die zugehörigen k_{cat} - und k_{cat}/K_M -Werte der Enzymkatalyse bestimmt. Da die TrxR physiologisch als Dimer aktiv ist und pro Monomer zwei mögliche katalytische Zentren aufweist, wurde ihre Aktivität stets auf die Monomerkonzentration (UE-TrxR, Abschnitt 2.2.3.2) bezogen.

Die Substrateigenschaften der hTrxR-Mutante wurden unter Standardbedingungen bei 25°C getestet (Abschnitt 2.2.3.2). Da die DTNB-Reduktion eine schnelle Reaktion und der Extinktionskoeffizient für das entstehende TNB⁻ relativ hoch ist, kann der DTNB-Assay als sensitive Methode zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der TrxR und damit als Basis für die Berechnung von Enzymeinheiten herangezogen werden. Der K_M -Wert für DTNB der hTrxR^{U498C} liegt mit $700 \pm 180 \mu\text{M}$ im Durchschnitt um den Faktor 7 höher, der k_{cat} -Wert mit $17 \pm 3 \text{ min}^{-1}$ um den Faktor 100 niedriger im Vergleich zur hTrxR aus Plazenta.

Im Gegensatz dazu sind die K_M -Werte für das physiologische Substrat Trx mit $20 \pm 2 \mu\text{M}$ und $13 \pm 2 \mu\text{M}$ für hTrxR^{U498C} bzw. hTrxR aus Plazenta sehr ähnlich, während der k_{cat} -Wert der hTrxR-Mutante mit $10 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ wiederum um den Faktor 100 niedriger ist im Vergleich zur hTrxR aus Plazenta (entspricht den Literaturwerten für die gleichnamige Mutante aus *Rattus norvegicus* (rTrxR), (Fujiwara *et al.*, 2001; Zhong and Holmgren, 2000)). Da für diese und andere *active site*-rTrxR-Mutanten beschrieben wurde, dass sie kein GSSG reduzieren können trotz der sehr ähnlichen N-terminalen *active site* von TrxR und GR, dies aber nicht anhand konkreter Daten belegt wurde (Fujiwara *et al.*, 2001; Zhong and Holmgren, 2000), war es interessant, die GSSG-Reduktion auch an dem humanen Enzym zu überprüfen. Im Substratbereich 0.1-1 mM GSSG kann keine nennenswerte Reduktion beobachtet werden, wohl aber im höheren Substratbereich (10-50 mM) bei 10 μM Enzymeinsatz. Allerdings wird bei der Reaktion von hTrxR^{U498C} mit GSSG keine Substratsättigung erreicht, so dass die kinetischen Parameter K_M und k_{cat} nicht bestimmt werden können. Die Aktivität von 10 μM

hTrxR^{U498C} mit 30 mM GSSG unter TrxR-Assaybedingungen (Abschnitt 2.2.3.2.2) betrug rund 2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Tabelle 3-II). Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit an der hTrxR^{U498C} getestete Substanz war Menadion (Vitamin K3, 2-Methyl-1,4-naphthochinon). Bekannt als interessanter Redoxcyclus und für seine antikanzerogenen Eigenschaften ist Menadion ein potentiell Substrat der TrxR, da das ihm ähnliche Chinonmolekül Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) bereits als solches beschrieben wurde (Cenas *et al.*, 2004). Kinetische Daten für die durch die rekombinant hergestellte rTrxR katalysierte Menadionreduktion sind bereits bekannt ($K_M = 125 \pm 25 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 90 \pm 6 \text{ min}^{-1}$) (Cenas *et al.*, 2004). Die kinetischen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben für die NADPH-reduzierte hTrxR^{U498C} und Menadion eine signifikante (a) und im Vergleich zur hTrxR-Plazenta (b) deutlich höhere Aktivität ((a) $K_M = 83.9 \pm 4.1 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 611.7 \pm 92.5 \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_M = 7.4 \pm 1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ versus (b) $K_M = 33.2 \pm 4.7 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 89.3 \pm 10.5 \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_M = 2.73 \pm 0.06 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft die Kinetik einer Menadionmessung mit der hTrxR^{U498C}.

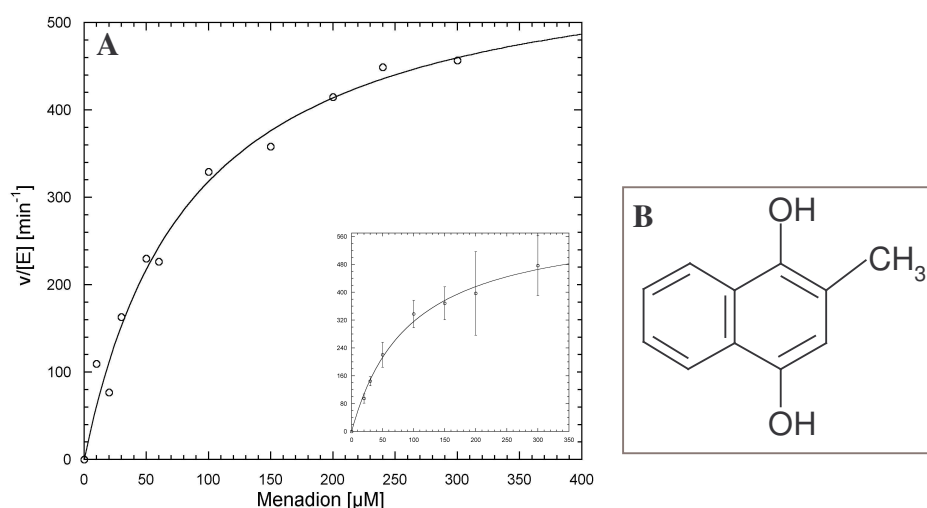


Abb. 3.6: NADPH-vermittelte Menadionreduktion durch die hTrxR^{U498C}. (A) Michaelis-Menten-Plot der Menadionkinetik. Der Quotient aus Geschwindigkeit und Enzymkonzentration wurde gegen die Menadionkonzentration (0-400 μM) aufgetragen und die hyperbole Michaelis-Menten-Kurve mittels nicht-linearer Regression angepasst. Die eingesetzte Grafik beschreibt die durchschnittliche Kinetik mit statistischen Daten. (B) Strukturformel des Hydrochinons von Menadion.

Neben der Substratspezifität sollte auch das spektrale Verhalten der rekombinanten hTrxR^{U498C} mittels NADPH-Titration untersucht werden. Verschiedene Spektren wurden bei 25°C unter aeroben Bedingungen aufgenommen und zeigten den für Flavoenzyme typischen Verlauf mit den beiden Absorptionsmaxima bei ~ 380 und 463 nm sowie der hügeligen Auflösung zwischen 480 und 490 nm . Für die Reduktion des Enzyms zur EH_2 -Form sind mindestens fünf Äquivalente NADPH notwendig. Das Enzym reagiert schnell mit NADPH unter Bildung der für den *charge-transfer*-Komplex charakteristischen Absorptionsbande bei 540 nm (Abb. 3.7), die in den höherwelligen Bereich ausläuft und wieder auf das Ausgangsniveau sinkt. Jede weitere Zufuhr von Elektronen führt wieder zur Reduktion des Flavins zum FADH_2 , der Auflösung des *charge-transfer*-Komplexes.

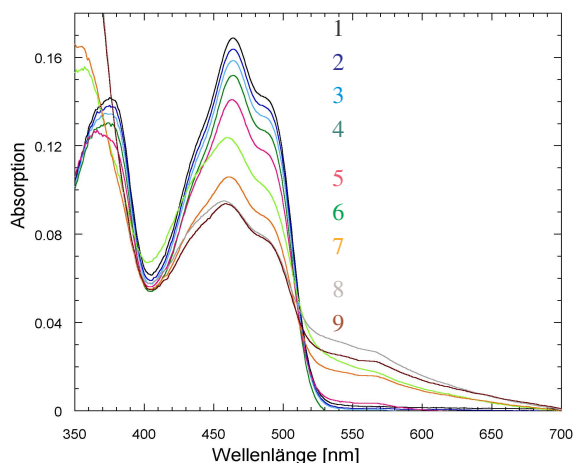


Abb. 3.7: Absorptionsspektren der Titration von $15 \mu\text{M}$ $\text{hTrxR}^{\text{U498C}}$ mit 0-6 Äquivalenten NADPH unter aeroben Bedingungen bei 25°C . NADPH-Konzentrationen: 1, 0; 2, 3; 3, 7.5; 4, 10, 5, 15; 6, 30; 7, 45; 8, 75; 9, 90 μM .

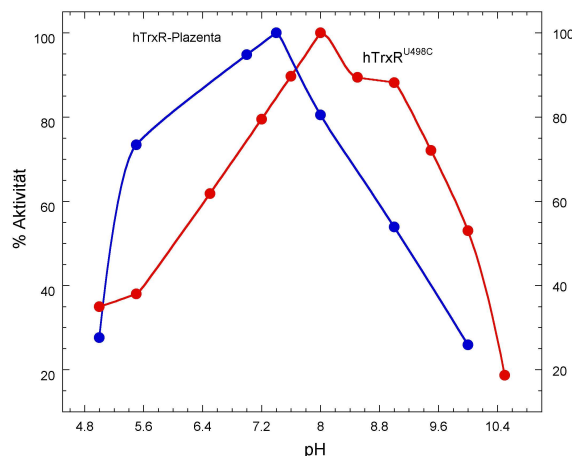


Abb. 3.8: Vergleich der relativen Aktivitäten der TrxR-Plazenta und $\text{hTrxR}^{\text{U498C}}$ als Funktionen des pH-Wertes. Die Aktivitäten beziehen sich auf die Trx-Reduktion in TrxR-Assaypuffer bei 25°C und sind auf die höchste gemessene Aktivität bezogen.

Die optimalen Pufferbedingungen der TrxR aus humaner Plazenta wurden bereits bestimmt (Gromer, 1998). In Anlehnung an diese Bestimmungen und zum Vergleich früherer Untersuchungen der rTrxR konnte ein einzigartiges Charakteristikum des Mutantenzym über die Bestimmung des pH-Profiles belegt werden. Die Aktivität im Trx-Assay bei 25°C wurde im pH-Bereich 5-10.5 gemessen und das pH-Optimum im Vergleich zur TrxR aus Plazenta bestimmt. Während letztere ihre optimale Aktivität bereits bei pH 7 erreicht, ist die Aktivität der Mutante in den alkalischen Bereich verschoben (Abb. 3.8). Die unterschiedlichen pK_s -Werte der an der Katalyse beteiligten Aminosäuren sprechen für diese Beobachtung. Bei physiologischem pH-Wert liegt das während der Katalyse gebildete Selenol mit einem pK_s -Wert von 5.3 vollständig ionisiert vor, während das in der Mutante an dieser Stelle vorhandene Thiol mit einem pK_s -Wert von 8.3 noch partiell protoniert und damit reaktionsärmer ist (Zhong and Holmgren, 2000).

Da die rekombinant hergestellte $\text{hTrxR}^{\text{U498C}}$ in ausreichenden Mengen vorhanden und sehr rein war, konnte sie in Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden, deren Ergebnisse in Abschnitt 3.7 näher beschrieben werden.

3.2.3 Deletionsmutanten der TrxR

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neben der Cysteinmutante weitere Mutanten der hTrxR in Bezug auf Substratspezifität und sonstige Charakteristika untersucht werden. Dabei handelt es sich um Mutanten, deren C-terminales Ende teilweise oder vollständig deletiert wurde. Aus Sekundär- und Tertiärstrukturvorhersagen war der sehr ähnliche Aufbau von TrxR und GR, insbesondere in der N-terminalen Region bekannt (Abschnitt 4.7.2), so dass man vermutete, der C-terminale flexible Teil der TrxR mache den entscheidenden Unterschied zwischen beiden Enzymen aus und seine Deletion führe zu einer der GR ähnlicheren TrxR mit GSSG-Reduktion (Sandalova *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 1998).

Zunächst wurden 8 und dann 16 Aminosäuren deletiert und die $\text{hTrxR}\Delta 8$ bzw. $\text{hTrxR}\Delta 16$ rekombinant hergestellt. Im Rahmen der Masterarbeit von Johanna Lieske wurden darüber hinaus noch weitere Mutationen in der Gesamtsequenz eingefügt, die schließlich zu der $\text{hTrxR}\Delta 16^{\text{K29R,H108Y,A119N,V478E}}$ führten. Die ausgetauschten Aminosäurereste wurden aufgrund

ihrer Bedeutung in der GR-Substraterkennung ausgewählt (gemäß eigens durchgeführter Strukturmodellierungen von GR und TrxR und GR-Beschreibungen aus der Literatur; siehe auch Abb. 3.10) (Henderson *et al.*, 1991; Karplus *et al.*, 1989).

3.2.3.1 Kinetische Charakterisierung

Die TrxR-Deletionsmutanten wurden im Trx-, DTNB- und GSSG-Reduktionsassay (Standard-TrxR-Assaybedingungen, Abschnitt 2.2.3.2) auf ihre Substrateigenschaften getestet. Eine Reduktion von Trx konnte weder bei der hTrxR Δ 8 noch bei der hTrxR Δ 16, auch nicht bei höherem Enzymeinsatz (10 μ M) festgestellt werden.

DTNB stellte sich hingegen als gut messbares Substrat heraus, für das K_M -Wertbestimmungen im Konzentrationsbereich 0.2-15 mM mit 150 (500) nM UE-TrxR durchgeführt werden konnten. Die K_M -Werte von hTrxR Δ 8 bzw. hTrxR Δ 16 waren mit 2-4 mM relativ hoch. Dies sind durchaus realistische Werte, denn der für die GR ermittelte K_M -Wert für DTNB beträgt 2 mM (Wong *et al.*, 1988). Die statistischen Werte und weitere kinetische Daten sind in Tabelle 3-II zusammengefasst. Bei höheren Substratkonzentrationen (> 10 mM DTNB) wurde allerdings eine signifikante Substrathemmung beobachtet.

Das interessanteste Substrat in dieser Testreihe war GSSG. Im physiologischen Substratbereich (0.1-1 mM GSSG) konnte auch bei höherem Enzymeinsatz keine nennenswerte Aktivität beobachtet werden. Erst bei höheren GSSG-Konzentrationen über 1 mM wurde eine durch den NADPH-Verbrauch infolge der GSSG-Reduktion verursachte Absorptionsabnahme beobachtet. Da die TrxR in mikromolaren Konzentrationen (5-10 μ M) eingesetzt wurde, musste die NADPH-Oxidaseaktivität (Abschnitt 2.2.3.2.3) in Kontrollassays ausgeschlossen werden. Die Reaktion mit GSSG war konzentrationsabhängig und erreichte keine Sättigung, so dass von einer K_M -Wertbestimmung abgesehen werden musste.

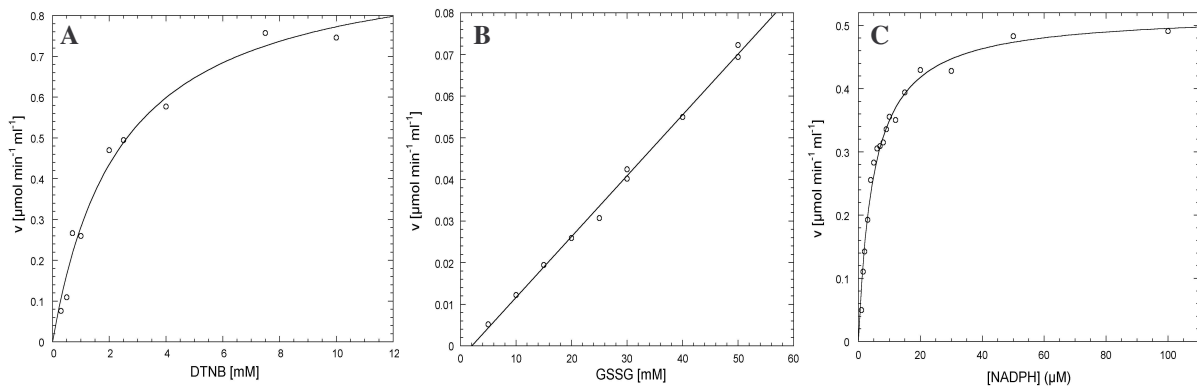


Abb. 3.9: Kinetiken der hTrxR Δ 16 unter Standardbedingungen bei 25°C. (A) Reduktion von 0-10 mM DTNB mit 150 nM UE-TrxR (Sättigungskinetik). (B) Die Maximalgeschwindigkeit der hTrxR Δ 16 (5 μ M) wird bei der GSSG-Reduktion nicht erreicht. GSSG-Konzentrationen: 1, 10, 15, 20, 30, 50 mM. (C) Michaelis-Menten-Plot (nicht-lineare Regression) der Reaktion von 500 nM UE-TrxR mit 0-100 μ M NADPH. Die NADPH-Sättigung wurde bereits im unteren mikromolaren Bereich erreicht.

3.2.3.2 Titrations mit NADPH

Die spektralen Veränderungen der Deletionsmutanten wurden unter aeroben Bedingungen bei 25°C untersucht. Auch hier wurde das typische Flavoproteinspektrum erhalten mit einer Absorptionzunahme bei 540 nm bei steigenden NADPH-Konzentrationen, die nach 5 NADPH-Äquivalenten ihren Höhepunkt erreichte (Abb. 3.10). Daher ist davon auszugehen, dass die Deletionsmutanten in der Lage sind, einen *charge-transfer* auszubilden und für ihre Reduktion mehr als ein Äquivalent NADPH notwendig ist, was sie von der Glutathionreduktase unterscheidet (Arscott *et al.*, 1997).

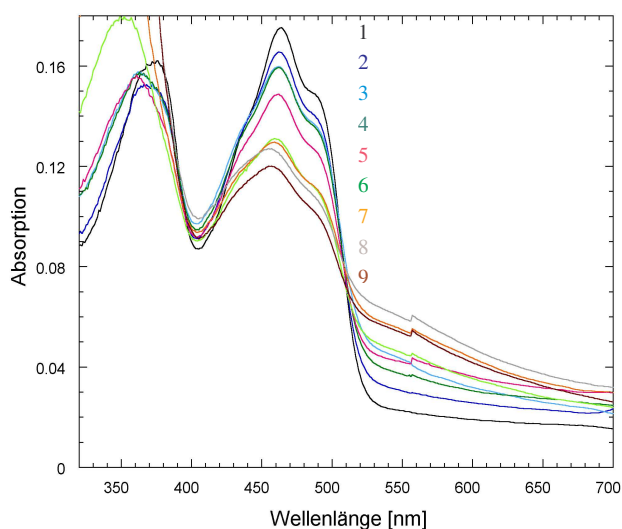


Abb. 3.10: Spektren der Titration der hTrxRΔ16 (15 μM) mit 1, 0; 2, 3; 3, 7.5; 4, 10, 5, 15; 6, 30; 7, 45; 8, 75; 9, 90 μM NADPH (aerob, 25°C).

3.2.3.3 Versuche zur Redoxpotentialbestimmung

Die Redoxpotentialbestimmung stellt eine Möglichkeit dar, die Deletionsmutanten in ihrem Reduktionsverhalten entweder eher der TrxR oder der GR zuzuordnen. Hierzu sollte die für die TrxRΔ16 geeignete Methode herausgefunden werden. Da die Bestimmungen zum Teil größere Enzymmengen erforderten, war es angebracht, die ergiebiger murine Deletionsmutante rTrxRΔ16 zu verwenden.

Ein Ansatz zur Redoxpotentialbestimmung geht von der Bestimmung kinetischer Daten aus. Die sog. *Haldane relationship* beschreibt den Zusammenhang zwischen den bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten aus Hin- und Rückreaktion (ausgedrückt als V_{\max} bzw. k_{cat} und K_M) und der Gleichgewichtskonstante (K_{eq}) der Gesamtreaktion, die zur Redoxpotentialberechnung in die Nernst-Gleichung eingesetzt wird.

So liefern die Kinetiken der Reduktion (*red*) und Oxidation (*ox*) die jeweiligen Werte für k_{cat}/K_M , die miteinander verrechnet K_{eq} ergeben:
$$K_{\text{eq}} = \frac{(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{ox}}}{(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{red}}} \text{ bzw. } K_{\text{eq}} = \frac{(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{red}}}{(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{ox}}}$$

Es ist wichtig, dass beide Reaktionen, Hin- und Rückreaktion, mit genügend hoher Geschwindigkeit stattfinden.

Für die TrxR bietet sich die Trx- oder die DTNB-Reaktion an und man kann den k_{cat}/K_M -Wert der NADPH-Oxidation und -Reduktion oder der Trx-Reduktion und -Oxidation mit einbeziehen (unterschiedliche Formeln für K_{eq}). Für den rTrxR-Wildtyp wurde gezeigt, dass Hin- und Rückreaktionen ähnlich effektiv ablaufen und das Redoxpotential für sein EH_2/EH_4 -Paar

mittels der Haldane-Beziehung auf -294 mV kalkuliert werden konnte (Cenas *et al.*, 2004). Dies sollte auch für die rTrxR-Deletionsmutante untersucht werden. Photometrische Messungen sowohl der Trx- als auch der DTNB-Reaktion ergaben jedoch eine zu schwache Rückreaktion (NADP^+ -Reduktion), deren Rate auch durch Zugabe von Reduktionsmitteln (10 mM DTT, GSH) nicht gesteigert werden konnte. Ein weiterer Versuch, die Rückreaktion der DTNB-Reaktion ($\text{NADP}^+ + 2 \text{TNB}^- \rightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{DTNB}$) über anaerob hergestelltes TNB zu beschleunigen (Kettle and Winterbourn, 1994) blieb ebenfalls ohne Erfolg.

Eine weitere elegante Methode zur Analyse des Redoxpotentials von Proteinen stellt die Redoxpuffertitrierung dar. Dazu wurde die rTrxR Δ 16 in verschiedenen NADP^+ / NADPH -Puffern mit definierten Redoxpotentialen von -210 bis -320 mV bei pH 7.0 und 25°C äquilibriert, um den Redoxstatus der TrxR zu ermitteln (Abschnitt 2.2.2.3). Die bei der Reduktion entstehenden Thiolgruppen können mittels Alkylatoren markiert, die entsprechenden Banden auf einem SDS-Gel analysiert und densitometrisch quantifiziert werden. Die Intensität der Banden kann auf den Gehalt an reduzierten Gruppen umgerechnet und das Redoxpotential E mithilfe der Nernst-Gleichung berechnet werden ($E^0_7 = 29.5 \text{ mV} \cdot \log K$). Da größere Enzymmengen und NADP^+ / NADPH in millimolaren Konzentrationen (insbesondere bei anschließenden Entsalzungsvorgängen) eingesetzt wurden, musste die TrxR-Inkubation zur Vermeidung einer starken Induktion ihrer NADPH -Oxidaseaktivität in der anaeroben Box erfolgen. Es wurden verschiedene Alkylierungsprotokolle (mit ein oder zwei Schritten und einem oder mehreren Alkylatoren) durchgeführt, jedoch war keine eindeutige Zuordnung zu definierten Redoxzuständen möglich, was eventuell ein Hinweis für das Vorhandensein von Mischzuständen ist.

Eine weitere Versuchsreihe beinhaltete Gelfiltrationen von rTrxR Δ 16 mit Tritium-markiertem GSSG (^3H -GSSG) zur Überprüfung, ob die Substanz stabil an die TrxR gebunden werden kann (z.B. in Form eines gemischten Disulfids). Die zuvor mit NADPH reduzierte bzw. mit NADP^+ oxidierte TrxR wurde mit einem Überschuss an ^3H -GSSG bei 25°C inkubiert und anschließend über eine kleine Gelfiltrationssäule gereinigt. Zur Kontrolle wurde die GR (E_{ox} und E_{red}) unter den gleichen Bedingungen getestet.

Abbildung 3.11 zeigt das (reproduzierbare) Ergebnis des Gelfiltrationsversuches für die TrxR. Der Proteinpeak und der erste Radioaktivitätspeak fallen zusammen (Elutionsfraktion 2).

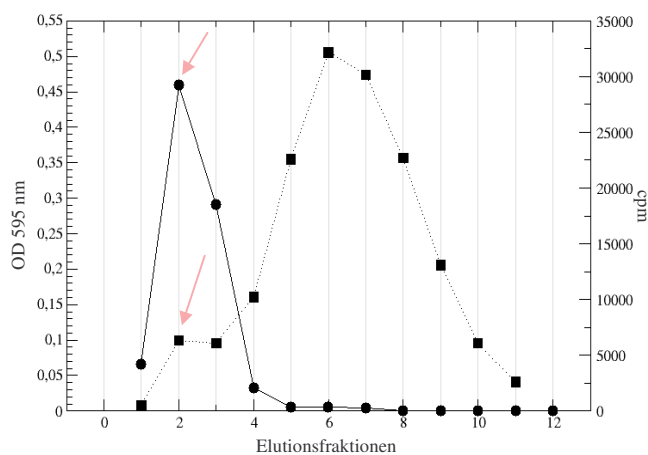


Abb. 3.11: Gelfiltration von NADP^+ -inkubierter TrxR mit ^3H -GSSG. Der linke Kurvenverlauf entspricht den im Bradfordassay ermittelten Proteinabsorptionen, der rechte Kurvenverlauf der im Szintillationszähler ermittelten counts per minute der einzelnen Gelfiltrations-Elutionsfraktionen. Die roten Pfeile markieren die Elutionsfraktion 2 mit Radioaktivitäts- und Proteinpeak.

3.3 Vergleichende Charakterisierung der Thioredoxinreduktase aus Plazenta und heterolog exprimierter Mutanten der Thioredoxinreduktase

3.3.1 Sequenzvergleiche

hTrxR1	-----MNGPEDLPKSYDYDLIIIGGG SGGLAAAK EAAQYGKKVMVLDVFTPTP-LG	50
rTrxR1	-----MNSDKDAPKSYDFDLIIIGGG SGGLAAAK EAAKFDKKVMVLDVFTPTP-LG	50
DmTrxR1	-----MAPVQGSYDYDLIIIGGG SAGLACAK EAVLNGARVACLDFVKPTPTLG	48
hGR	MACRQEPQPQPPPAAGAVASYDYL VIGGGSGGLASAR RAAELGARAA VVESH -----	53
	:* :*:****.***.*:..* . . . :	
hTrxR1	TRWGLGGTCVNVGCIPIKMLMQAALLGQALQDSRNYGKWVEETVKHDWRMIEAVQN HIG	110
rTrxR1	TNGGLGGTCVNVGCIPIKMLMQAALLGQALKDSRNYGKWLEDTVKHDEKMTESVQN HIG	110
DmTrxR1	TKWVGGGTCVNVGCIPIKMLMQASLLGEAVHEAAAYGWNVDEKIKPDWHKLVQSVQN HIK	108
hGR	--- KLGGTCVNVGCVPK KVMWNTAVHSEFMHDHADYGFPSCEG-KFNWRVIKEKRDA VVS	109
	:*****.***.*: : : : : * : * : : : : :	
hTrxR1	SLNWGYRVA LREKKVYENAYGQF IGPHRIKATNNKGEKIYSAERFLIATG---ERPRY	167
rTrxR1	SLNWGYRVA LREKKVYENAYGKFI GPHKIMATNNKGEKIVSAERFLIATG---ERPRY	167
DmTrxR1	SVNWVTRVD LRDKKVEYINGLSFVDSHTLLAKLKS G-ERTITAQTFVIAVG---GRPRY	164
hGR	RLNAIYQNN LTKSHIEIIR GH AAFTSDPKPTIEVSGK---KYTAPHIL IATG GMPSTPHE	166
	:* : * . . . : . . . * . . . : * : **.* * :	
...		
hTrxR1	VMLAIGRDACTRKIGLETVGKINEKTGKIPVTDEEQTNVPYIYAIGDILEDKVEL TPVA	346
rTrxR1	VLLAVGRDSC TRTIGLETVGKINEKTGKIPVTDEEQTNVPYIYAIGDILEGKLEL TPVA	346
DmTrxR1	VLWAIGRKGLVDDLNLPNAGVTQKD--KIPVDSQEATNVANIYAVGDI IYGKPEL TPVA	338
hGR	LLWAI GRVPNTKD LSLNKLGITDDK-GHIIVDEFQNTNVKGIY AVGE VCG-K ALL TPVA	343
	: : * : * . . : * . * : . . . : * * . : * * * * : * * * * * :	
hTrxR1	IQAGR LLAQRLYAG-STVKCDYENVPTTFTPLEYGACGLSEEKAVEKFGEENIEVYHSY	405
rTrxR1	IQAGR LLAQRLYGG-STVKCDYDNVPTTFTPLEYGCCGLSEEKAVEKFGEENIEVYHSF	405
DmTrxR1	VLAGR LLARRLYGG-STQRM DYKDVATTFVTPLEYACVGLSEEDAVKQFGADEIEVFHGY	397
hGR	IAAGR KLAHRLFEYKEDSKLDYNN IPT VVFSHPPIGTVLTEDEAIHKYGIENVKTYSTS	403
	: * * * * : * * : . : * * . . . * . * * . . . * * : * * * * : * * * * :	
hTrxR1	FWPLEWTIPSRDNNKCYAKIICNTKDNERVVGFHVLGPNAGEVTTQGF AAAL KCGLTKKQL	465
rTrxR1	FWPLEWTVPSRDNNKCYAKVICNLKDNERVVGFHVLGPNAGEVTTQGF AAAL KCGLTKKQL	465
DmTrxR1	YKPTEFFIPQKSVRYCYLKAVAERHGDQRVYGLHYIGPVAGEVIQGF AAAL KSGLTINTL	457
hGR	FTPMYHAVTKR-KTKCVMKMCANK-EEKVVGIIHQGLGCD EM LQGF AVAV KMGATKADF	461
	: * . . . : * * : . : : * * * * * * . . . : * * * * * * * * * :	
hTrxR1	DSTIGI HPVCAEVFTT LSVTKRSGASILQAGCUG	499
rTrxR1	DSTIGI HPVCAEIFTT LSVTKRSGGDIQSGCUG	499
DmTrxR1	INTVGI HPTTAEFFTR LAIITKRSGLDPTPASCSS	491
hGR	DNTVAI HPTSSEELVTLR -----	479
	.*:***.*: * : . *	
<hr/>		
hTrxR ^{U498C}	DSTIGI HPVCAEVFTT LSVTKRSGASILQAGCCG	499
hTrxRA8	DSTIGI HPVCAEVFTT LSVTKRSGAS-----	491
hTrxRA16	DSTIGI HPVCAEVFTT LS-----	483
hGR	DNTVAI HPTSSEELVTLR -----	479
		accession numbers
FAD Bindungsdomäne rTrxR1	(Sandalova <i>et al.</i> , 2001)	hTrxR1 → NM_003330
GSSG Bindungsstellen hGR	(Karplus and Schulz, 1989)	
FAD Bindungsdomäne hGR	(Karplus and Schulz, 1987; Schulz <i>et al.</i> , 1982)	hGR → X15722
VTKRSGASILQAGCUG	C-terminale humane Sequenz (16 AS)	rTrxR1 → U63923

Abb. 3.12: Multiples Sequenzalignment (CLUSTAL W (1.82)) der TrxR1 aus Mensch, Ratte und Drosophila melanogaster mit humaner GR. Gezeigt ist zusätzlich der C-terminale Sequenzbereich der in dieser Arbeit hergestellten hTrxR-Mutanten. Markiert sind neben den Aminosäureresten der FAD- und GSSG-Bindedomänen diejenigen AS (rot), die basierend auf den Daten dieser Arbeit von J. Lieske im Rahmen ihrer Masterarbeit mutiert wurden, da sie an der GSSG-Bindung beteiligt sind und sich bei TrxR und GR unterscheiden. Die C-terminalen Tetrapeptide mit den zentralen Redoxpaaren (Cys-Sec bzw. Cys-Cys) sind kursiv dargestellt.

Um einen kurzen Überblick über die homologen Bereiche verschiedener TrxRs und der hGR zu geben, wurde ein multiples Sequenzalignment erstellt. Daraus geht hervor, dass die über die GR-Sequenz verteilten GSSG-Bindungsstellen auch unter den TrxRs (diesen und anderen TrxRs, deren Sequenzen hier nicht aufgeführt sind) relativ konserviert sind. Die Bedeutung der für die GSSG-Bindung kritischen Aminosäuren, die zusätzlich in der hTrxR Δ 16 ausgetauscht wurden (rot markiert in Abb. 3.12), wird in Abschnitt 4.2 diskutiert.

3.3.2 Substratspezifität, kinetische Unterschiede

Die folgende Tabelle fasst die Eigenschaften der nativen hTrxR aus Plazenta und ihrer rekombinanten Mutanten (hTrxR^{U498C}, hTrxR Δ 8, hTrxR Δ 16, hTrxR Δ 16^{K29R,H108Y,A119N,V478E}) zusammen.

Tabelle 3-II: Synopsis der Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten hTrxRs in Wildtyp und Mutantenform. Die hTrxR Δ 16^{K29R,H108Y,A119N,V478E} musste aufgrund ihres FAD-Mangels für die kinetischen Untersuchungen mit dem Cofaktor komplementiert werden. Da es bei der Reaktion mit GSSG keine Sättigungskinetik gab, war die K_M -Wertbestimmung nicht möglich (MMK, Michaelis-Menten-Kinetik). Die K_M -Werte und turnover numbers der Enzyme sind mit ihren Standardabweichungen angegeben. *Die Bestimmung der GSSG-Reduktion an der nativen TrxR aus Plazenta ist kritisch, da ein GR-Restgehalt von 1-5% nicht ausgeschlossen werden kann. Die Aktivitäten der hTrxR Δ 16^{K29R,H108Y,A119N,V478E} im DTNB- und Trx-Assay waren nur am Holoenzym möglich, so dass die Apo-TrxR erst mit FAD abgesättigt werden musste; nd, nicht detektiert.

Eigenschaft		Enzymbezeichnung				
		hTrxR1 (Plazenta)	hTrxR1 U498C	hTrxR Δ 8	hTrxR Δ 16	hTrxR Δ 16 K29R,H108Y,A119N,V478E
Theoretische Molekülmasse ohne His-tag [Da], mit FAD		55200	55366	54620	53833	53960
Anzahl der Aminosäuren ohne His-tag		499	499	491	483	483
Verhältnis $A_{280\text{ nm}}/A_{463\text{ nm}}$ (\emptyset)		8.5	8.0	8.8	9.5	15 (kaum gelb gefärbt)
charge-transfer-Komplex		ja	ja	ja	ja	nur nach FAD-Zugabe
spez. Aktivitäten [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	DTNB	15	0.3-0.4	0.7	0.4-1.0	0.4
	Trx	18	0.1-0.2	nd	nd	nd
	GSSG (30 mM)	nd *	1.98	0.05	0.025	0.003
	Selenenyliodid	2.8	nd	nd	nd	nd
	Dehydroascorbat	1	$7 \cdot 10^{-3}$	nd	nd	nd
steady-state-Kinetik						
K_M -Werte [μM]	DTNB	88 ± 13	700 ± 180	3000 ± 1000	2390	1100
	Trx	13 ± 2	20 ± 2	nd	nd	nd
	NADPH	6	6	5	4.9	nd
	GSSG	MMK \downarrow	MMK \downarrow	MMK \downarrow	MMK \downarrow	MMK \downarrow
k_{cat} -Werte [min^{-1}]	DTNB	2000 ± 1105	17 ± 3	40	32.9	5.3
	Trx	1500 ± 500	10 ± 4	nd	nd	nd
k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$]	DTNB	$1.0\text{-}2.3 \cdot 10^7$	$2\text{-}3.3 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^4$	nd

Die hTrxR^{U498C} sowie die hTrxR Δ 8, hTrxR Δ 16 und hTrxR Δ 16^{K29R,H108Y,A119N,V478E} weisen im Durchschnitt nur 2.7% der Wildtypaktivität mit DTNB auf. Die katalytische Effizienz der DTNB-Reduktion ist um drei Größenordnungen geringer bei den Mutanten. Während die Deletionsmutanten Trx nicht mehr umsetzen können, da ihnen der C-Term fehlt, zeigt die hTrxR^{U498C} mit diesem Substrat 1% Restaktivität im Vergleich zur hTrxR aus Plazenta. Auffallend ist auch die im Vergleich zu den Deletionsmutanten deutlich höhere Aktivität der hTrxR^{U498C} mit GSSG, was den "GR-Charakter" der ersteren Mutanten in Frage stellt.

3.3.3 Zelluläre Auswirkungen (Bioporter Versuch)

In Zusammenarbeit mit Karin Anestål vom Karolinska-Institut (Schweden, Stockholm) wurden verschiedene humane und murine TrxR-Varianten auf ihre zellulären Effekte analysiert. Dazu wurden die Proteine direkt über Lipidsubstanzen (Mischung aus trifluoracetyliertem Lipopolyamin und Dioleoylphosphatidylethanolamin) in die Zelle eingebracht (BioPORTER™ Reagent, //www.genetherapysystems.com) (Zelphati *et al.*, 2001). In vorangegangenen Versuchen hatten sich Mengen im Bereich 0.1-100 ng für das BioPORTER-Experiment als günstig erwiesen (endogene TrxR-Mengen ~ 1-2 ng pro 10000 Zellen (A549, humane Lungenkarzinomzellen) (Anestål and Arner, 2003)). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde das lyophilisierte BioPORTER-Reagenz mit 40 ng Protein in PBS gemischt und 5 Minuten bei 20°C inkubiert, kurz gevortext und mit insgesamt 400 µl Zellmedium versetzt. Diese Mischung wurde dann zu der Zellkultur in speziellen kleinen objektträgergroßen Plastikgefäßen mit Vertiefungen (10000 Zellen pro Vertiefung) gegeben. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen in PBS gewaschen, zunächst für 15 Minuten mit Hoechst-Reagenz 33342 (2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bis-1H-benzimidazol) und dann für weitere 5 Minuten mit Propidiumiodid gefärbt und schließlich gewaschen. Die Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop untersucht (Hellfeld, DAPI-Filter für die Hoechst-Färbung und Rhodaminfilter für die Propidiumiodidfärbung). Lebende Zellen sollten blau gefärbte, normal große und abgerundete Zellkerne besitzen und keine Propidiumfärbung zeigen. Zellen mit rot gefärbten Kernen und entweder vielen hell erscheinenden Stückchen von fragmentiertem Chromatin oder ein oder mehreren Bereichen von kondensiertem Chromatin mit kompakteren Kernen wurden als apoptotische Zellen charakterisiert. Andere Zellen mit intensiv rot gefärbten Kernen wurden den nekrotischen Zellen zugeordnet. Die statistische Auswertung (Abb. 3.13) erfolgte nach zwei unabhängigen Experimenten und Auszählung von jeweils acht Mikroskopfeldern; die relative Zelltodrate wurde auf die Gesamtzellzahl bezogen. Dabei wurde nicht explizit zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden, da die überwiegende Zahl der toten Zellen klar apoptotische Merkmale aufwies.

Abbildung 3.13 fasst das Ergebnis zusammen. Dabei fällt der starke Effekt der hTrxR^{U498C}-Mutante ($52.2 \pm 18.6\%$ apoptotische/nekrotische Zellen) auf und die Unterschiede zwischen den trunkierten TrxRs (hTrxRΔ16: $17.3 \pm 9.2\%$; trunc rTrxR: $48.6 \pm 17.1\%$). Auch sind die Werte für die TrxR aus humaner Plazenta höher ($19 \pm 3.4\%$) im Vergleich zu anderen Experimenten mit Selenocystein-enthaltender rTrxR (im Durchschnitt 11%) (Anestål and Arner, 2003).

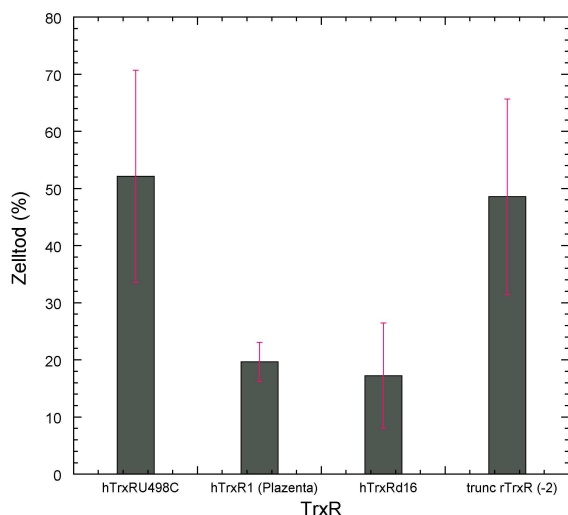


Abb. 3.13: Effekte verschiedener TrxR-Varianten auf die Vitalität von A549-Zellen. Sowohl rekombinante humane und murine TrxRs, als auch die native hTrxR wurden in konstanten Mengen mit einer festgelegten Zellzahl und einer genau definierten Menge an BioPORTER-Reagenz eingesetzt. Alle Werte aus Doppelbestimmungen sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die trunc rTrxR (-2) ist eine rekombinant hergestellte rTrxR ohne die beiden letzten Aminosäuren Selenocystein und Glycin; hTrxRd16 = hTrxRΔ16; trunc = truncated.

3.4 Inhibitorstudie 1: Inhibition von großen Thioredoxin-reduktasen durch Cis-Diamindichlorplatin-Komplexe von 5-Nitro-2-furancarbohydrazid

In Zusammenarbeit mit Dr. Elisabeth Davioud-Charvet, Universität Heidelberg, wurden 12000 verschiedene Substanzen in einem *high throughput screening* im Mikrotitermaßstab auf potentielle TrxR-Inhibitoreigenschaften untersucht (DTNBA-Assay-System (Davioud-Charvet *et al.*, 1999). Drei bekannte TrxR-Inhibitoren, Dichlorindophenol (Mau and Powis, 1992), Naphthazarin (Irmeler *et al.*, 2002) und Cisplatin (CDDP, *Cis*-Diamindichlorplatin) (Arnér *et al.*, 2001; Sasada *et al.*, 1999) dienten dabei als Referenzsubstanzen. Bestimmungen der halbmaximalen Hemmung ergaben für *N'*-(2-Naphthylmethyl)-5-nitro-2-furancarbohydrazid (**8**) einen Wert von 16 μM , der deutlich niedriger lag als die Werte der Referenzsubstanzen (i_{50} -Werte (IC_{50} -Werte) für Dichlorindophenol, Naphthazarin bzw. Cisplatin 25, 20 bzw. $> 50 \mu\text{M}$). Ausgehend von dieser Leitsubstanz (Verbindung **8**) wurde ein Linkerarm mit chelatisierender Ethylendiaminfunktion über die Methylenbrücke des 2-Naphthylmethyl-Substituenten verankert, um den Cisplatinanteil anzubringen. Dies erfolgte in mehreren Schritten mit der Bildung von Zwischenprodukten, die schließlich in einer Platinierungsreaktion (K_2PtCl_4) an verschiedenen Positionen mit Cisplatin gekoppelt wurden, so dass drei sich in der Seitenkette (R = Phenyl-, 2-Naphthylmethyl-, 1-Naphthylmethyl) unterscheidbare CDDP-Komplexe und ein CDDP-Komplex mit einer Naphthylgruppe in der Hauptkette entstanden (**13a**, (*N'*-[2-(Amino)ethyl-Gly-DL-phenylglyciny]l]-5-nitro-2-furancarbohydrazid) Dichlorplatin (II); **13b**, (*N'*-[2-(Amino)ethyl-Gly-2-DL-(naphthyl)alaniny]l]-5-nitro-2-furancarbohydrazid) Dichlorplatin(II); **13c**, (*N'*-[2-(Amino)ethyl-Gly-1-DL-(naphthyl)alaniny]l]-5-nitro-2-furancarbohydrazid) Dichlorplatin(II); **20**, *N*-[6-(2-[(5-Nitro-2-furyl)carbonyl]hydrazin-carbonyl)-2-naphthyl]-2-[(2-aminoethyl) amino]acetamid Dichlorplatin (II)). Die Struktur der Komplexe wurden mittels ^1H - und ^{13}C - und ^{195}Pt -NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie analysiert. Des Weiteren wurde eine FTIR-Spektroskopie durchgeführt (Details zu Synthesen und Analysen siehe Millet *et al.* (2005) (<http://pubs.acs.org>, *Supporting Information*)).

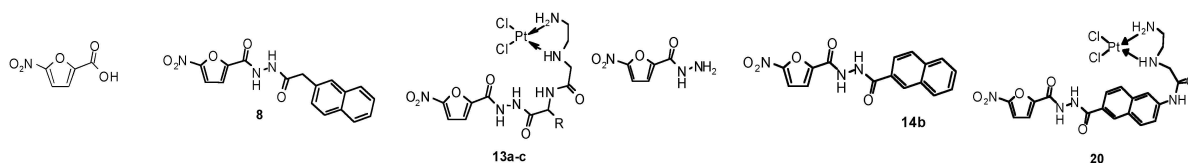


Abb. 3.14: Strukturformeln der Cis-Diamindichlorplatin (CDDP)-Komplexe **13a-c** und **20** sowie ihrer Ausgangssubstanzen und Zwischenprodukte (Details siehe Millet *et al.*, 2005). Die Verbindungen **8** und **14b** zeigen ebenfalls TrxR-Inhibitor-eigenschaften, die durch die Verknüpfung mit Cisplatin potenziert werden. Verbindungen **13a-c**: R = Phenyl- (**13a**), 2-Naphthylmethyl- (**13b**) oder 1-Naphthylmethyl-Substituent (**13c**).

Die Herstellung der verschiedenen Verbindungen basiert auf der sog. Doppelliganden-Strategie für irreversible Inhibitoren, die zunächst eine erste Bindestelle am Enzym erkennen, an einer zweiten freien Bindestelle andocken und erst dann ihre kovalente Modifikation am *target* vollziehen (vgl. auch (Biot *et al.*, 2003)).

Nitroaromatische Verbindungen, einschließlich Nitrofuranverbindungen, sind bekannt dafür, dass sie an Disulfidreduktasen binden und als deren Substrate oder Inhibitoren wirken (Blumenstiel *et al.*, 1999; Cenas *et al.*, 1991; Miskiniene *et al.*, 1998). Daher wurde in Zusammenarbeit mit E. Davioud-Charvet zunächst die Nitrofuranreduktaseaktivität der TrxR überprüft und deren kinetische Daten ermittelt (K_M , $529 \pm 80 \mu\text{M}$; k_{cat} , $2.5 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$; k_{cat}/K_M ,

$4.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). In Anwesenheit von $300 \mu\text{M}$ Nitrofurantoin **8** war die NADPH-Oxidaseaktivität stark erhöht (Millet *et al.*, 2005).

Neben intensiven kinetischen Untersuchungen der Verbindungen **8**, **13a-c** und **20** am isolierten Enzym wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Amtmann (DKFZ Heidelberg) DNA-Interaktionsstudien sowie Zytotoxizitätstests durchgeführt. In der Zellkultur, insbesondere von Cisplatin-resistenten Mammakarzinomzellen, zeigten sich die CDDP-Komplexe um bis zu 30% effektiver als Cisplatin im mittleren mikromolaren Bereich (IC_{50} -Werte $46.3 - 55.9 \mu\text{M}$). Inkubationen der Verbindungen mit DNA führten zu einem ähnlichen elektrophoretischen Shift wie deren Inkubation mit Cisplatin (Millet *et al.*, 2005).

3.4.1 Aufklärung des Inhibitionsmechanismus

3.4.1.1 Steady-state-Kinetiken

Hat sich das *steady-state*, also das Fließgleichgewicht einer Reaktion eingestellt, bleibt die Konzentration der Zwischenprodukte gleich, während sich die Konzentrationen von Substrat und Produkt ändern. In dieser langsamen Phase der Kinetik entspricht die Geschwindigkeit der Bildung der Geschwindigkeit des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes (ES-Komplexes). Bei *steady-state*-Experimenten wird daher mit geringen Enzym-Konzentrationen (im nanomolaren bis unteren mikromolaren Bereich) gearbeitet, so dass die Reaktion langsam genug ist, um mit konventionellen Methoden (z.B. photometrisch) verfolgt zu werden. Die folgenden Inhibitor-Kinetiken konnten im *steady-state*-Bereich vollständig beschrieben werden.

3.4.1.1.1 Analyse der Hemmung durch die Nitrofurantoinverbindung **8**

Um zwischen der Bindung des Inhibitors am N- oder C-terminalen Redoxzentrum der TrxR unterscheiden zu können, wurden diese Studien am hTrxR-Wildtyp aus Plazenta (hTrxR-WT) und an der hTrxR Δ 16 (ohne C-terminales Redoxzentrum) mit DTNB als Substrat durchgeführt (Gilberger *et al.*, 1997). DTNB, nicht aber Trx wird von letzterem Enzym mit einer katalytischen Effizienz von $1.49 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (K_M , $5305.9 \pm 67.5 \mu\text{M}$; k_{cat} , 0.79 s^{-1}) umgesetzt und damit 2825-fach schlechter als dies der hTrxR-WT (K_M , $50.5 \pm 1.6 \mu\text{M}$; k_{cat} , 20.79 s^{-1}) tut. Dennoch ist die DTNB-Bindung am N-terminalen Redoxzentrum signifikant und für die Inhibitorstudien geeignet. Die Hemmung des hTrxR-WT wurde unter Einsatz verschiedener DTNB-Konzentrationen ($11-435 \mu\text{M}$) und sättigender NADPH-Konzentration ($200 \mu\text{M}$) sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der Inhibitorverbindung **8** ($10-40 \mu\text{M}$) verfolgt und in eine direkte Darstellung mittels nicht-linearer Regression grafisch umgesetzt. Dabei zeigte sich, dass sich die apparente Maximalgeschwindigkeit durch Inhibitorzugabe ändert, der K_M -Wert aber gleich bleibt. Daher wurden die experimentellen Daten anhand der Gleichung 3.1 für eine unkompetitive Hemmung analysiert.

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Gleichung 3.1: Geschwindigkeitsbestimmung bei unkompetitiver Enzymhemmung. Bei diesem Hemmtyp bindet der Inhibitor **8** ausschließlich an den TrxR-DTNB-Komplex, d.h. die Bindestelle des Inhibitors wird erst in Wechselwirkung mit dem Substrat gebildet. $[S]$, Substratkonzentration; $[I]$, Inhibitor-Konzentration; V_{max} , Maximalgeschwindigkeit der Reaktion; K_M , Michaelis-Konstante, K_i , Inhibitions-konstante für die Bindung des Inhibitors zum Enzym-Substrat-Komplex.

Der K_i -Wert (K_{iu} , unkompetitive Dissoziationskonstante: $ESI \rightarrow ES + I$) von $16 \pm 0.8 \mu\text{M}$ wurde graphisch anhand eines Sekundärdiagramms ermittelt (Abb. 3.15 A, kleine Grafik). Lineare Darstellungen als Cornish-Bowden-Plot (Abb. 3.15 B) sowie Dixon- und Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 3.15 C und D) bestätigten den unkompetitiven Hemmtyp und eine exakte Beschreibung für die Beziehung von K_i und DTNB-Konzentration.

Aus dem Cornish-Bowden-Plot ging des Weiteren klar hervor, dass die Bindung des Inhibitors unter *steady-state*-Bedingungen durch die DTNB-Bindung an das Enzym erleichtert wird und sich somit ein induzierter kooperativer Effekt zeigt. Eine detaillierte Analyse dieses Plots zeigte auch, dass der K_i -Wert für die Dissoziation des Inhibitors bei steigenden DTNB-Konzentrationen selbst in einer Steigung resultiert und ein Maximum von ungefähr $12 \mu\text{M}$ erreicht, wenn die DTNB-Konzentration im K_M -Bereich liegt (kleine Grafik Abb. 3.15 B).

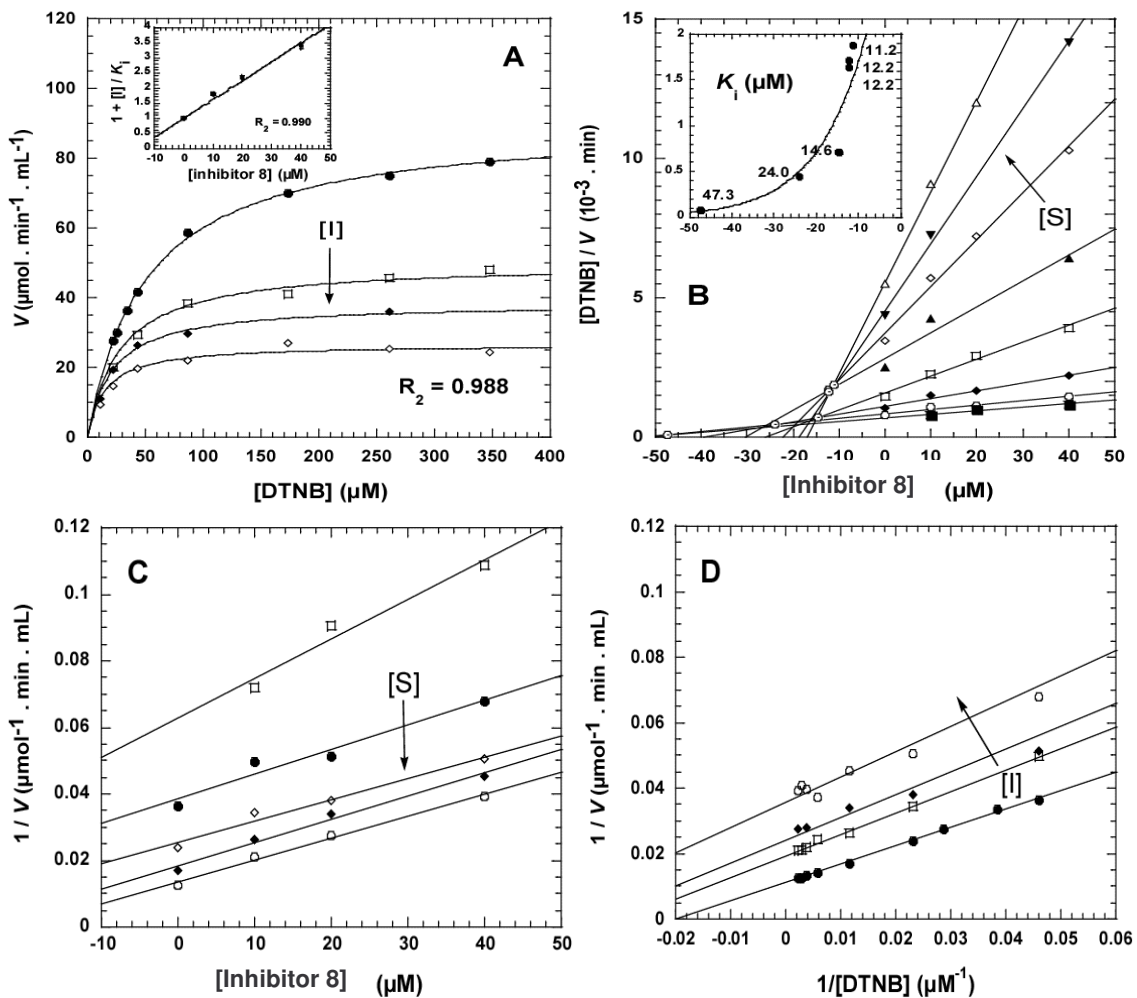


Abb. 3.15: Charakterisierung des Hemmtyps der Nitrofurانverbindung 8 bei Reaktion mit TrxR-WT aus humaner Plazenta im *steady-state*. Die Hemmung wurde mittels des DTNB-Reduktionsassays analysiert (A) und der K_i -Wert bestimmt (kleine Grafik, A). Der unkompetitive Hemmtyp wurde mittels Auftragung nach Cornish-Bowden (B), Dixon (C) und Lineweaver-Burk (D) bestätigt. Eingesetzte DTNB-Konzentrationen: 10,9, 21,7, 43,4, 86,9, 173,8, 260,9 und 435 μM ; Inhibitorkonzentrationen: 0, 10, 20 und 40 μM .

Die Hemmung der trunktierten TrxR, hTrxR Δ 16, bedurfte einer anderen Auswertung der Daten wie die des hTrxR-Wildtyps. Aufgrund des bedeutend höher liegenden K_M -wertes für DTNB (K_M , $5305.9 \pm 67.5 \mu\text{M}$) war die Hemmanalyse unter Variation des DTNB im höheren Konzentrationsbereich (0,6-6 mM) möglich. Die Kinetiken wurden mit NADPH-Überschuss

(200 μM) in Ab- oder Anwesenheit von 100-250 μM Inhibitor **8** durchgeführt. Unter der Annahme einer einfachen kompetitiven Hemmung wurden die photometrisch ermittelten Daten in die folgende Gleichung eingesetzt und ein Sekundärplot zur Bestimmung des K_i -Wertes erstellt.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Gleichung 3.2: Geschwindigkeitsbestimmung bei kompetitiver Enzymhemmung. Bei diesem Hemmtyp konkurriert der Inhibitor **8** mit DTNB um dessen Bindestelle am aktiven Zentrum des Enzyms. Es kann entweder nur Substrat oder nur Inhibitor gebunden werden, eine gleichzeitige Bindung beider ist ausgeschlossen.

Der Sekundärplot ergab einen K_i -Wert (K_{ic} , kompetitive Dissoziationskonstante: $EI \rightarrow E + I$) für die Hemmung von hTrxR Δ 16 durch die Verbindung **8** von $136.5 \pm 9.9 \mu\text{M}$ (Abb. 3.16 A, kleine Grafik). Der kompetitive Hemmtyp konnte grafisch mittels Dixon-Plot (Abb. 3.16 B) und Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 3.16 C) belegt werden.

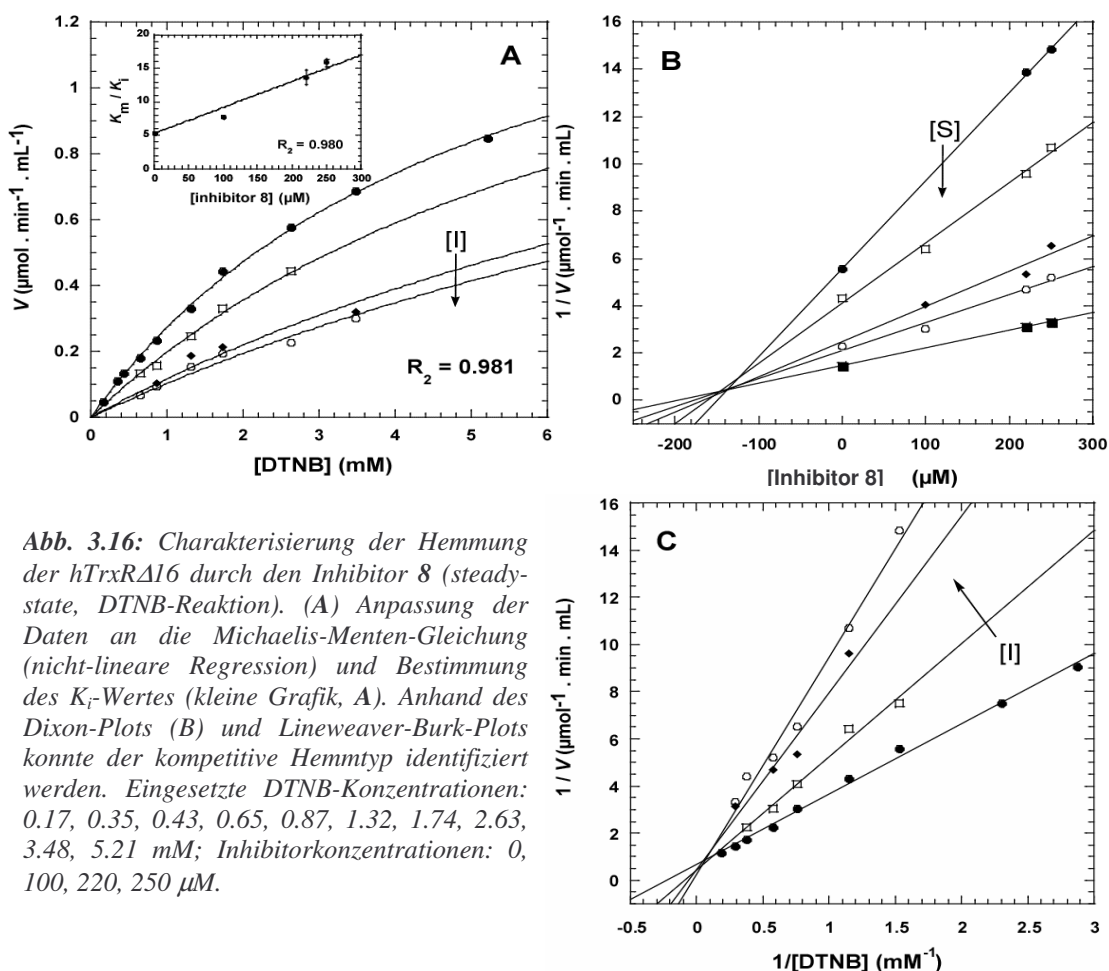


Abb. 3.16: Charakterisierung der Hemmung der hTrxR Δ 16 durch den Inhibitor **8** (steady-state, DTNB-Reaktion). (A) Anpassung der Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung (nicht-lineare Regression) und Bestimmung des K_i -Wertes (kleine Grafik, A). Anhand des Dixon-Plots (B) und Lineweaver-Burk-Plots konnte der kompetitive Hemmtyp identifiziert werden. Eingesetzte DTNB-Konzentrationen: 0.17, 0.35, 0.43, 0.65, 0.87, 1.32, 1.74, 2.63, 3.48, 5.21 mM; Inhibitorkonzentrationen: 0, 100, 220, 250 μM .

Aus dieser Analyse geht schon hervor, dass die Kinetiken komplexer waren als hier zunächst dargestellt (leicht sigmoidaler Verlauf der Kurven bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen und steigenden DTNB-Konzentrationen, Abb. 3.16 A) und eine bessere Kurvenangleichung ließ sich über die Gleichung für die Hemmung von Enzymen mit multiplen Bindungsseiten realisieren (Daten sind hier nicht gezeigt). Die Auftragung von K_M/K_i gegen die Inhibitorkonzentration ließ sich mittels einer exponentiellen Gleichung besser anpassen. Diese

Beobachtung bestätigte sich in der Kinetik des Inhibitors **20**, die eindeutige sigmoidale Kurven hervorbrachte und anhand derer sie vollständig analysiert werden konnte.

3.4.1.1.2 Analyse der TrxR-Hemmung durch die vier Platinkomplexe 13a-c und 20

Die reversiblen Hemmeigenschaften der Verbindungen **13a-c** und **20** wurden in Assays mit hTrxR (hTrxR-WT und hTrxR-Cysteinmutante, hTrxR^{U498C}), Thioredoxin oder dem alternativen Substrat DTNB untersucht. Die Hemmtypbestimmungen wurden wie zuvor mit NADPH gestartet, um Effekte durch die Vorreduktion des Enzyms möglichst gering zu halten. Des Weiteren wurde die Enzymkonzentration möglichst niedrig gehalten, um die Nitrofuranreduktion zu vernachlässigen. Gemäß der grafischen Darstellungen Dixon-Plot ($1/v$ versus $[I]$, Abb. 3.17 A) und Cornish-Bowden-Plot ($[S]/v$ versus $[I]$, Abb. 3.17 B) folgten der Inhibitor **20** und die anderen Platinverbindungen einem kompetitiven Hemmtyp in Bezug auf die DTNB-Reduktion. Die Ermittlung der K_i -Werte erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1.1.1 für die kompetitive Hemmung beschrieben und wurde gemäß Gleichung 3.2 berechnet. Die K_i -Werte betragen 110 nM für Inhibitor **13a**, 84 nM für **13b**, 120 nM für **13c** und 275 nM für Inhibitor **20**. Diese Werte zeigten, dass in diesem Fall die 2-Naphthylmethyleinheit in **13a-c** (Substitutionsmuster des Inhibitors **8**) der optimale Substituent für die hTrxR-Erkennung ist. Die Ergebnisse der Trx-Assays sind komplexer, wie in Abbildung 3.17 C zu sehen ist. Grafische Darstellungen ergaben einen Schnittpunkt der Kurven im oberen rechten Quadranten, daher war eine eindeutige Klassifizierung des Hemmtyps nicht möglich.

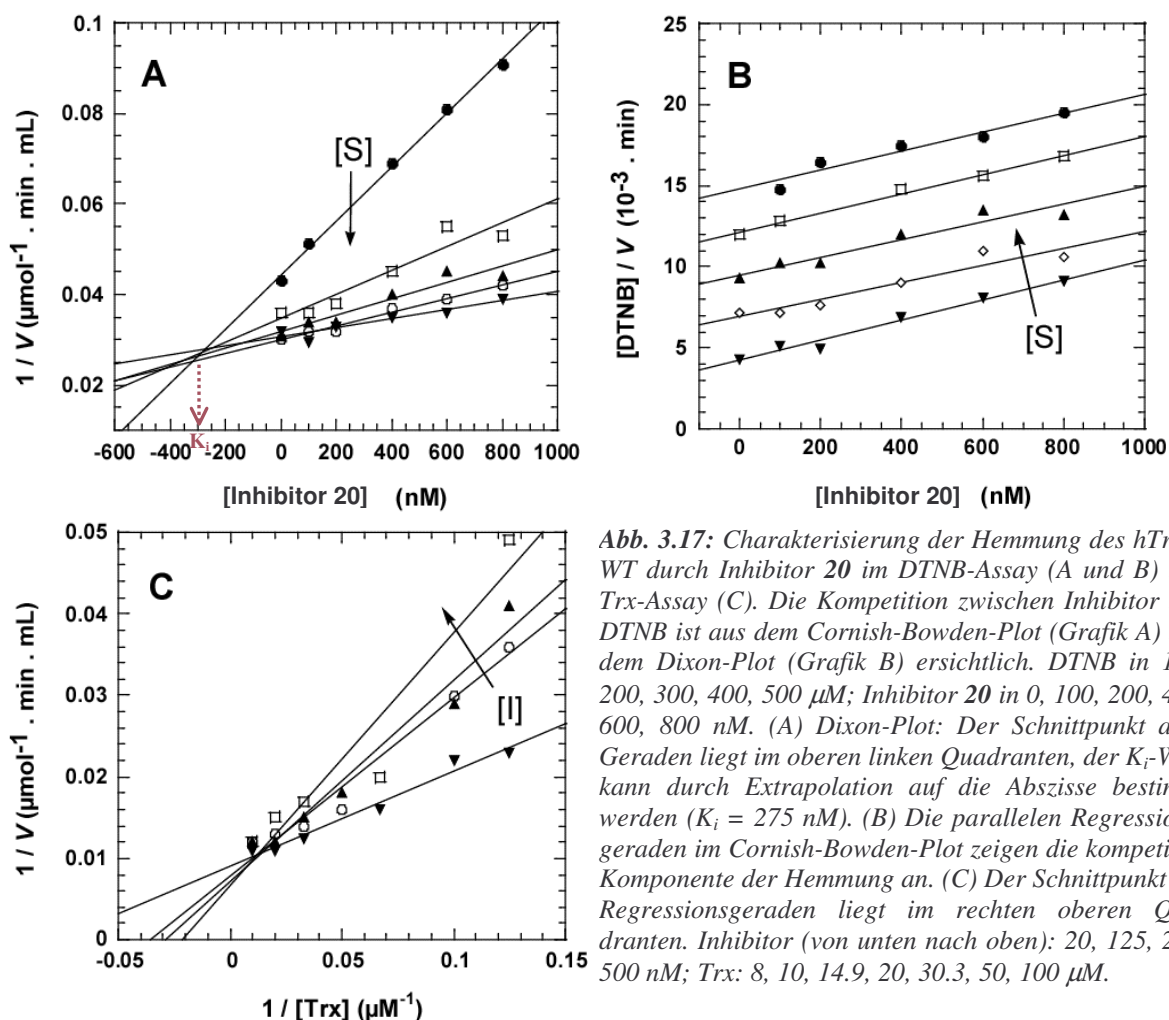


Abb. 3.17: Charakterisierung der Hemmung des hTrxR-WT durch Inhibitor **20** im DTNB-Assay (A und B) und Trx-Assay (C). Die Konkurrenz zwischen Inhibitor und DTNB ist aus dem Cornish-Bowden-Plot (Grafik A) und dem Dixon-Plot (Grafik B) ersichtlich. DTNB in 100, 200, 300, 400, 500 μM ; Inhibitor **20** in 0, 100, 200, 400, 600, 800 nM. (A) Dixon-Plot: Der Schnittpunkt aller Geraden liegt im oberen linken Quadranten, der K_i -Wert kann durch Extrapolation auf die Abszisse bestimmt werden ($K_i = 275$ nM). (B) Die parallelen Regressionsgeraden im Cornish-Bowden-Plot zeigen die kompetitive Komponente der Hemmung an. (C) Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden liegt im rechten oberen Quadranten. Inhibitor (von unten nach oben): 20, 125, 250, 500 nM; Trx: 8, 10, 14.9, 20, 30.3, 50, 100 μM .

In Anwesenheit des Inhibitors **13c** und ohne Zugabe von Disulfid-Substrat zeigte die hTrxR^{U498C} eine starke NADPH-Oxidation von 20 mU/mg, die in der DMF-Kontrolle ohne Inhibitor nicht zu beobachten war. Dies ist wahrscheinlich auf eine durch den Inhibitor induzierte NADPH-Oxidaseaktivität des alkylierten Enzyms zurückzuführen. Dieser Effekt der TrxR wurde auch bei Inkubation mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzen beobachtet (Arnér *et al.*, 1995).

3.4.1.2 Relative IC₅₀-Werte (i_{0,5}-Werte) über die zeitabhängige Inaktivierung der TrxR (halbmaximale Enzymhemmung)

Eine generelle Eigenschaft von Disulfidreduktasen ist ihre größere Vulnerabilität im NADPH-reduzierten Zustand, welche auch für die TrxR bezeichnend ist. Ohne vorherige NADPH-Reduktion erreichten die Inhibitoren weniger als 10% Hemmung. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde die TrxR zur Bestimmung der Inhibitorkonzentrationen, die zu 50% reduzierter TrxR-Aktivität führen (i_{0,5}), stets mit NADPH und Inhibitor vorinkubiert und der Assay durch Substratzugabe gestartet (2.2.6.1.1). Neben dem hTrxR-WT kamen die Mutanten hTrxR^{U498C}, hTrxRΔ16 sowie die hGR zur Anwendung, um die Spezifität der Inhibitoren für Selenocystein zu überprüfen. Die i_{0,5}-Werte wurden anhand Dosis-abhängiger Kurven kalkuliert und sind in Tabelle 3-III zusammengefasst.

Tabelle 3-III: Zeitabhängige Hemmung der TrxR (WT und Mutanten) sowie der GR durch die CDDP-Komplexe **13a-c** und **20**. Zum Vergleich sind einige Werte der Ursprungssubstanz **8** angegeben. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Bestimmungen, die weniger als 15% voneinander abwichen. ^a

i _{0,5} (μM)	8 ^b	13a	13b	13c	20
hTrxR-WT Trx-Assay	nd	0.16	0.14	0.21	0.12
hTrxR-WT DTNB-Assay	18	0.10	0.03	0.08	0.11
hTrxR ^{U498C} Trx-Assay	nd	~ 250 ^c	24.0	21.0	38.0
hTrxR ^{U498C} DTNB-Assay	nd	265	230	235	130
hTrxRΔ16 DTNB-Assay	215	520	195	170	145
hGR	4.1	2.6	0.95	1.0	1.0

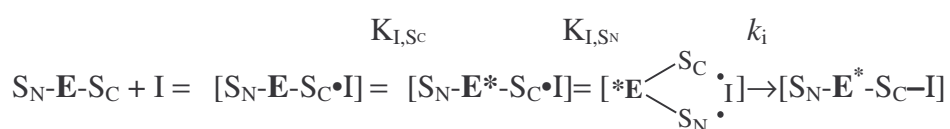
^aDTNB-Assay: 5 nM hTrxR-WT bzw. 100 nM hTrxR-Mutante wurden für 10 Minuten bei 25°C in TrxR-Puffer und 200 μM NADPH ohne oder mit Inhibitor inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 mM DTNB gestartet. Trx-Assay: 30 nM hTrxR-WT bzw. 1.3 μM hTrxR-Mutante wurden mit 100 μM NADPH unter den gleichen Bedingungen wie beim DTNB-Assay inkubiert und die Reaktion mit 20 μM hTrx (Mutante hTrx^{C72S}). Dimethylformamid (DMF) wurde in den Kontrollassays anstatt Inhibitor eingesetzt. ^bInhibitor **8** bewirkte unter den beschriebenen Bedingungen keine zeitabhängige Hemmung (da rein reversible Hemmung). ^cDie Inhibitorverbindung **13a** zeigte bei 340 nm eine starke Absorption, so dass eine genaue i_{0,5}-Bestimmung nicht möglich war.

Die vier CDDP-Komplexe waren an dem hTrxR-WT alle im nanomolaren Bereich aktiv (IC₅₀-Werte von 30-110 nM im DTNB-Assay und von 120-210 nM im Trx-Assay). Inhibitor **20** zeigte sich insgesamt als die effektivste Verbindung in Bezug auf die TrxR-Inaktivierung, was eventuell auf die Flexibilität des Naphthyl-Spacers zurückzuführen ist. Die Hemmung der hTrxR^{U498C} war im Vergleich zur WT-Hemmung mindestens um zwei Größenordnungen weniger effektiv und könnte ein Hinweis für eine spezifische Interaktion der Pt-Verbindungen mit dem C-terminalen Selenocystein sein. Überraschenderweise war die Hemmung der TrxR-Mutante effektiver bei Testung mit dem nativen Substrat Trx (siehe Abschnitt 3.4.1.3). Für eine relative Spezifität der vier CDDP-Komplexe spricht der Befund, dass an der GR 5- bis 16-fach höhere i_{0,5}-Werte gemessen wurden.

Untersuchungen zur Reversibilität der Hemmung wurden mit allen Komplexen durchgeführt. Nach 10-minütiger Inkubation von NADPH-reduzierter TrxR waren mehr als 90% der Enzymmoleküle inaktiviert. Eine erschöpfende Dialyse mit oder ohne vorheriger Zugabe von 10 mM DTT führte nicht (< 5%) zu einer Reaktivierung der TrxR. Dieses spricht für einen irreversiblen Hemmmechanismus, in dessen Verlauf eine kovalente Bindung zwischen Enzym und Inhibitor zustande kommt.

3.4.1.3 Zeitabhängigkeit und Irreversibilität der Inhibition

Bei einer irreversiblen Hemmung nimmt die Enzymaktivität exponentiell ab. Während der Inkubation mit den CDDP-Komplexen wird die hTrxR in einem zeitabhängigen Prozess gehemmt, der einer Kinetik pseudo-erster Ordnung folgt. Dieser Prozess der Inaktivierung kann durch folgende Gleichung 3.3 beschrieben werden.



Gleichung 3.3: Gesamtreaktion der Interaktion von Inhibitor und Enzym mit zwei verschiedenen Bindungsstellen. Dabei stellt das Zwischenprodukt mit $S_N\text{-E}^*\text{-S}_C\text{-I}$ einen durch den Inhibitor veränderten Komplex dar. $K_{I,SN}$ repräsentiert die Dissoziationskonstante des Inhibitors am N-terminalen Redoxzentrum, während $K_{I,SC}$ die entsprechende Konstante am C-terminalen Redoxzentrum darstellt. k_i ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der irreversiblen Hemmung.

Es ist aufgrund der vorangegangenen Studien anzunehmen, dass die Nitrofurankomponente der Inhibitoren **13a-c** und **20** eine Präferenz für das N-terminale Redoxzentrum und die CisplatinKomponente eine Präferenz für das C-terminale Redoxzentrum hat. Jedoch werden wohl beide Komponenten nicht gleichzeitig fest an die Enzymstellen gebunden. Die Hauptfunktion der Nitrofurankomponente liegt vielmehr in der Unterstützung der C-terminalen Blockade durch Cisplatin, d.h. solange eine N-terminale Koordination aufrecht zu erhalten bis die Reaktion zwischen dem Selenolat und Cisplatin stattgefunden hat.

Um diese Art der irreversiblen Inaktivierung zu beschreiben, kann die Herleitung von Kitz und Wilson herangezogen werden (Kitz and Wilson, 1962). Die experimentellen Daten ließen sich auf diese Weise gut anpassen. Unter der Annahme, dass die Inhibitorkonzentration ($[I]$) sehr viel höher wie die stöchiometrische Enzymkonzentration (E_0) ist, kann die restliche Menge an aktivem Enzym (E) zum Zeitpunkt t über die Gleichung 3.4 gemäß den Ausführungen von Kuo und Jordan bestimmt werden (Kuo and Jordan, 1983).

$$\frac{\ln\left(\frac{E}{E_0}\right)}{t} = -k_{obs}(t) = \frac{k_i}{1 + K_{I,SN}[I]^{-1} + K_{I,SN}K_{I,SC}[I]^{-2}}$$

Gleichung 3.4: Bestimmung der zum Zeitpunkt t vorhandenen Menge an aktivem Enzym, die sich aus einer exponentiellen Abnahme der Enzymaktivität bei irreversibler Hemmung ergibt.

$$t_{1/2} = t_{1/2}^{\infty} \cdot (1 + K_{I,SN} \cdot [I]^{-1} + K_{I,SN} \cdot K_{I,SC} \cdot [I]^{-2}) \quad t_{1/2}^{\infty} = \frac{\ln 2}{k_i}$$

Gleichung 3.5: Bestimmung der Halbwertszeit $t_{1/2}$ für die jeweilige Inhibitorkonzentration.

Im Primärplot, der die prozentuale Restaktivität in Abhängigkeit der Vorinkubationszeit zeigt, wird die exponentielle Abnahme der Enzymaktivität deutlich. Abbildung 3.18 zeigt die zeitabhängige Inaktivierung des hTrxR-WT.

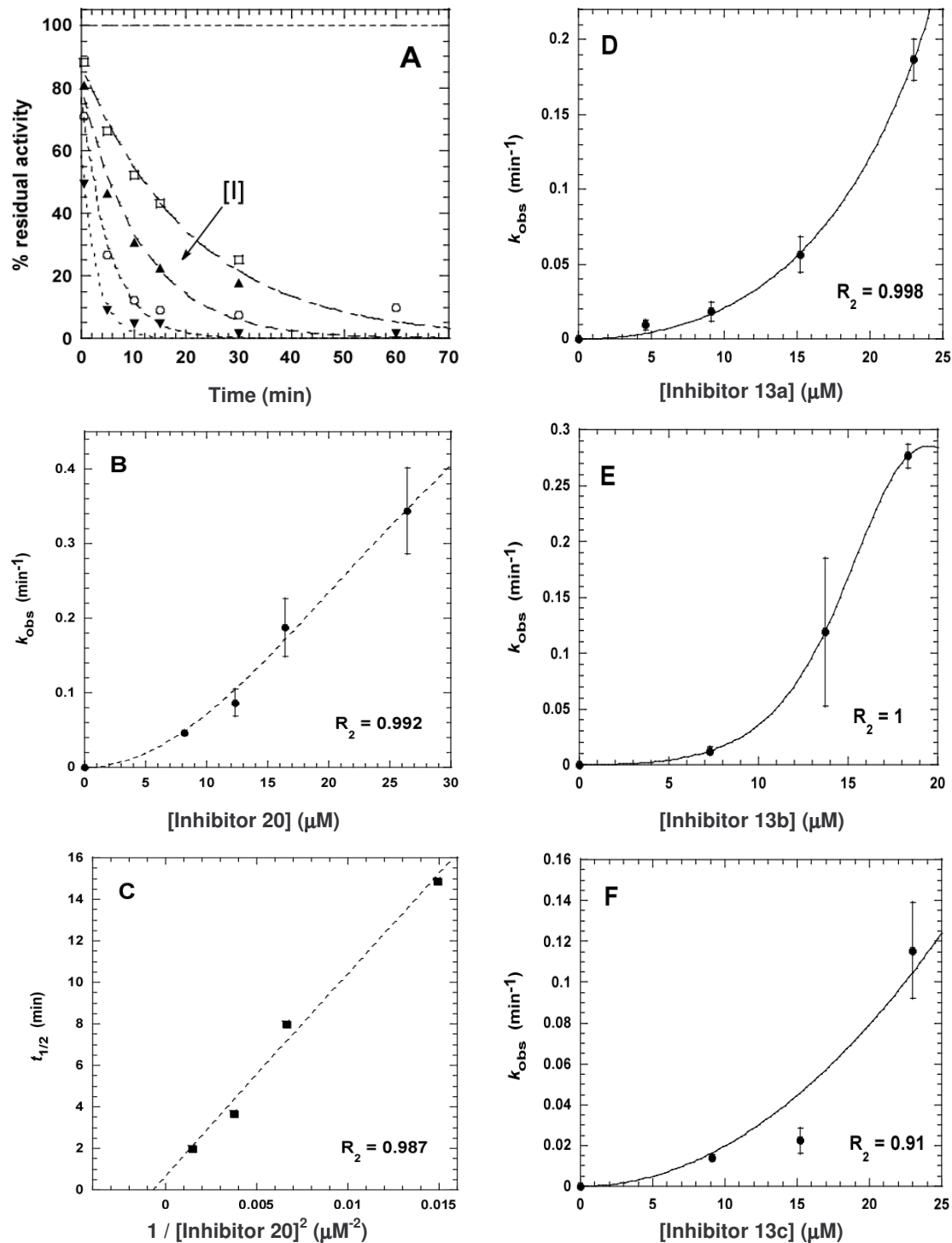


Abb. 3.18: Zeitabhängige Inaktivierung des hTrxR-Wildtyps (Plazenta) durch die CDDP-Komplexe **20** (A-C) und **13a-c** (D-F). Grafiken A-C: Verschiedene Aliquots der vorinkubierten hTrxR wurden nach 0,5, 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten auf ihre Restaktivität getestet. (A) Primärplot, der nach nicht-linearer Regression die Bestimmung der Werte für $K_{I,SN}$ und $K_{I,SC}$ sowie k_i erlaubt. (B) Die Daten für k_{obs} wurden der Gleichung 3.5 angepasst und gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. (C) $t_{1/2}$ versus $1/[inhibitor]^2$ (Gleichung 3.5); Inhibitorkonzentrationen: 0, 8,2, 12,3, 16,4, 24,6 μM. (D) Konzentrationen von **13a**: 0, 4,6, 9,1, 15,2, 23,0 μM. (E) **13b**: 0, 7,3, 13,7, 18,3 μM. (F) **13c**: 0, 9,1, 15,2, 23,0 μM.

Am Anfang folgt die Inaktivierung der TrxR einem Prozess pseudo-erster Ordnung (Gleichung 3.4), der später einen sigmoidalen (zweiphasigen) Verlauf nimmt (Abb. 3.18 E). Der Sekundärplot $t_{1/2}$ versus $1/[\text{Inhibitor}]^2$ zeigt eine lineare Beziehung bei niedrigen Konzentrationen an Inhibitor **20** (Abb. 3.18 C). Für diesen Inhibitor wurde eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung von 0.96 min^{-1} sowie ein $K_{I,SC}$ - bzw. $K_{I,SN}$ -Wert von 30 nM bzw. 42 mM aus den Grafiken A und B in Abb. 3.18 ermittelt. Der Inaktivierungsprozess der anderen Inhibitoren **13a-c** konnte ebenfalls anhand der Gleichung 3.4 beschrieben werden (Abb. 3.18 D-F).

3.4.1.4 Vergleichende Hemmstudien der Thioredoxinreduktase aus *Drosophila melanogaster*

Die TrxR aus *Drosophila melanogaster* besitzt bekannterweise anstatt des C-terminalen Selenocysteins innerhalb der Tetrapeptidsequenz GCUG ein Cystein innerhalb der Sequenz SCCS. Dieses Cystein ist aufgrund der flankierenden polaren Serine aktiver als dasjenige in der Mutantensequenz GCCG (Gromer *et al.*, 2003). Daher war es interessant, die Hemmung verschiedener DmTrxR-Varianten durch die CDDP-Komplexe zu untersuchen, um die C-terminale Interaktion der Reaktionspartner noch etwas genauer zu charakterisieren. Die Inhibitorstudien am Insektenenzym erfolgten im Rahmen der Promotionsarbeit von Judit Jacob und wurden in gleicher Weise wie die am humanen Enzym durchgeführt. Es ergab sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Inaktivierung, die am effektivsten am Wildtyp (SCCS) und am schwächsten an der GCCG-DmTrxR-Mutante war (weitere Details siehe Millet *et al.*, 2005).

3.5 Inhibitorstudie 2: 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe und ihr Einfluss auf den Redoxstoffwechsel verschiedener Gewebe bei Glioblastoma multiforme

Die Charakteristika von 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexen bestehen in ihrer bevorzugten Reaktion mit weichen Nukleophilen wie Proteinthiolen und in einer ungewöhnlichen Substitutionskinetik an der vierten Ligandenbindestelle am Metall aufgrund der starken π -Azidität des polyaromatischen Liganden (Ross *et al.*, 2000). Die 4'-Halogenengruppe im 2,2':6',2''-Terpyridinplatin-Liganden ist wichtig für die Aktivität und das Anion (z.B. NO_3^-) ist entscheidend für die Löslichkeit des Moleküls (Lowe *et al.*, 1999). Diese Platinkomplexe zeigen keine oder nur in geringem Maße Kreuzresistenzen mit Cisplatin, sind bei Ovarialkarzinom effektiver als das bisherige Mittel der Wahl, Carboplatin, und hemmen das Wachstum von Glioblastomzellen *in vitro* (Becker *et al.*, 2001; Lowe *et al.*, 1999). Die zytotoxischen Eigenschaften der Terpyridinplatin-Komplexe wurden beschrieben als Resultat einer Kombination aus DNA-Interkalation (Cusumano *et al.*, 2000; Kurosaki *et al.*, 2003) und einer spezifischen und irreversiblen Hemmung der TrxR (Becker *et al.*, 2001) (Urig *et al.*, 2005a).

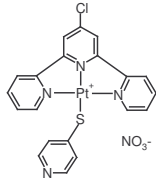
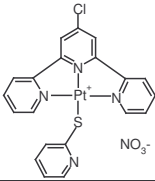
3.5.1 Das Glioblastom-Rattenmodell

Das Ratten-C6 Gliom-Modell ist ein etabliertes *in vivo*-Modell, um therapeutische Effekte in malignen Gliomen zu untersuchen. Es hat mit humanen Glioblastomen gemeinsame Charakteristika wie z.B. den nuklearen Polymorphismus, einen hohen mitotischen Index, Nekroseherde sowie die intratumorale Hämorrhagie und Parenchyminvasion. Die im Rahmen der Terpyridinplatin-Studie notwendigen Tierversuche wurden von Dr. Christel Herold-Mende und Dr. Rezvan Ahmadi (Universitätsklinikum Heidelberg) gemäß den internationalen Tierschutz-Richtlinien für die experimentelle Durchführung von Tierversuchen durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Rattengliom-Zelllinie C6 (ATCC, Rockville, USA) etabliert (in Anlehnung an die Kultivierung entsprechender humaner Zelllinien (siehe Herold-Mende *et al.*, 1999)). Es wurde zunächst gezeigt, dass die beiden Terpyridinplatinkomplexe I₂₃2N und I₂₅2N einen aniproliferativen Effekt auf diese Zellen ausüben (Hemmung der Wachstumsrate um 50% bei $3.5 \pm 0.6 \mu\text{M}$ (I₂₃2N) bzw. $3.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ (I₂₅2N)). Die Tumorzellen wurden dann den Ratten injiziert (Ahmadi *et al.*, 2005). In Abhängigkeit des Tumorwachstums wurden zwei verschiedene therapeutische Strategien verfolgt. Aus früheren Zellkulturstudien war bekannt, dass die durch Terpyridinplatin-Komplexe verursachten Effekte 67 h nach Einsatz der Behandlung deutlich erkennbar sind (Becker *et al.*, 2001). Im ersten Ansatz wurde die Therapie nach der vollständigen Tumorausbildung (MRI¹²-Detektion) gestartet, 9 Tage nach der Zellimplantation ("späte Therapie"). Diese setzte sich aus einer dreifachen Gabe verschiedener Dosen I₂₃2N (4-Mercaptopyridin(4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridin)platin(II)-Nitrat) (25, 35 und 50 mg/kg Körpergewicht) an den Tagen 9, 11 und 13 nach der Tumorumplantation zusammen. Das Zeitfenster ab Tag 9 wurde gewählt, damit der Tumor groß genug, nicht aber dominierend und daher irreparabel wurde im Hinblick auf den

¹² MRI, *magnetic resonance imaging*, beruht auf dem Prinzip der Magnetresonanz (NMR), bei der die Energie gemessen wird, die unter Einfluss eines von außen angelegten starken Magnetfeldes bei Relaxation des durch einen kurzen Hochfrequenzpuls angeregten Kernspins aus dem Körper in Form von elektromagnetischer Wellen austritt (aus Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, Berlin: de Gruyter, 1998). Magnetresonanztomografische Untersuchungen im Tiermodell (C6-Gliom) anhand diffusionsgewichteter Aufnahmen. Eine kritische Tumorgröße muss für eine gute MRI-Auflösung erreicht sein (0.2 mm^3).

chemotherapeutischen Einfluss. Zwei Ratten, die 35 mg/kg I₂₃2N in sukzessiven Dosen erhielten, wurden direkt nach der letzten Gabe geschlachtet, um frühe metabolische Effekte im Zusammenhang mit der Therapie zu untersuchen. Eine zweite Therapie während der Wachstumsphase des Tumors ("frühe Therapie") wurde durch die dreimalige Gabe von 35 mg/kg I₂₃2N (bzw. 15, 25 mg/kg I₂₅2N (2-Mercaptopyridin(4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridin)platin(II) Nitrat) an den Tagen 4, 8 und 12 postimplantativ realisiert. Die Einteilung der Tiere in die verschiedenen Therapiegruppen und deren Anzahl in den Analysen sind in Tabelle 3-IV zu finden.

Tabelle 3-IV: Rattengruppen mit Glioblastoma multiforme, den verschiedenen Therapiegruppen zugeordnet. n_{total} bezeichnet die Gesamtzahl der Tiere in einer Gruppe, $n_{biochem.}$ die Anzahl der Tiere, die in den biochemischen Analysen eingesetzt wurden. Die späte Therapie startete am Tag 9 nach der Tumorzell-Implantation und wurde an Tag 11 und 13 fortgesetzt. Die frühe Therapie startete am Tag 4 und wurde an den Tagen 8 und 12 fortgesetzt. Angegeben sind die applizierten Substanzdosen in mg pro kg Körpergewicht, die bei einer Einzelinjektion appliziert wurden.

Gruppe	Therapie	Inhibitor	n_{total}	$n_{biochem.}$	
A	25 mg/kg, späte Therapie	I ₂₃ 2N		6	3
B	35 mg/kg, späte Therapie	I ₂₃ 2N		3	2
C	50 mg/kg, späte Therapie	I ₂₃ 2N		2	2
D	35 mg/kg, frühe Therapie	I ₂₃ 2N		9	2
E	15 mg/kg, frühe Therapie	I ₂₅ 2N		3	/
F	25 mg/kg, frühe Therapie	I ₂₅ 2N		3	/

Am Tag 15 nach der Tumorzellimplantation mussten alle Tiere getötet werden, da die neurologischen Defekte in den Kontrolltieren ohne Behandlung bereits zu deren Tod führten. Gesammelte Blutproben aller Tiere sollten Aufschluss über potentielle toxischen Wirkungen geben. Parameter wie Hämoglobin (Hb), Zellzahl, weiße und rote Blutzellen (WBC, RBC), Kreatinin (Cr), Serum Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (SGOT), Serum Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT), Stickstoff im Blut-Harnstoff (BUN), Alkalische Phosphatase (AP) und Bilirubin wurden bestimmt. Gewebeproben von Hirntumor, kontralateralem Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Haut, Darm, Herz, Muskel und Milz wurden präpariert und standen weiteren histologischen und biochemischen Analysen zur Verfügung.

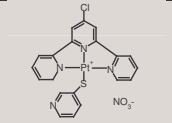
Die durchgeführten MRI-Analysen zwischen den Tagen 9 und 15 zur Erfassung der Tumorgöße ergaben eine dosis-abhängige Reduktion von 22% bei später Therapie mit 25 mg/kg und im Durchschnitt eine Reduktion von 36% bei später Therapie mit 35 mg/kg I₂₃2N im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings war die höchste Dosis von 50 mg/kg für die meisten Tiere letal. Die früh gestartete Therapie mit 35 mg/kg I₂₃2N führte mit einer um 40% reduzierten Tumorgöße zu leicht besseren Werten. Der Therapieeffekt für I₂₅2N war ähnlich, mit etwas deutlicheren dosisabhängigen Unterschieden.

Die metabolischen Blutparameter der Leber- und Nierenfunktion in den Therapie- und Kontrollgruppen unterschieden sich nicht signifikant, so dass man davon ausgehen kann, dass die Terpyridinplatinbehandlung gut vertragen wird.

3.5.2 Enzymaktivitäten und Gesamtglutathion in Extrakten verschiedener Gewebe

Da insbesondere die Effekte auf den Redoxstoffwechsel interessierten, wurden 10 Gewebeproben für anschließende Enzymbestimmungen entsprechend aufbereitet (Abschnitt 2.2.5) und die Extrakte in den vier Assaysystemen zur Bestimmung von TrxR, GR, GPx und GST eingesetzt. In Tabelle 3-V sind die Ergebnisse ausgewählter Gewebe zusammengefasst.

Tabelle 3-V: Aktivitäten der TrxR, GPx, GR und GST [mU/mg Protein] in ausgewählten Geweben von I₂₃2N-behandelten Ratten (B, Behandlung) (n = 5, 25/50 mg/kg) und Kontrollratten (K, Kontrolle) (n = 6) (Ausnahmen sind angegeben). *n(B) = 4, *Signifikanz (p < 0.05). Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen der jeweiligen Tiergruppe.

	Enzymaktivität [mU/mg Gesamtprotein]							
	TrxR		GPx		GR		GST	
	K	B	K	B	K	B	K	B
Hirn, gesund	23.3 ± 3.5	24.9 ± 6.5	117 ± 32	99.8 ± 42.5	115 ± 21	146 ± 81	49.7 ± 18	65.2 ± 18
Hirntumor⁺	28.5 ± 5.9	20.0[*] ± 4.8	260 ± 98	203 ± 103	116 ± 29	111 ± 58	33.4 ± 16.8	39.2 ± 15.6
Niere	34.9 ± 5.4	20.0[*] ± 4.8	924 ± 294	957 ± 174	422 ± 123	384 ± 116	89.8 ± 63.6	103 ± 23
Muskel	9.4 ± 1.4	7.4[*] ± 0.8	195 ± 52	167[*] ± 26	21.8 ± 4.7	21.8 ± 3.6	18.0 ± 4.4	20.2 ± 3.3
Lunge	11.8 ± 2.2	15.8 ± 1.1	358 ± 40	340 ± 74	56.7 ± 22.9	85.1[*] ± 17.1	45.5 ± 18.8	63.0 ± 24.7

Signifikante Unterschiede in der TrxR-Aktivität wurden in Hirntumor, Niere, Muskel und Haut und in der GR-Aktivität wurden in der Lunge beobachtet. Darüber hinaus war die GST-Aktivität in sieben Geweben erhöht, was auf ihre Hochregulation unter Medikamenteneinfluss schließen lässt. Im Gegensatz dazu waren die Aktivitäten der beiden Selenenzyme TrxR und GPx in den meisten Geweben reduziert. Die Konzentration an Gesamtglutathion (Abschnitt 2.2.3.4.4) variierte in den Geweben von 0.4 ± 0.2 mM bis 1.6 ± 0.1 mM und lag daher im physiologischen Bereich von 0.2-10 mM (Anderson, 1998).

Die Resultate einer detaillierten Analyse der gewebespezifischen Variation der Aktivität von TrxR und GPx sind in Abbildung 3.19 dargestellt. Die TrxR-Aktivität war am höchsten in Darm, Niere, Leber und auch im Hirntumor der Kontrolltiere. In letzterem Gewebe aller therapierten Tiere wurde die TrxR-Aktivität signifikant gehemmt (p < 0.05). Diese Hemmung war im gesunden Gehirn weniger deutlich und weist auf eine gewisse Spezifität der Chemotherapeutika für das Tumorgewebe hin. In der Niere war die TrxR-Aktivität ebenfalls signifikant gehemmt (p < 0.0005). Deutliche Unterschiede in den Therapiegruppen waren im Darm zu verzeichnen. Auffallend hierbei war die Verdopplung der TrxR-Aktivität in Therapiegruppe B und ist somit ein Indiz für eine mögliche kompensatorische Hochregulation der TrxR, die auch ein Ergebnis früherer Zellkulturstudien war (Becker *et al.*, 2001). In der metabolisch hochaktiven Leber waren die Behandlungseffekte variabel im Gegensatz zur Haut, in der die TrxR-Aktivität in allen Therapiegruppen gleichermaßen deutlich erniedrigt war. Die Effekte auf das zweite Selenenzym GPx waren trotz der bekannten TrxR-Spezifität von I₂₃2N *in vitro* in diesen Geweben bedeutend. Die Behandlung mit I₂₃2N führte in fast allen (Ausnahme: Niere) Geweben zu einem deutlichen Abfall der GPx-Aktivität.

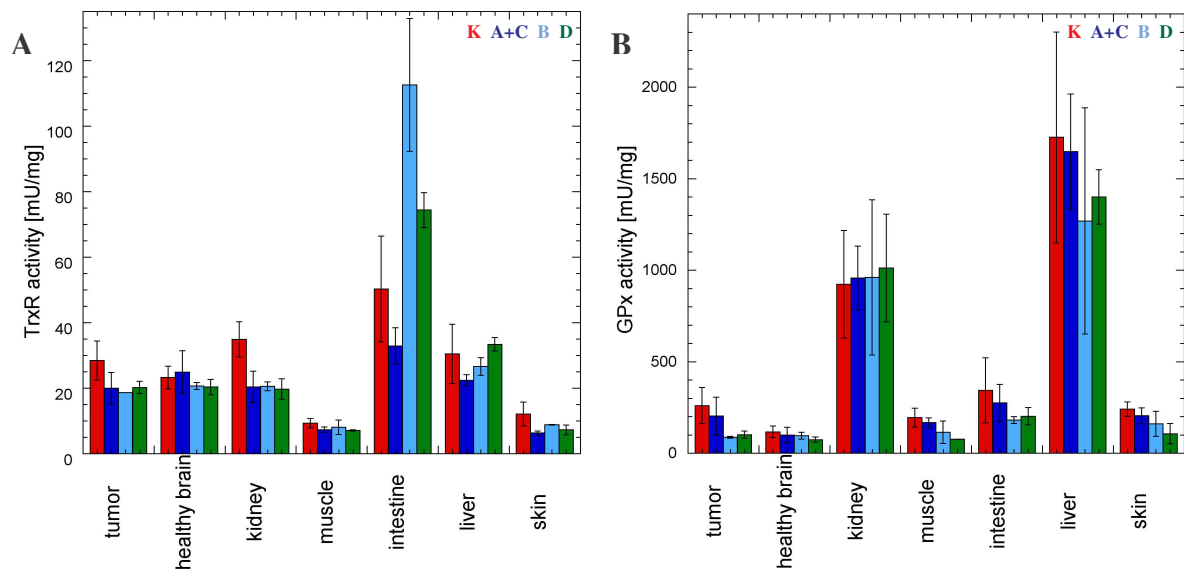


Abb. 3.19: Gewebespezifische Variation der TrxR-Aktivität (A) und GPx-Aktivität (B) [mU/mg Protein]. Verschiedene Therapiegruppen ($I_{23}2N$ -Behandlung) sind berücksichtigt: Kontrollgruppe **K** ($n = 6$ mit Ausnahme des Darms ($n = 5$)); Gruppe **A+C** (25 + 50 mg/kg in der "späten Therapie"); Gruppe **B** (35 mg/kg in der "späten Therapie"); Gruppe **D** (35 mg/kg in der "frühen Therapie"). Gegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.¹³

3.5.3 Selen- und Platinbestimmungen in Geweben

Der Elementgehalt von Platin und Selen wurde in einigen ausgewählten Geweben ermittelt (Urig *et al.*, 2005a). Im Rahmen der Neutronenaktivierungsanalyse wurden die Gewebeprobe in Ampullen bei 50°C getrocknet und in einem Reaktor zusammen mit bekannten Standards für 11 Tage bestrahlt. Die Strahlungsaktivität der Proben wurde nach 6-27 Tagen bestimmt.

Da der Selengehalt im Tumorgewebe unter Behandlung nicht verändert war (0.7 ± 0.1 mg/kg Trockenmasse) und gleichzeitig dort Platin gemessen werden konnte (3.3 mg/kg Trockenmasse), ist anzunehmen, dass der Effekt auf die TrxR im Gehirn auf die Hemmung durch $I_{23}2N$ zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die cerebrale TrxR-Aktivität bei Selenmangel nicht beeinflusst wird. Die um 20% verringerte cerebrale Aktivität der GPx, die auf veränderte Selenlevel sehr empfindlich reagiert, spricht auch für den Effekt von $I_{23}2N$ auf die TrxR. Eine dosisabhängige Erhöhung des Platiningehaltes konnte aufgrund des niedrigen Konzentrationsbereiches (Tumormasse als limitierender Faktor) nicht herausgearbeitet werden.

3.5.4 TAOS und andere Blutparameter

Die zuvor beschriebenen Analysen der metabolischen Blutparameter wurden noch durch die Redoxparameter erythrozytäres GSH, Totaler Antioxidativer Status (TAOS) und die Enzymaktivitäten der GR, GST und GPx ergänzt. Auch diese Parameter blieben unter der Platintherapie stabil und zeigten nur marginale Effekte (Abb. 3.20). Insgesamt können somit stärkere Begleiterscheinungen als kritische Faktoren dieser Chemotherapie ausgeschlossen werden.

¹³ Die Aktivitäten von TrxR bzw. GPx in Lunge, Milz und Herz sind hier nicht aufgeführt (sehr ähnliche Werte für Kontrolltiere und $I_{23}2N$ -behandelte Tiere).

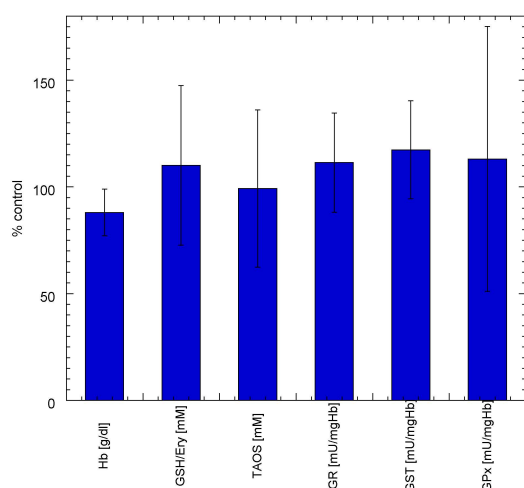


Abb. 3.20: Redoxparameter im Blut (von links nach rechts: Hb, Hämoglobin [g/dl]; GSH im Erythrozyten [mM]; Totaler Antioxidativer Status (TAOS) [mM]; GR-, GST-, GPx-Aktivitäten [mU/mg Hb]). Angegeben sind die Werte (Mittelwerte \pm Standardabweichung) der behandelten Ratten (Therapiegruppe A+C, 25 + 50 mg/kg I₂₃2N) relativ zu den Werten der unbehandelten Kontrollratten (% control).

3.5.5 Bioverfügbarkeit

Die Möglichkeit des Transfers der Platingruppen in 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexen auf verschiedene physiologische Thiole wurde bereits bestätigt (Ross *et al.*, 2000) und gab den Anlass für den Test des hemmenden Effektes von platinierterem GSH (I₂₃2N-GSH) und rekombinantem humanem Serumalbumin (I₂₃2N-HSA) auf die isolierte TrxR. Die DTNB-Reduktion der TrxR wurde durch diese Konjugate deutlich gehemmt (50% Enzymhemmung bei 20 bzw. 80 nM nach 10 Minuten Vorinkubation von reduziertem Enzym), wenn auch um den Faktor 5 bzw. 20 schlechter als durch den freien Inhibitor I₂₃2N. Damit waren diese Verbindungen wesentlich bessere Inhibitoren als das beschriebene Glutathionkonjugat von Cisplatin (Arnér *et al.*, 2001).

3.5.6 Apoptosetests an Glioblastomzellen

Da die Apoptoseinduktion ein häufig beobachteter Effekt von Chemotherapeutika ist und auch durch die TrxR-Hemmung ausgelöst werden kann (keine Trx-unterstützte Zulieferung von Nukleinsäurebausteinen mehr), ist es interessant, ob I₂₃2N ebenfalls einen apoptotischen Effekt hat. Verschiedene Apoptosetests an humanen Glioblastomzellen wurden zur Analyse unabhängiger Apoptosemarker (Kernfragmentierung, Chromatinkondensation, Externalisierung von Phosphatidylserin) optimiert (Begemann *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001; Pommepuy *et al.*, 2003). Zellmorphologische Untersuchungen (Abb. 3.21 A) wurden ergänzt durch die Zellkernfärbung mittels des DAPI-Farbstoffes (Abb. 3.21 C) sowie die terminale Markierung von DNA-Stücken (TUNEL-Test) (Abb. 3.21 B) und die Markierung des Phosphatidylserins mit Annexin (Abschnitt 2.2.6.1.2). Zur Auswertung der letzten Markierungsmethode wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde eine klar positive Apoptose bei den mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin (ad 1 μ M) behandelten Zellen beobachtet (bis zu 50% apoptotische Zellen in einer Population). Allerdings führte die Inkubation mit 15 μ M I₂₃2N nur zu weniger als 15% apoptotischen, zusammen mit nekrotischen Zellen und die Morphologie der lebenden Zellen war im Gegensatz zu den staurosporinbehandelten Zellen kaum verändert.

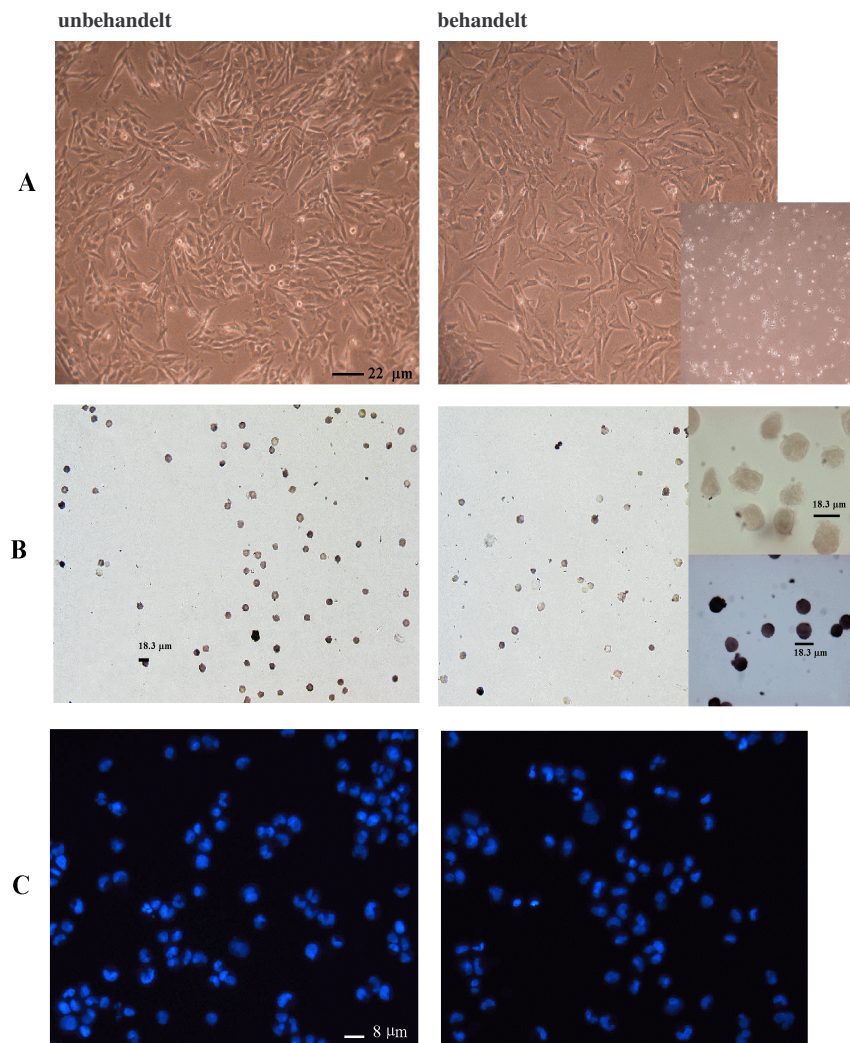


Abb. 3.21: Sichtbarmachung von apoptotischen Markern in Glioblastomzellen (Zelllinie 89) anhand verschiedener Färbetechniken und mikroskopischer Analysen. Gezeigt sind lichtmikroskopische (A, B) und fluoreszenzmikroskopische (C) Aufnahmen von unbehandelten Zellen (linke Seite) und von mit $15 \mu\text{M}$ $\text{I}_{23}2\text{N}$ behandelten Zellen (rechte Seite). (A) Zellmorphologie (200-fache Vergrößerung). Das kleine Bild auf der rechten Seite zeigt den starken Hemmeffekt von $1 \mu\text{M}$ Staurosporin, der zum Verlust der Zelladhärenz führt. (B) TUNEL-Färbung (terminal dUTP nick end labeling), die TUNEL-Reagenz ist mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt, deren Reaktion mit BCIP/NBT eine Indigo-Blaufärbung hervorruft (100-fache Vergrößerung der Zellen). Zum Vergleich sind in den rechten Abbildungen kleineren Formats oben eindeutig negative und unten eindeutig positiv-gefärbte Zellen gezeigt (600-fache bzw. 400-fache Vergrößerung). (C) DAPI-Färbung. Die Kernstrukturen sind blau gefärbt (200-fache Vergrößerung).

3.5.7 Microarray-Analyse zur Detektion von chemotherapeutischen Veränderungen auf Transkriptionsebene

Zu den weiterführenden Untersuchungen der Effekte von Terpyridinplatin-Komplexen gehörte die cDNA-Microarray-Analyse, die im Rahmen der Promotionsarbeit von Klaus Steiner (DKFZ Heidelberg) durchgeführt wurde. Anhand dieser Genexpressionsanalyse sollten die Zielgene für den Terpyridinplatin-Komplex $\text{I}_{23}2\text{N}$ identifiziert werden. Als Referenzgen diente das Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Verwendet wurde ein selbst hergestellter Chip, der u.a. 4092 hirn- und gliomenspezifische

DNA-Spots enthielt (Selektion der cDNA-Klone über *Human UniGene 1*, dem deutschen Zentrum für Genomforschung). Des Weiteren wurde RNA aus Glioblastomzellen (Zelllinie NCH 89) vor und nach Behandlung isoliert und amplifiziert (Van Gelder *et al.*, 1990), in cDNA umgeschrieben und mittels zwei verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3 und Cy5) markiert. Die markierte cDNA wurde als *target* in der Nukleinsäure-Hybridisierung mittels des Glas-Microarrays eingesetzt und die Fluoreszenzunterschiede der Proben detektiert. In jeder Untersuchungsgruppe wurden je zwei Arrays mit jeweils anderer Fluoreszenzmarkierung analysiert und die Fluoreszenzmarkierung einmal zwischen den Gruppen getauscht. Die Expressionslevel konnten nach aufwendigen Transformationen über die Spotintensitäten auf dem Microarray bestimmt werden (Buness *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2002) (am besten unterscheidbare Klone der Kontroll- und Behandlungsgruppe wurden einer etablierten Softwareanalyse unterzogen (*Significance Analysis of Microarrays*, SAM, <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>)).

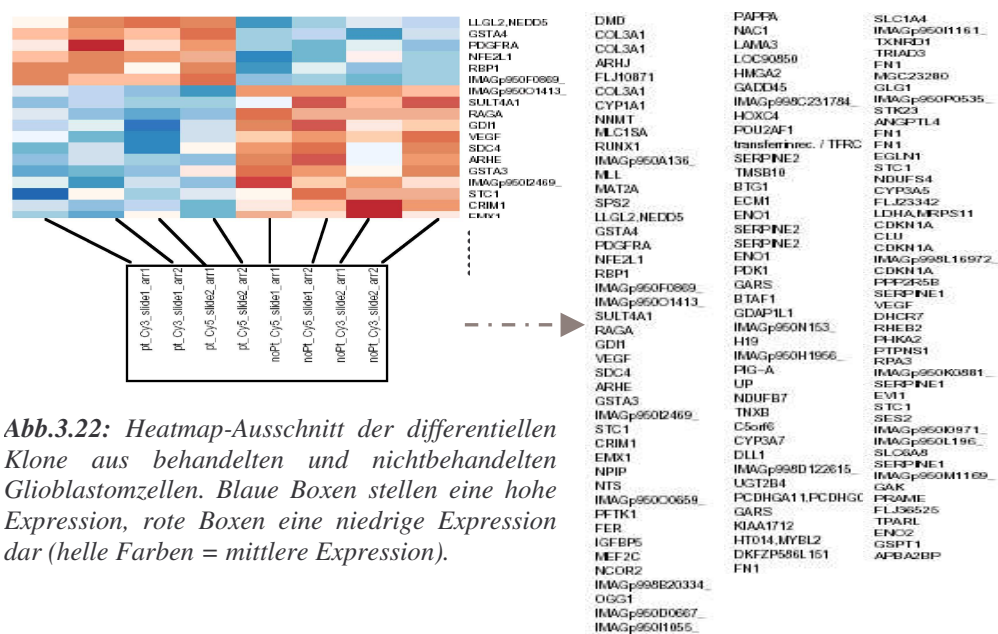


Abb.3.22: Heatmap-Ausschnitt der differentiellen Klone aus behandelten und nichtbehandelten Glioblastomzellen. Blaue Boxen stellen eine hohe Expression, rote Boxen eine niedrige Expression dar (helle Farben = mittlere Expression).

Im Folgenden werden einige Gene vorgestellt, die sich unter den 21 negativ regulierten und 113 positiv regulierten Genen befanden und gute statistische Werte aufwiesen. Bei der negativen Regulation war kein Gen um mehr als zweifach reguliert. Neben Genen, die am Zytoskelett-Aufbau beteiligt sind und einigen nuklearen Faktoren, tauchten solche mit Entgiftungsfunktion (GST A4 mit potentieller GPx-Aktivität, CYP1A1, *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1* (siehe auch Fußnote auf S. 20)), aber auch die Selenophosphat synthetase 2 auf (beteiligt an der Selenocystein-Synthese), die um den Faktor 0.6 reguliert war.

Die positive Regulation umfasste eine weitaus größere Zahl interessanter Gene, darunter insbesondere die TrxR (Faktor 1.9!) und solche, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind (GSPT1, CDKN1A, GADD45A, Cyclin G-assoziierte Kinase, Gennamen siehe Tabelle 2-IX). Ihre Regulationen sind in Abb. 3.21 zusammen mit den *Real-Time*-PCR-Ergebnissen aufgeführt. Das am stärksten regulierte Gen war GSPT1, welches während des Zellzyklus am Übergangsprozess von der G1- zur S-Phase beteiligt ist. Der Wert für CDKN1A (auch als p21 oder Cip1 bezeichnet), einem in der G1-Phase aktiven Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen, war mit 3.1 der zweitstärkste Faktor.

3.5.8 Validierung interessanter Gene mittels RT-PCR

Eine Validierung einiger interessanter, in der Microarray-Analyse regulierter Gene und anderer Gene, die für Redoxproteine kodieren oder an der Zellzyklus- oder Apoptoseregulation beteiligt sind, fand mittels *Real-Time-PCR* (RT-PCR) statt (Details siehe Abschnitt 2.2.1.3). Die dabei angewendete SBYR Green-Methode erlaubte den Expressionsvergleich von Genen in behandelten und unbehandelten Proben durch die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung (Pfaffl, 2001). Als Referenzgene dienten GAPDH und 18S rRNA, allerdings erwies sich letzteres *housekeeping*-Gen als konstantere Referenz, mit stabilen Regulationswerten und geringeren Standardabweichungen der C_t -Werte. Die Expression des GAPDH-Gens kann seinerseits über die Trx-Expression reguliert werden (Kontou *et al.*, 2004). Dies spielte im vorliegenden Fall aber keine Rolle, da die Trx-Expression bei der RT-PCR-Analyse in den behandelten Proben nicht reguliert war.

Die in der Microarray-Analyse mit deutlichen Faktoren regulierten Gene CDKN1A und GADD45A konnten durch die RT-PCR bestätigt werden. Eine Regulation von GSPT1 war allerdings bei dieser Genexpressionsanalyse kaum zu erkennen (Abb. 3.23).

Die Regulationen der Gene des Redoxmetabolismus waren variabel, so konnte das TrxR-Gen nur als leicht hochreguliert (Faktor 1.2), das GR-Gen aber als deutlich (zweifach) herunterreguliert und das GPx-Gen als moderat hochreguliert (Faktor 1.5) charakterisiert werden. Der Einfluss auf Zellzyklus- und Apoptosegene lag im Bereich unter 1, allerdings fiel eine stärkere Regulation des Fas-Gens auf.

Da im Rahmen der Terpyridinplatin-Glioblastom-Studie auch 2D-Gelelektrophoreseexperimente durchgeführt wurden, wurden ein paar weitere Gene in die RT-PCR-Analyse mit aufgenommen, die nach ersten Analysen auf Proteinebene deutlich reguliert erschienen, wie z.B. NDRG1 (*n-Myc downstream regulated gene*), welches den insgesamt höchsten Regulationsfaktor von 18.8 besaß.

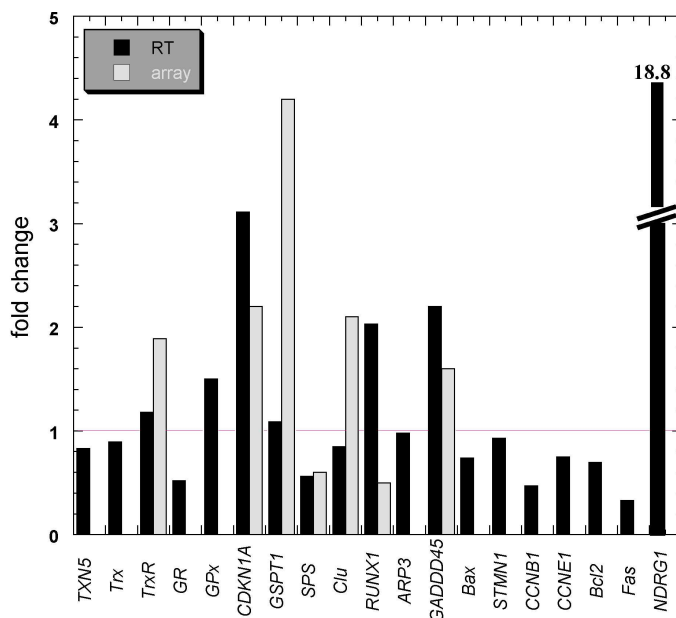


Abb. 3.23: Relative Quantifizierung der Expression verschiedener Gene nach Behandlung mit $I_{232}N$. Die fold-change-Werte beziehen sich auf das Referenzgen 18S und sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Bestimmungen mit jeweils vier einzelnen Messungen pro Gen (Standardabweichungen der errechneten C_t -Werte betragen < 0.1). Werte > 1 (< 1) charakterisieren hochregulierte (herunterregulierte) Gene. Da der Wert für NDRG1 im Vergleich zu den anderen Genen deutlich höher liegt, ist der Ergebnisbalken verkürzt und der entsprechende Faktor vermerkt. Beschreibungen der Gennamen und accession numbers sind in Tabelle 2-IX zu finden. GADD45A ist beim Wachstumsarrest beteiligt, wird bei DNA-Schädigung induziert und stellt daher einen Link zwischen dem p53-abhängigen Zellzyklus-Kontrollpunkt und der DNA-Reparatur her.

3.5.9 2D-Gelelektrophorese mit Zellextrakten zur Detektion von chemotherapeutischen Veränderungen auf Translationsebene

Im Rahmen der Promotionsarbeit von Saša Končarević sollten die Effekte der Terpyridinplatin-Komplexe I₂₃2N und I₂₅2N auf der Proteinebene untersucht werden, um über die Genebene hinaus weitere, langfristige *targets* zu identifizieren. Die Analysen werden momentan abgeschlossen und sollen hier nur kurz mit ihren wichtigsten Ergebnissen vorgestellt werden. Die in der 2D-Gelelektrophorese als regulierte Spots auftretenden Proteine wurden anschließend mittels Massenspektrometrie und Sequenzierung identifiziert (Details zu den allgemeinen Methoden in Deponte *et al.*, 2005 und Koncarevic *et al.*, 2005).

Die Behandlung mit den Terpyridinplatin-Komplexen führt zu einem Zytoskeletumbau mit deutlichen Veränderungen in der Proteinzusammensetzung (Aktin, Tubulin, Vimentin, Fascin). Die stärkste Variation unter allen regulierten Proteinen erfolgt (wie schon zuvor im Abschnitt über die RT-PCR besprochen) bei NDRG1 (Faktor 15). Zu weiteren regulierten Proteinen gehören ARP3 (hier Faktor 2.4, bei der RT-PCR nur um die 1), STMN1 (Faktor 0.6, Regulation erfolgt über Phosphorylierung, die per Massenshift gezeigt werden konnte), PRDX4, Thioredoxin-abhängige Peroxidase AO372 (Faktor 1.83) und der eukaryotische Elongationsfaktor EIF5A (Faktor 0.65, nur im behandelten Proben spot detektierbar, besondere Modifikation: Hypusin, post-translationale Modifikation eines Lysins durch eine Butylaminogruppe von Spermidin).

3.6 Inhibitorstudie 3: Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der Inhibition von Thio-redoxin- und Glutathionreduktase durch Phosphol-Komplexe

Die vorangegangenen Inhibitorstudien zeigen, dass Platin(II)-Verbindungen mit unterschiedlicher Ligandenstruktur, die ihre Eigenschaften über das DNA-*crosslinking* hinaus über eine spezifische und irreversible TrxR-Hemmung ausüben, damit nach wie vor interessante Chemotherapeutika darstellen. Eine Erweiterung des chemotherapeutischen Repertoires ergibt sich aus den für diese Zwecke erst kürzlich entdeckten Phosphol-Verbindungen, die ebenfalls in der Lage sind, Redoxenzyme wie die TrxR, aber auch die GR zu inaktivieren (Deponte *et al.*, 2005; Irmeler *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier neu synthetisierte, zwei Gold, Au(I)-, und zwei Platin, Pt(II)-koordinierte Phosphol-Komplexe auf ihre Eigenschaften als Disulfidreduktase-Inhibitoren und die damit verbundenen Konsequenzen für die Zelle untersucht (Urig *et al.*, 2005b). Unterstützt werden sollten diese Untersuchungen durch die Aufklärung der molekularen Struktur eines Protein-Phospholkomplexes.

Auf Phospholen basierende π -konjugierte organische Systeme besitzen eine schwache Aromatizität und ein zentrales nukleophiles Phosphoratom (Fave *et al.*, 2003; Hay *et al.*, 2003; Hay *et al.*, 2001), welches mit Schwermetallionen chemisch modifiziert und somit für die Reaktion mit Thiolen (Selenolen) interessant werden kann.

2-Pyridylphosphole stellen veränderbare Liganden für Übergangsmetalle wie Au(I) und Pt(II) zur Verfügung (Hay *et al.*, 2003; Hay *et al.*, 2001). Sie können, abhängig von der Natur des Metallzentrums, als ein- oder zweiseitige Liganden agieren und weisen variable Substitutionsmöglichkeiten auf. Ihre strukturelle Vielseitigkeit macht sie zu interessanten Kandidaten für molekulare Inhibitorstudien.

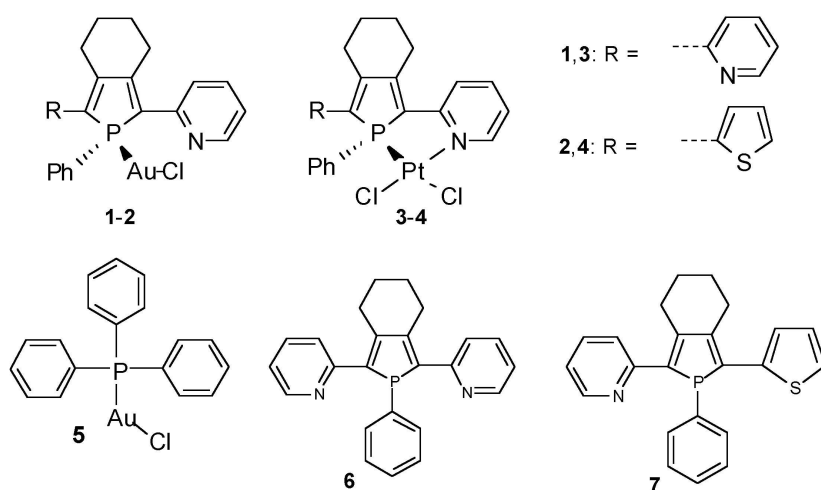


Abb. 3.24: Strukturformeln der in dieser Inhibitorstudie verwendeten neu synthetisierten Phospholkomplexe (1-4) und der bekannten Vergleichssubstanz [PPh₃AuCl] (5). Weiterhin sind die Strukturformeln der beiden freien Phospholliganden (6,7) vergleichend dargestellt, die bereits in früheren TrxR-Studien zum Einsatz kamen (Irmeler *et al.*, 2002).

3.6.1 Kinetische Charakterisierung der Hemmung der humanen Glutathionreduktase durch Phosphol-Verbindungen

Zeitabhängige Kinetiken an der hGR zeigten, dass die Goldkomplexe **1** und **2** im unteren nanomolaren Bereich effektiv arbeiten (Tabelle 3-VI) und dass sie mindestens zwei Größenordnungen aktiver als die entsprechenden Platinkomplexe **3** und **4** sind.

Tabelle 3-VI: Inaktivierung reduzierter hGR (1.4 nM UE), hTrxR-WT (4.8 nM, DTNB-Assay; 24 nM Trx-Assay) und hTrxR-Mutanten (1.8 μM hTrxR^{U498C}, 100 nM hTrxR Δ 16, Δ 8) nach 10-minütiger Inkubation mit den Inhibitoren **1-4** ($i_{0.5}$). Der obere Teil bezieht sich auf die Hemmung der Wildtyp-Enzyme, der untere Teil auf die Hemmung der Mutanten-Enzyme; nd, nicht detektiert.

		Phosphol-Komplex			
		1	2	3	4
$i_{0.5}$ (nM)	hTrxR-WT (20 μM hTrx ^{C72S})	6.9	7	6.7	8
	hTrxR-WT (3 mM DTNB)	0.8	1	2	1.1
	hGR (100 μM GSSG)	1	2	1000	400
$i_{0.5}$ (μM)	hTrxR ^{U498C} (20 μM hTrx ^{C72S})	0.9	1.9	2	2.4
	hTrxR ^{U498C} (3 mM DTNB)	2.5	3	32.7	22
	hTrxR Δ 16 (3 mM DTNB)	1.7	nd	30	nd
	hTrxR Δ 8 (3 mM DTNB)	1	nd	12.5	nd

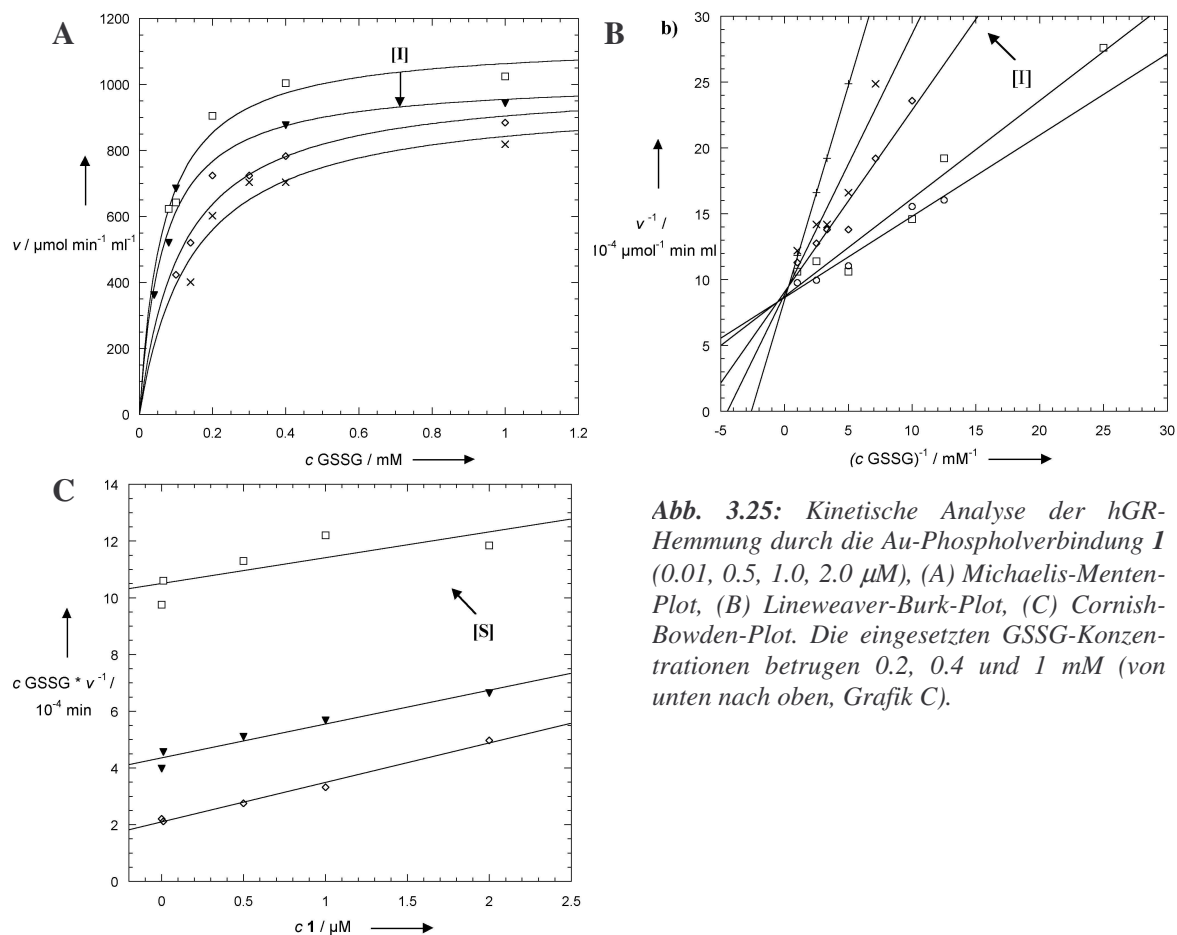


Abb. 3.25: Kinetische Analyse der hGR-Hemmung durch die Au-Phospholverbindung **1** (0.01, 0.5, 1.0, 2.0 μM), (A) Michaelis-Menten-Plot, (B) Lineweaver-Burk-Plot, (C) Cornish-Bowden-Plot. Die eingesetzten GSSG-Konzentrationen betragen 0.2, 0.4 und 1 mM (von unten nach oben, Grafik C).

Die Hemmung der hGR durch die Au-Phosphol-Verbindung **1** wurde bereits in einer anderen Studie im Rahmen dieser Arbeit mittels *steady-state*-Kinetiken intensiv untersucht (Deponte *et al.*, 2005). Dabei stellte sich heraus, dass die Hemmung von hGR(E_{ox}) bei hohen Inhibitorkonzentrationen kompetitiv ist (Abb. 3.25), d.h. die Geraden schneiden sich im Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 3.25 B) in einem Punkt auf der Ordinate bzw. verlaufen parallel im Cornish-Bowden-Plot (Abb. 3.25 C). Aus dem Sekundärplot nach Auftragung von K_M/K_i versus $[I]$ (vgl. Abb. 3.16 A, kleine Grafik) und der allgemeinen Geschwindigkeitsgleichung für kompetitive Hemmungen (Gleichung 3.2) ergibt sich ein K_i -Wert (K_{ic}) von $0.47 \pm 0.06 \mu\text{M}$. Die alternative Bestimmung der Inhibitionskonstante (Becker *et al.*, 2001) über die Gleichung $K_{ic} = K_M \cdot [I]/(K_M' - K_M)$ liefert einen nahezu gleichen Wert. K_M' dieser Gleichung ist die apparente Michaeliskonstante in Anwesenheit des Inhibitors und lässt sich aus den Abszissenschnittpunkten des Lineweaver-Burk-Plots ermitteln. Der K_M -Wert für GSSG in Abwesenheit von Inhibitor **1** beträgt $71 \mu\text{M}$. Der K_M -Wert für NADPH ändert sich nicht signifikant bei Zugabe von 0.65 - $2.5 \mu\text{M}$ Inhibitor, so dass seine Konkurrenz mit NADPH auf der *re*-Seite des Flavins auszuschließen ist. Die Vorreduktion der hGR mit NADPH spielt bei der *steady-state*-Kinetik eine Rolle. Während bereits 1 nM der Verbindung **1** ausreichen, um 50% aller reduzierten hGR-Moleküle (EH_2) (0.7 nM) zu inaktivieren, bedarf es 6.2 nM der Verbindung, um diesen Effekt an der hGR(E_{ox}) hervorzurufen. Die Abnahme der Aktivität von $0.1 \mu\text{M}$ hGR(EH_2) in Anwesenheit von 1-3 Äquivalenten Verbindung **1** ist zeitabhängig und folgt bei 4°C einer Kinetik pseudo-erster Ordnung (vgl. Abschnitt 3.4.1.3). In einem anderen Ansatz wurden 1.7 nM hGR (E_{red} , EH_2) mit 1-3 Äquivalenten Verbindung **1** bei 25°C inkubiert und die Hemmung über die Zeit verfolgt. Die Abnahme der hGR-Aktivität folgt bei dieser Temperatur einer Kinetik zweiter Ordnung mit $k_2 = 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($dv/dt = k_2 \cdot [I] \cdot [hGR]$) (siehe auch Davioud-Charvet *et al.*, 2003). Aus der Abhängigkeit der Enzyminaktivierung von der Inhibitorkonzentration kann die Stöchiometrie der Bindung bestimmt werden. Aus der Auftragung der Enzymaktivität gegen die Inhibitorkonzentration und der Extrapolation auf die Abszisse kann ein Anteil von 1-1.5 Äquivalenten Inhibitor **1** pro eingesetzter hGR (FAD-haltiger Untereinheit) abgeschätzt werden (Deponte *et al.*, 2005). Die kompetitive Hemmung der hGR(E_{red}) in Bezug auf GSSG hatte bei der Pt-Phosphol-Verbindung **3** mit einem höheren K_i -Wert von $19.7 \pm 0.48 \mu\text{M}$ mehr Gewicht als die zuvor beschriebene Hemmung durch die Verbindung **1** (K_i -Wert von $0.47 \pm 0.06 \mu\text{M}$) (Abb. 3.26). Die Konkurrenz trägt somit maßgeblich zum Hemmeffekt der Platinkomplexe bei, da ihre K_i -Werte im $i_{0.5}$ -Bereich liegen und das zuvor mit Inhibitor inaktivierte Enzym nach Entsalzung mehr als 60% seiner Aktivität wiedererlangt.

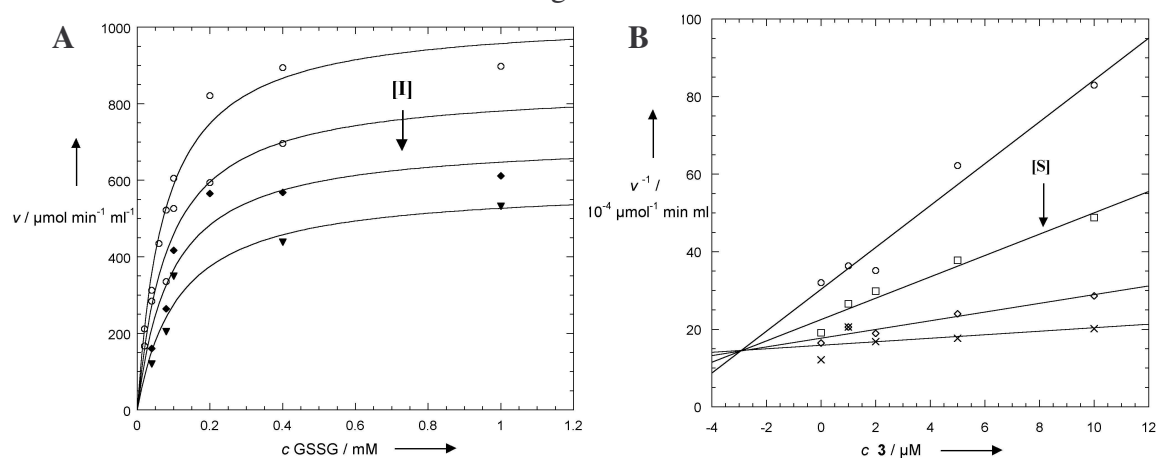


Abb. 3.26: Kinetische Analyse der hGR-Hemmung durch die Pt-Phosphol-Verbindung **3** (0 - $10 \mu\text{M}$), (A) Michaelis-Menten-Plot, (B) Dixon-Plot. Unter der Annahme einer initial kompetitiven Hemmung wurde ein K_i -Wert von $19.7 \pm 0.48 \mu\text{M}$ ermittelt (Sekundärplot mit K_M/K_i versus I , vgl. Abb. 3.14 A und Gleichung 3.2). Der Schnittpunkt der Geraden liegt im linken oberen Quadranten (kompetitiver Hemmtyp im Dixon-Plot).

3.6.2 Kinetische Charakterisierung der Hemmung der humanen Thioredoxinreduktase durch Phosphol-Verbindungen

Die Effekte der Phospholverbindungen auf die hTrxR sind weitaus komplexer aufgrund ihrer beiden zu unterscheidenden aktiven Zentren in der FAD-Domäne am N-terminalen Teil und in der *interface*-Domäne an der C-terminalen Verlängerung jeder Untereinheit. Diese beiden Zentren besitzen, wie aus der Studie mit den Cisplatin-Komplexen hervorgeht, mögliche Bindestellen für Substrate und Inhibitoren (Millet *et al.*, 2005). Diese Tatsache erschwert häufig die Zuordnung von Inhibitoren zu einem eindeutigen Hemmtyp.

Die Phospholverbindungen **1-4** wurden an der TrxR im Trx-Assay (Trx bindet nur C-terminal an die TrxR) (Abb. 3.27) und im DTNB-Assay (DTNB hat Zugang zu beiden aktiven Zentren der TrxR) analysiert. Für Inhibitor **2** konnte mittels nicht-linearer Regression ein K_i -Wert von 157.6 ± 9.36 nM ermittelt werden. Die Hemmung der Wildtyp-TrxR (Plazenta) wurde mit den Hemmungen der TrxR-Mutanten (hTrxR^{U498C}, hTrxR Δ 16, hTrxR Δ 8) verglichen. Die Komplexe sind sehr effizient gegenüber dem hTrxR-WT mit $i_{0.5}$ -Werten im unteren nanomolaren Bereich (Tabelle 3-VI). Dabei spielt der Unterschied zwischen der Pyridyl- bzw. Thienylsubstitution am Phospholliganden keine signifikante Rolle. Wie auch schon bei der Hemmanalyse der hGR wurde der Au(I)-Komplex **1** detaillierter untersucht. Die kompetitive Komponente der Hemmung konnte nur anhand der DTNB-Reaktion der TrxR in Anwesenheit von Inhibitor herausgearbeitet werden. Die kompetitive Inhibitionskonstante (K_{ic}) des Komplexes **1** von 0.52 ± 0.08 nM war sehr niedrig und fast identisch mit dem $i_{0.5}$ -Wert für die DTNB-Reaktion (0.8 nM).

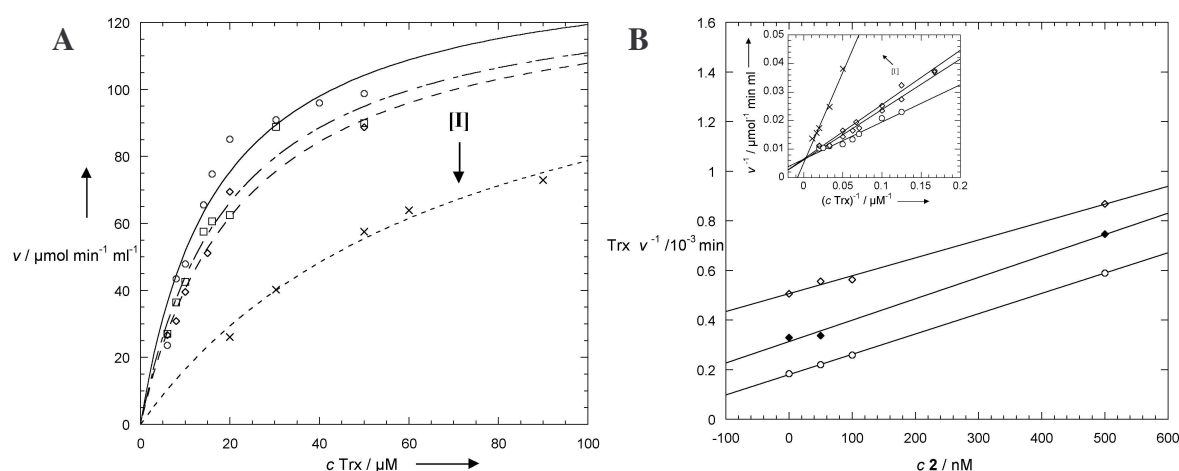


Abb. 3.27: Kinetische Analyse der hTrxR-Hemmung. Hemmung der Trx-Reduktion durch die Au-Phospholverbindung **2** (0-500 nM), (A) Nicht-lineare Regression (Michaelis-Menten-Plot), (B) Cornish-Bowden-Plot (Trx-Konzentrationen: 8, 30 und 50 μ M (aufsteigende Kurven); eingesetzte Grafik: Lineweaver-Burk-Plot).

Die anschließende irreversible Hemmung der TrxR zur Ausbildung der kovalenten Modifikation konnte durch einen Entsalzungstest bewiesen werden, da die Aktivität der TrxR nicht zurückgewonnen werden konnte. 2,3-Dithiopropandiol (BAL, *British-Anti-Lewisite*), ein Chelatbildner für Goldionen, konnte dagegen die TrxR-Hemmung wieder auflösen (Abschnitt 2.2.6.2). Aus den *steady-state*-Kinetiken ließ sich ermitteln, dass bereits 0.3 Äquivalente des Inhibitors **1** zur Blockade von 50% der Enzymmoleküle führen und es wurde ein Wert für die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von weniger als 0.5 s abgeschätzt (Abschnitt 3.4.1.3). Dies ist ein äußerst niedriger Wert und leicht höhere Inhibitorkonzentrationen führen direkt zur vollständigen Hemmung der TrxR.

Die TrxR-Mutanten (hTrxR^{U498C}, hTrxR Δ 16, hTrxR Δ 8) wurden durch die Phospholkomplexe deutlich schlechter gehemmt, die Cysteinmutante (hTrxR^{U498C}) z.B. um zwei bis vier Größenordnungen schlechter (Tabelle 3-IV). Den Ergebnissen der Cisplatin-Komplexe entsprechend hatte sie auch wesentlich höhere $i_{0,5}$ -Werte im DTNB-Assay (vgl. Abschnitt 3.4.1.2).

3.6.3 DNA-Interaktion

Interkalierende Agenzien destabilisieren die Doppelstrangstruktur der DNA. Das Aufschmelzen der DNA findet in einem schmalen Temperaturbereich statt, d.h. die Dissoziation ist durch eine hohe Kooperativität gekennzeichnet. Beim Übergang von der Doppelhelix zur Knäuelstruktur steigt die optische Dichte der DNA an und dieser sog. hyperchrome Effekt wird in der photometrischen DNA-Messung bei 260 nm genutzt (Hyperchromiemaximum).

Das Verhalten von Au(I)-Phospholkomplexen gegenüber DNA wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse in Zusammenarbeit mit Dr. Katalin Tóth (DKFZ Heidelberg) untersucht (Uríg *et al.*, 2005b). Dazu wurde linearisierte Plasmid-DNA mit dem Inhibitor **1** in unterschiedlichen Konzentrationen (1-20 μ M) behandelt und der Hyperchromieeffekt beobachtet. Kurven der Hitzedenaturierung zwischen 50 und 95°C wurden photometrisch verfolgt und anschließend gegen die Absorption bei RT normalisiert.

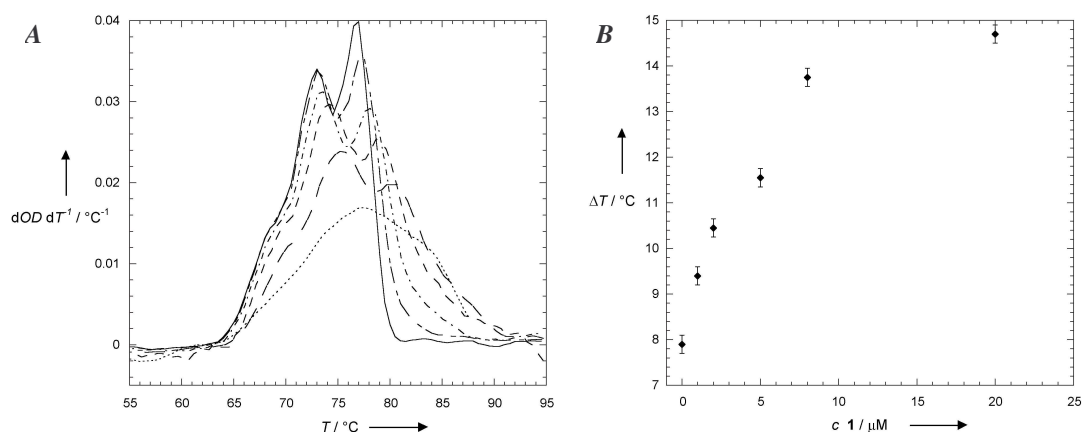


Abb. 3.28: Interaktion des Inhibitors **1** mit pUC18-Plasmid-DNA. (A) Schmelzkurven mit DNA allein (durchgezogene Linie) und mit DNA und 1, 2, 5, 8 und 20 μ M **1** (gestrichelte Linien). (B) Kooperativität des Schmelzprozesses im steigenden Temperaturdiagramm (sigmoidale bzw. polynomische Anordnung der ΔT -Werte).

Die abgeleiteten Schmelzkurven in Abb. 3.28 zeigen einen starken Effekt des Inhibitors **1** auf die DNA, der bei höheren Inhibitor-Konzentrationen zur Aufgabe der charakteristischen Kurvenform führt (unterste Kurve in Abb. 3.28 A) (Verlust der Kooperativität zwischen den beiden DNA-Strängen, Abb. 3.28 B).

3.6.4 Antiproliferative Effekte der Phosphole in Glioblastom-Zellkultur

Die chemotherapeutischen Eigenschaften der Phospholverbindungen wurden *in vitro* an drei verschiedenen Glioblastom-Zelllinien getestet und mit den Effekten der Phenylphosphin-Goldverbindung **5** verglichen. Die Goldverbindungen **1**, **2** und **5** besaßen die niedrigsten IC_{50} -Werte im Bereich von 5 bis 20 μ M (Tabelle 3-VII). Selbst die metallfreien Verbindungen **6** und **7** (Abb. 3.24), die an einer Zelllinie getestet wurden, ergaben Werte, die niedriger waren

wie die IC_{50} -Werte der Pt(II)-Verbindungen **3** und **4**. Dies lässt eine Rolle als Redoxcyclus in der Zelle vermuten. Die verschiedenen Substituenten an den Seitenringen des Phospholliganden (ein elektronendefizienter 2-Pyridyl- oder ein elektronenreicher 2-Thienylsubstituent) führen nur zu marginalen Unterschieden in der Zelle. Das unter den selben Bedingungen getestete BCNU als prominentes Zytostatikum in der Hirntumorbehandlung musste in bis zu 100-fach höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um die gleichen Effekte wie die Phosphole hervorzurufen.

Tabelle 3-VII: Antiproliferative Effekte der Verbindungen **1-7** (IC_{50} -Werte) auf drei verschiedene Glioblastom-Zelllinien.

Zelllinie		Verbindung						
		1	2	3	4	5	6	7
IC_{50} (μ M)	<i>NCH37</i> ^a	5.4±0.7	5.7±0.2	33±3.2	28.1±0.8	6.1±0.2	/	/
	<i>NCH82</i> ^a	12.5±0.8	7.5±0.04	65±6.3	81.8±4.1	7.2±0.2	/	/
	<i>NCH89</i> ^a	10.8±0.8	15.2±0.4	43±3.7	78.4±3.1	20.3±0.7	6.7±0.3	8.5±0.5
^a IC_{50} von BCNU: 300 ± 12 μ M (NCH37), 385 ± 25 μ M (NCH82), 615 ± 38 μ M (NCH82)								

3.6.5 Kristallisation und Strukturaufklärung eines Komplexes aus humaner Glutathionreduktase und einem Gold(I)-Phosphol

Zur genaueren Charakterisierung des irreversiblen Inhibitionsmechanismus der Phospholverbindungen und zur Identifikation des Endproduktes der Disulfidreduktase-Hemmung wurde die modifizierte GR röntgenkristallografisch untersucht. Dazu wurde sie mit der Phospholverbindung **1** und **3** inaktiviert und in Kristallisationsexperimenten eingesetzt (Abschnitt 2.2.6.2). Monokline hGR-Kristalle mit gebundenem Inhibitor **1** wurden erhalten und analysiert. Die Röntgenstrukturanalyse und Strukturverfeinerung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Fritz-Wolf (MPI für medizinische Forschung, Heidelberg) (Urig *et al.*, 2005b). Die Hälfte eines GR-Dimers (Karplus and Schulz, 1987) war in der asymmetrischen Einheit zu finden. Am Cystein 284 eines jeden Monomers war ein Molekül Inhibitor **1** kovalent gebunden und überraschenderweise war ein Goldatom kovalent zwischen Cys58 und Cys63 des aktiven Zentrums der GR gebunden. Diese S-Au-S-Koordination in der *active site* war für die GR zuvor nicht bekannt und zeigte eine fast lineare Geometrie (S-Au-S-Winkel von 167.5°). Die Struktur der modifizierten hGR wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) anhand der Struktur der mit S-Nitrosoglutathion modifizierten hGR (Becker *et al.*, 1998) gelöst und bis 2.6 Å verfeinert mit einem Temperaturfaktor von 37.2 Å² (nähere Details zur Durchführung und den verwendeten Analyseprogrammen siehe Becker *et al.*, 1998; Urig *et al.*, 2005b).

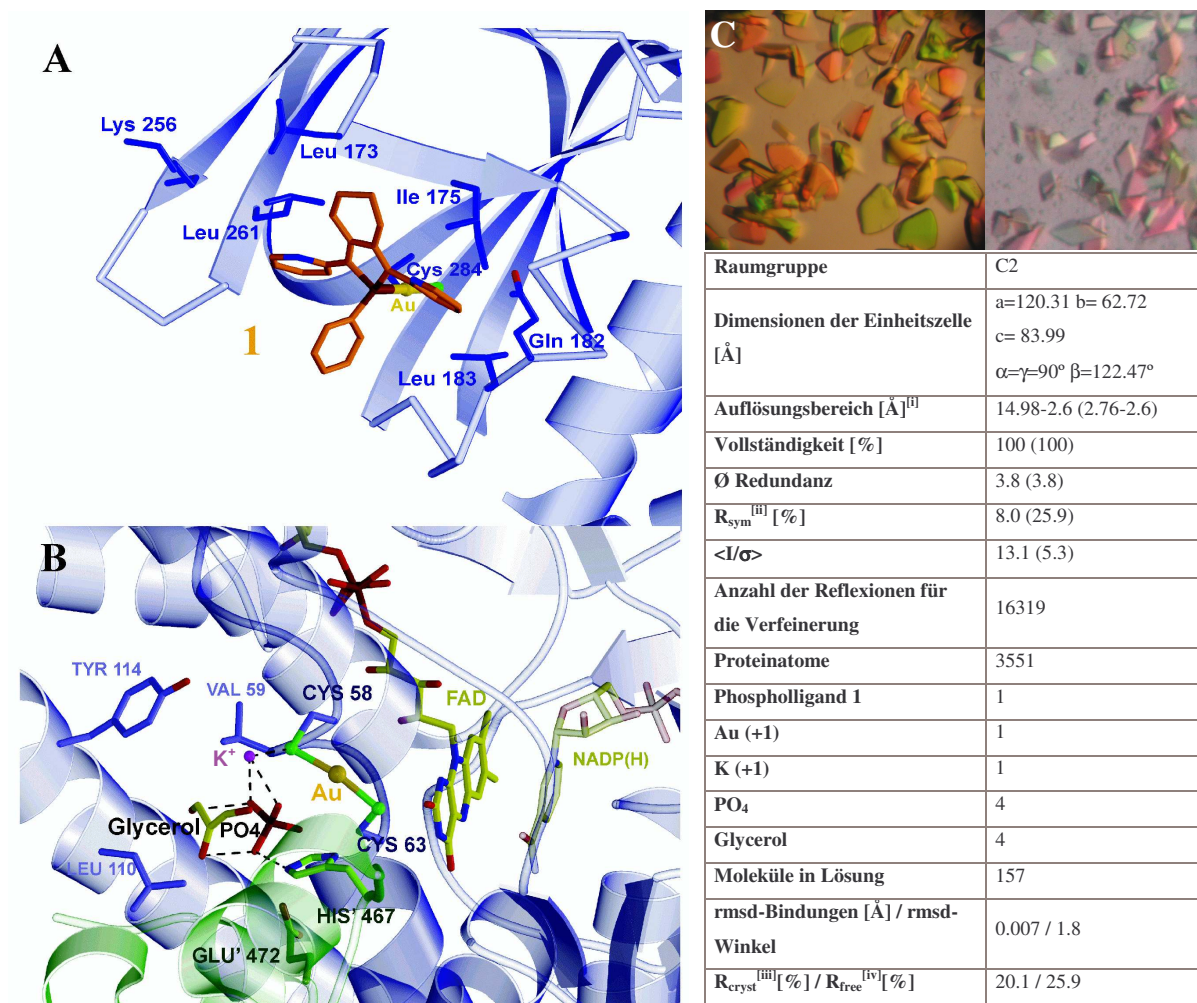


Abb. 3.29: Verfeinerte Struktur der durch den Inhibitor **1** modifizierten hGR. (A) Modifiziertes Cystein an der Oberfläche des Proteins (Cys284-S-(Au)-I). (B) Aktives Zentrum: Cys58-S-Au-S-Cys63 als zentrale Einheit, K⁺-Ion (elektrostatische Interaktion mit Cys58), PO₄³⁻-Gruppe (Interaktionen mit K⁺, Glycerol und His467 des zweiten symmetriebezogenen Monomers). Verwendet wurden die Grafikprogramme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und RASTER 3D (Merritt and Bacon, 1997). (C) Verschiedene hGR-I-Kristallformen.

^[ii]Die Werte in den Klammern beschreiben die Daten der letzten Auflösungseinheit. ^[iii] $R_{Sym} = 100 \sum |I_h - \langle I \rangle| / \sum I_h$. ^[iii] $R_{cryst} = 100 \sum \|F_{obs} - F_{calc}\| / \sum |F_{obs}|$, kalkuliert für alle beobachteten Daten; kein Sigma-cut-off. ^[iv] R_{free} kalkuliert für 3% für einzelne zufällig ausgewählte Reflexionen, die von der Strukturverfeinerung ausgeschlossen waren. Die Strukturdaten sind in der RCSB Protein-Datenbank hinterlegt (PDB-Code 2AAQ).

3.7 Kristallisation der humanen Thioredoxinreduktase

Die Kenntnis der genauen dreidimensionalen Struktur der TrxR ist im Hinblick auf die Entwicklung neuer spezifischer Pharmaka und den Beweis ihres katalytischen Mechanismus von immenser Bedeutung. Trotz des großen Fortschritts auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie bleibt die Röntgenstrukturanalyse für viele, insbesondere größere Proteine (> 30 kDa) die Methode erster Wahl. Die röntgenkristallografische Methode erfordert mehrere Arbeitsschritte, deren erster die Proteinkristallisation ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, größere und symmetrisch aufgebaute Einkristalle von der TrxR in oxidiert oder reduzierter Form zu bekommen, die bei Röntgenbestrahlung brauchbare Beugungsdaten liefern.

3.7.1 Kristallisationsversuche der authentischen Thioredoxinreduktase

Die Kristallisation von nativ gereinigten Proteinen ist nicht einfach, gerade Reinheitsgrad und erforderliche Proteinmenge stellen ein großes Problem dar. Die frisch aus humaner Plazenta aufgereinigte TrxR wurde in Screeningexperimenten in verschiedenen Konzentrationen mit oder ohne Reduktionsmittel mit oder ohne das Substrat Thioredoxin eingesetzt (Abschnitt 2.2.7.2.). Über die fertigen Kits hinaus wurden weitere Kristallisationsbedingungen ausgetestet. In Ansätzen mit 4 μ l-Tropfen, von denen 2 μ l aus 16 mg/ml TrxR (in TE-Puffer, pH 7.6) und 1 μ l aus NADP⁺ (ad 2.5 mM) bestanden und einem Reservoir aus 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 8.0, 20% w/v PEG 8000 wuchsen Kristalle von bis zu 100 μ m heran, die scharfe klare Kanten und eine variable Morphologie aufwiesen (neben monoklinen auch tetra- und hexagonale Formen). Des Weiteren brachte die Crystal Screen II-Lösung Nr. 35 (mit 0.1 M HEPES und 70% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol) tetragonale Kristallformen hervor, für die ebenfalls Beugungsdaten aufgenommen wurden (in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Fritz-Wolf, MPI Heidelberg und Dr. Markus Wahl, MPI Göttingen). Nach intensiven Untersuchungen und Sequenzierungen ergab sich jedoch, dass es sich nicht um TrxR-Kristalle, sondern um GR-Kristalle handelte, die aus dem GR-Restgehalt (abgeschätzt 3%) der TrxR-Lösung erwachsen konnten. Von weiteren Kristallisationsexperimenten mit der TrxR-Probe aus Plazenta wurde daher abgesehen.

3.7.2 Kristallisation der rekombinanten Cystein-Mutante

Die in *E. coli* in größeren Mengen als *His-tag*-Protein produzierbare und über NiNTA-Affinitätschromatografie reinigbare hTrxR^{U498C} kann ebenso für Kristallisationsexperimente eingesetzt werden, da sie sich von der nativen hTrxR nur in einer einzigen Aminosäure unterscheidet und keine grundlegend andere dreidimensionale Anordnung angenommen wird.

3.7.2.1 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Aufbauend auf vorhergehenden Versuchen mit den Crystal Screens I und II und auf Beschreibungen zur rTrxR^{U498C}-Kristallisation (Zhong *et al.*, 2000b) wurden innerhalb der besten Bedingungen ebenfalls die Proteinkonzentrationen sowie die Cofaktor- und Substratzugaben variiert und die Ansätze bei verschiedenen Temperaturen gelagert (4°C, RT, 30°C). Darüber hinaus wurde versucht, die TrxR ohne *His-tag* zu kristallisieren (dem voraus gingen die entsprechende Klonierung in ein Vektorsystem ohne Hexahistidyl-kodierende Sequenz, die Expression in *E. coli* sowie die Reinigung über 2',5'-ADP-Sepharose), was aber ohne nennenswerten Erfolg blieb.

Die hTrxR^{U498C} mit *His-tag* kristallisierte innerhalb einer Woche in verschiedenen Ansätzen, deren beste Ergebnisse im Folgenden beschrieben werden. Anzumerken ist, dass sich die hTrxR-Mutante im unteren Konzentrationsbereich (4 mg/ml Endkonzentration im Tropfen) besser kristallisieren ließ, da sich ansonsten zu schnell störende Präzipitate bildeten. In den besten Ansätzen mit der Crystal Screen II-Lösung Nr. 35 (CSII, 35) (siehe oben) (Reservoir 500 μ l CSII,35 + 300 μ l H₂O_{bidest}) und einem 2+2-Tropfen aus 5 und 8 mg/ml Protein mit 2.5 mM NADP⁺ und Reservoir wuchsen größere gelbe Kristalle (Abb. 3.30 A), die sich gut in flüssigem Stickstoff präparieren ließen und somit für die Röntgenstrukturanalyse zur Verfügung standen.

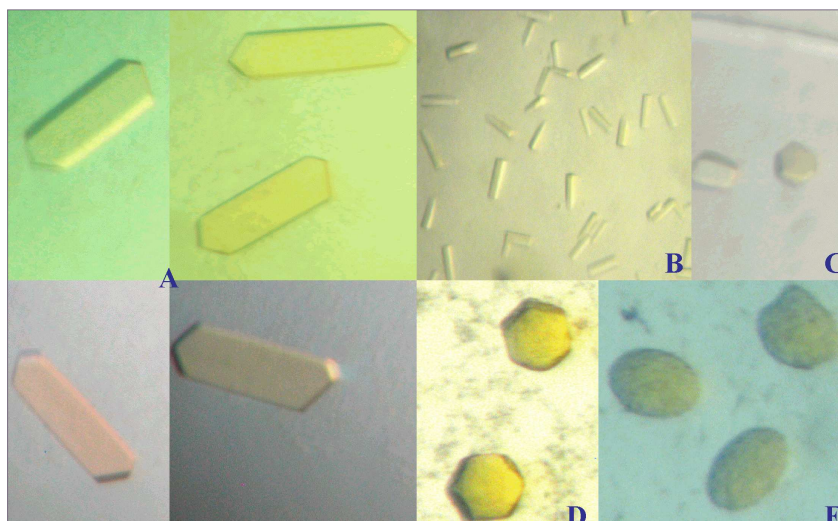


Abb. 3.30: Verschiedene Kristallformen der $hTrxR^{U498C}$. (A) Triklone Kristalle bis ca. 150 μm Kantenlänge (gewachsen in 0.1 M HEPES, 70% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol unter Zugabe von NADP^+ ad 2.5 mM im Tropfen). (B) Monokline und tetragonale Kristalle bis ca. 100 μm (Reservoir: 100 mM Tris, 12% PEG, Tropfen: 100 mM Tris, 7% w/v PEG). (C) Tetragonale und hexagonale Kristalle, \varnothing 50 μm Durchmesser (Reservoir: 0.05 M Mono-Kaliumdihydrogenphosphat, 20% w/v PEG). (D) Hexagonale Kristalle, \varnothing 75 μm Durchmesser (Reservoir: 0.1 M HEPES, 70% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol). (E) Linsenförmige Kristalle, \varnothing 150 μm Durchmesser (gewachsen in 0.1 M HEPES, 70% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol unter Zugabe von NADPH ad 1 mM und Trx im dreifachen molaren Überschuss zur TrxR im Tropfen).

3.7.2.2 Erste Röntgenstrukturdaten

Die in den Ansätzen vorhandenen Kristalle waren von unterschiedlicher Güte, so dass in einer Testreihe die besten von ihnen ausgewählt werden mussten. Diese $TrxR^{U498C}$ -Kristalle (monoklin, in 0.1 M HEPES, 70% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol, 2.5 mM NADP^+) wurden direkt aus dem Tropfen montiert, d.h. jeder einzelne Kristall wurde mittels einer Metallöse in einem Tropfen Reservoirlösung aufgenommen und bei Stabilität (keine Degradationserscheinungen am Kristall) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Einbringen in den Strahlengang wurden Beugungsdatensätze der Proteinkristalle aufgenommen. Die verwendeten Kristalle streuen bis etwa 2.9 \AA , gehören der Raumgruppe 4 an (monokline Raumgruppe $P2_1$) mit den Einheitszellkonstanten 144.796 \AA (a), 90.729 \AA (b) und 166.755 \AA (c) sowie 90° (α), 112.464° (β) und 90° (γ). Die Kristalldaten werden momentan noch ausgewertet und verfeinert.

RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR observed	R-FACTOR COMPARED expected	I/SIGMA	R-meas	Rmrgd-F	S_norm/ S_ano	
	OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE								
6.25	30907	8770	9133	96.0%	3.5%	4.0%	30831	27.15	4.1%	2.8%	0.97
4.53	51475	14360	14375	99.9%	5.8%	5.4%	51396	20.04	6.8%	5.0%	0.96
3.73	65791	18317	18342	99.9%	8.4%	7.5%	65710	14.95	9.9%	7.8%	0.97
3.25	77390	21430	21452	99.9%	16.8%	16.0%	77311	7.77	19.7%	17.6%	1.00
2.91	85878	24186	24201	99.9%	37.1%	39.6%	85545	3.36	43.8%	41.7%	1.04
2.66	73117	25462	26642	95.6%	58.9%	66.2%	70804	1.72	72.0%	79.7%	1.05
2.47	46413	20017	28917	69.2%	70.1%	82.5%	42843	1.11	89.7%	108.0%	1.07
2.31	28867	14264	31016	46.0%	76.7%	92.1%	24918	0.90	100.6%	125.0%	1.10
2.18	10537	8000	32937	24.3%	80.1%	96.3%	4694	0.65	109.2%	144.8%	1.17
total	470375	154806	207015	74.8%	11.2%	11.5%	454052	7.31	13.4%	24.9%	1.01

Abb. 3.31: Erste statistische Daten der Röntgenstrukturanalyse der $hTrxR^{U498C}$. An den Termini I/Sigma und Rmrgd-F kann man sehen, wie das Signal abbricht. Der Datensatz wurde anhand der Rotationsmethode unter Verwendung von Synchrotronstrahlung bei 100 K aufgenommen.

4 DISKUSSION

4.1 Zur Reinigung der Thioredoxinreduktase aus Plazenta

4.1.1 Ausbeute und Reinheit, neuere Reinigungsverfahren

Die Ausbeute der Plazentenpräparation zur Gewinnung von humaner TrxR wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter optimiert (Ejima *et al.*, 1999; Gromer *et al.*, 1998). Aus den 17 verwendeten Plazenten konnten 17.8 mg Protein gewonnen werden, was einem Durchschnitt von 1.1 mg pro Plazenta entspricht. Allerdings sind Ausbeute und Reinheit bei Proteingewinnungen häufig nicht immer vereinbar und man muss genau überlegen, auf welche Reinigungsschritte man besonders achten muss (*Cave*: Kristallisation erfordert hochkonzentriertes und sehr reines Protein). Die TrxR aus Plazenta enthält zu einem gewissen Prozentsatz noch Glutathionreduktase (Restgehalt der letzten Präparation wird auf ca. 3% über die GR-Kinetik abgeschätzt), die zwar durch den Reinigungsprozess weitestgehend, aber aufgrund der verwendeten großen Rohextraktmengen nicht vollständig abgetrennt wird. Empfehlungen für zukünftige TrxR-Reinigungen ergeben sich aus der kürzlich beschriebenen *Sel-tag*-Technik über Phenylarsenoxid-Sepharose-Affinitätschromatographie (PAO-Sepharose) (Johansson *et al.*, 2004), die ganz spezifisch zwischen selenhaltigen und selenfreien Proteinen trennt. Ein solcher Trennschritt würde sich als Alternativmethode zur 2',5'-ADP-Sepharose-Affinitätschromatographie oder als Nachreinigungsmethode für bereits durchgeführte Reinigungen nach der Gelfiltration anbieten. Da diese Aufreinigungsform einen DTT-Reduktionsschritt in Verbindung mit der Matrixsubstanz beinhaltet, ist anschließend eine Dialyse gegen Chelatsubstanzen (BAL, DMPS) notwendig. Trotz erster Erfolge dieser Aufreinigungsmethode für Selenoproteine wie die TrxR bedarf sie weiterer Optimierungen, an denen momentan gearbeitet wird (Elias Arnér, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus würde sich eventuell auch eine stärkere Ionenaustauscherchromatographie in der Anfangsphase der Plazentenpräparation anbieten.

Ein weiterer, den Reinigungserfolg der Plazentenpräparation beeinträchtigenden Aspekt ist die Tatsache, dass reduzierten selenhaltigen Proteinen in Anwesenheit von Luftsauerstoff Veränderungen widerfahren können, die einen Einfluss auf deren Aktivität haben können. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten reduktiven Gelfiltration zur Endreinigung der TrxR wurde mittels DTT-Zugabe ein deutlich besserer Reinigungseffekt erzielt, der im Hinblick auf die Kristallisation von Vorteil ist. Allerdings wies die TrxR-Fraktion mit bis zu 15 U/mg eine deutlich geringere spezifische Aktivität im DTNB-Assay auf als frühere oxidierend gereinigte TrxR (Gorlatov and Stadtman, 1998; Gromer *et al.*, 1998; Luthman and Holmgren, 1982). Den Hintergründen für dieses Phänomen wurde erst in den letzten Jahren nachgegangen, denn frühere Aufreinigungen beinhalteten durchaus Reduktionsschritte mit DTT (Luthman and Holmgren, 1982; Tamura and Stadtman, 1996). Es wurde festgestellt, dass ein Selenverlust die Ursache hierfür sein kann. So konnte gezeigt werden, dass die reduzierende Aufreinigung der TrxR in Anwesenheit von Luftsauerstoff zu einem weniger aktiven, chromatographisch sich anders verhaltenden Protein führt, während diesen Effekten bei Zugabe millimolarer NADPH-Konzentrationen vorgebeugt werden konnte (Gorlatov and Stadtman, 1998; Gorlatov and Stadtman, 1999). Bei Aufreinigung unter anaeroben Bedingungen hatte die Reduktion der TrxR keinen Einfluss auf ihren Reinigungs- und Aktivitätserfolg.

Neuere Untersuchungen bestätigen den Selenverlust und beschreiben die Umwandlung von Selenocystein in Dehydroalanin (Abb. 4.1) in Zusammenhang mit der Selenoxidation und

Selensäurebildung (Ma *et al.*, 2003; Rooseboom *et al.*, 2001), die in Abbildung 4.2 dargestellt ist.

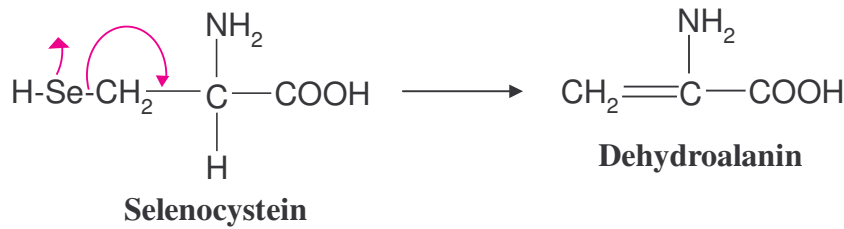


Abb. 4.1: Strukturformeln von Selenocystein und Dehydroalanin.

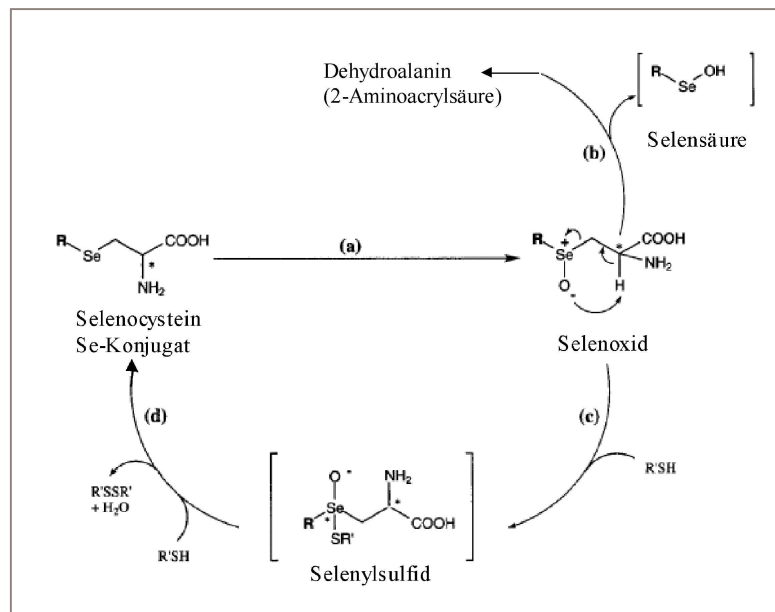


Abb. 4.2: Möglicher Mechanismus der Selenoxidation von Selenocystein-Se-Konjugaten. (a) Oxidation von Selenocystein-Konjugaten zu Selenoxid. (b) Eine Syn- β -Elimination, die durch die intramolekulare Abstraktion eines β -Protons des Selenoxids erfolgt, wodurch u.a. Selensäure entsteht. (c,d) Bei Anwesenheit von Thiolen kann Selenoxid zu Selenocystein-Se-Konjugaten reduziert werden, mit der Bildung von Selenylsulfid-Zwischenprodukten (modifiziert nach Rooseboom *et al.*, 2001).

Auffallend ist eine konstante TrxR-Restaktivität von ungefähr 50%, die auch nach der Reinigung der rekombinanten rTrxR mit Selenocystein beobachtet wird (Arner *et al.*, 1996; Anestal and Arner, 2003). Dieses Phänomen ist noch nicht geklärt, jedoch könnte ein Monomer-Dimer-Austausch mit dem Verlust des Selens in einer Untereinheit ein Erklärungsansatz sein (d.h. die Hälfte jedes Dimers wäre noch aktiv).

So ist zu vermuten, dass man nach Aufreinigung häufig ein Gemisch aus voll aktiver und trunkierter, d.h. eine um die beiden letzten Aminosäuren verkürzte TrxR mit 50% Gesamtaktivität erhält. Es ist zu beachten, dass diese - physiologisch durchaus denkbare - TrxR-Variante auf zellulärer Ebene zu einer deutlichen Apoptoseinduktion führen kann (BioPORTER-Versuch, siehe Abschnitt 3.3.3).

4.2 Deletionsmutanten von eukaryotischen Thioredoxinreduktasen: Manipulation des C-Terminus mit Auswirkungen auf Enzymkatalyse und Substratspezifität

hTrxR1	-----MNGPEDLPKSYDYDLIIIGGG SGGLAAAK EAAQYGKKVMVLDVFTPTP-LG	50	
rTrxR1	-----MNSKDPKSYDYDLIIIGGG SGGLAAAK EAAKFDKKVMVLDVFTPTP-LG	50	
dmTrxR1	-----MAPVQGSYDYDLIIIGGG SAGLACAK EAVLNGARVACLDFVKPTPTLG	48	
hGR	MACRQEPQPQPPAAGAVASYDYL VIGCGSGGLASAR RAELGARAA VVESH -----	53	
	:* :*****.***.*:*. . . :		
hTrxR1	TRWGLGGTCVNVGCIIPKKLMHQALLGQALQDSRNYGKWVEETVKHDWDRMIEAVQN HIG	110	
rTrxR1	TNGGLGGTCVNVGCIIPKKLMHQALLGQALQDSRNYGKWLED TVKHDWEKMTESVQN HIG	110	
dmTrxR1	TKWVGGGTCVNVGCIIPKKLMHQASLLGEAVHEAAAYGWNVDEKIKPDWHKLVQSVQN HIK	108	
hGR	--- KLGGTCVNVGCVPK KVMWNTAVHSEFMHDHADYGFPSCEG-KFNWRVIRKEKRDA YVS	109	
	:*****.***.*:*. . . :		
hTrxR1	SLNWGYRVA LREKKVVYENAYGQFIFGPHRIKATNNKGKEKIYSAERFLIATG---ERPRY	167	
rTrxR1	SLNWGYRVA LREKKVVYENAYGKFIGPHKIMATNNKGKEKVYSAERFLIATG---ERPRY	167	
dmTrxR1	SVNWVTRVD LRDKKVEYINGLGSFVDSHTLLAKLKSG-ERTITAQTFVIAVG---GRPHY	164	
hGR	RLNAIYQNN LTKSHIEIIR GH AFTSDPKPTIEVSGK---KYTAPHIL TATG GMPSTPHE	166	
	:* : * . . . : . . . * . . . :* :**.* *		
.....			
hTrxR1	DSTIGI HPVCAEVFTT LSVTKRSGASILQAGCUG	499	FAD Bindungsdomäne rTrxR1
rTrxR1	DSTIGI HPVCAEIFTT LSVTKRSGGDIQSGCUG	499	GSSG Bindungsstellen hGR
dmTrxR1	INTVGI HPTTAEFFTR LAITKRSGLDPTPASCSS	491	FAD Bindungsdomäne hGR
hGR	DNTVAI HPTSSEELVTLR -----	479	
	.*:***. :* :. *		
hTrxR ^{U498C}	DSTIGIHPVCAEVFTT LSVTKRSGASILQAGCCG	499	
hTrxRA8	DSTIGIHPVCAEVFTT LSVTKRSGAS -----	491	
hTrxRA16	DSTIGIHPVCAEVFTT LS -----	483	
hGR	DNTVAI HPTSSEELVTLR -----	479	

Abb. 4.3: Multiples Sequenzalignment (CLUSTAL W (1.82) mit TrxR- und GR-Sequenzen (vgl. Abb. 3.10)).

Der Grund für die Deletion des C-terminalen Teils der TrxR liegt in der im Zuge der Vorstellung der 3 Å-Struktur der murinen TrxR aufgestellten Hypothese, dass eine um den C-terminalen Teil verkürzte TrxR-Form GR-Charakter haben und GSSG reduzieren könnte (Sandalova *et al.*, 2001). Diese Hypothese liegt nahe, wenn man sich die Gemeinsamkeiten von TrxR und GR noch einmal vor Augen führt. Beide Enzyme besitzen ihre aktiven Zentren in der *dimer interface* zwischen den beiden Untereinheiten, so dass die Dimerform ihre funktionale Einheit darstellt. Das N-terminale Redoxzentrum ist in TrxR und GR konserviert. Die reduktiven Halbreaktionen beider Redoxenzyme entsprechen sich und der Ablauf von Substratbindung und -dissoziation erfolgt mittels eines Ping Pong-Mechanismus. Die meisten Aminosäurereste der GR, die mit Glutathion interagieren, sind ebenfalls an den entsprechenden Positionen in der TrxR zu finden, abgesehen von ein paar bedeutenden Austauschen, die im Mittelpunkt weiterer Mutationsstudien standen (vgl. Abschnitt 3.3.2). Die TrxR-Aktivität wird über das Cys-Sec-Redoxpaar aufrecht erhalten, das sich am C-terminal verlängerten Arm befindet, der flexibel ist und die N-terminale Interaktion der TrxR mit kleineren Molekülen wie GSSG verhindern kann. Dass dies aber nicht der alleinige Grund für die fehlende GSSG-Reduktionsaktivität ist, stellte sich im Rahmen dieser Arbeit heraus, denn die um 16 Aminosäuren verkürzte TrxR-Form (hTrxRA16) bewirkt keine signifikante GSSG-Reduktion (im Vergleich zur deutlich höheren und nur bei höheren GSSG-Konzentrationen (> 1 mM GSSG) detektierbaren Kontrollaktivität von hTrxR^{U498C}).

Weitere Untersuchungen, z.B. ob das Redoxpotential dieser TrxRA16 eine GSSG-Reduktion von vornherein ausschließt oder es nicht zu einer GSSG-Bindung kommen kann, gestalteten sich schwierig. Schließlich wurden am hTrxRA16-Molekül insgesamt vier weitere Mutationen realisiert, die eine Rolle bzgl. der GSSG-Interaktion spielen könnten. Diese betrafen den Austausch des Lys29 durch ein Arginin (~ Arg37 der hGR, welches die Carboxylgruppe von

Glutathion in der *active site* verankert (Salzbrücke) und unter den GRs konserviert ist), den Austausch des His108 durch ein Tyrosin (~ Tyr107 der hGR, mögliche H-Brückenbindung mit Cys des Glutathions), des Alanin 119 durch ein Asparagin (~ Asn118 der hGR, nicht konserviert bei den TrxRs und an der Stelle liegend, die bei der GR das Ende einer GSSG-Bindestelle ausmacht) sowie den Austausch des Val478 durch ein Glutamat (~ Glu473 der hGR, ionische Interaktion mit der α -Aminogruppe eines der beiden γ -Glutamylreste von GSSG).

Vergleiche von TrxR und GR bieten sich darüber hinaus bei der Analyse der Oberflächenstruktur beider Enzyme an (Abb. 4.4).

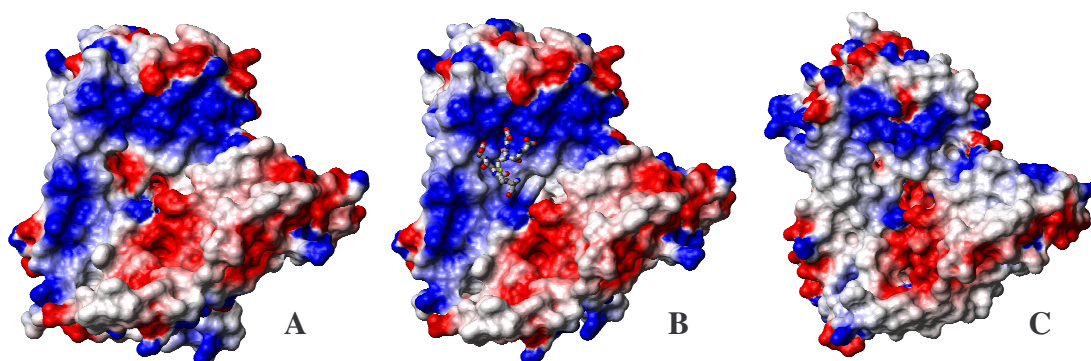


Abb. 4.4: Modelle der Oberflächenstrukturen der hGR (A), der hGR mit gebundenem GSSG (B) sowie der TrxR (C) (erstellt mit MOLMOL in Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Horst Lillig, Karolinska-Institut, Stockholm). GR und TrxR (A,C) weisen eine ähnliche Oberflächengesamtladung auf. Auffallend ist die neutrale Umgebung der N-terminalen *active site* der TrxR (linke Seite, Mitte), die bei der GR heterogene Bereiche aufweist. Die blaue Farbe kennzeichnet positive, die rote Farbe negative Oberflächenladung; weiße Flächen sind neutral.

Die GR weist in der Umgebung des aktiven Zentrums Ladungsunterschiede zur TrxR auf. Im Bereich der N-terminalen *active site* ist das Molekül überwiegend neutral (linke mittlere Seite). Bei GSSG-Bindung wird die Oberflächenladung in der Umgebung der Bindestelle deutlich positiver. Modellierungsarbeiten des GSSG an die TrxR sind derzeit in Bearbeitung.

Die schrittweise Mutation der hTrxR Δ 16 brachte keine Verbesserung bzgl. GR-Aktivität und die vierfache Mutante hTrxR Δ 16^{K29R,H108Y,A119N,V478E} wies darüber hinaus eine deutlich erniedrigte FAD-Inkorporation (< 50%) auf. Zur Bestimmung kinetischer Konstanten musste daher mit FAD komplementiert werden. Der resultierende FAD-Gehalt von nahezu 90% blieb auch nach Aufreinigung konstant, so dass die Mutante die Fähigkeit zur FAD-Bindung nicht gänzlich verloren hat, sondern dieser Verlust eventuell auf Faltungsänderungen während der Proteinproduktion zurückzuführen ist. Daraus geht hervor, dass es nicht so einfach ist, aus einer TrxR eine GR herzustellen und dass man die Komplexität der GSSG-Bindung der GR und die FAD-Bindung der TrxR näher untersuchen muss, um weitere Ansätze zu finden.

Da der molekulare Hintergrund der GSSG-Bindung an die GR im Detail bekannt ist und der GR-GSSG-Komplex kristallographisch gut untersucht ist (Karplus *et al.*, 1989; Karplus and Schulz, 1987), hat sich gezeigt, dass die GSSG-Spezifität durch Interaktionen mit der GR-Seitenkette zustande kommt. Auffallend ist ebenso, dass die *active site* durch die Substratbindung kaum verändert wird und dass sich das eintretende GSSG eher der *active site*-Umgebung anpasst ("induced fit") (Stoll *et al.*, 1997). Daher ist eine Verfolgung weiterer Aspekte interessant und hochauflösende Röntgenstrukturen der TrxR würden weitere Arbeiten im Hinblick auf das *protein-engineering* erleichtern.

Ein neuer Befund könnte eine eventuelle Glutathionylierung der TrxR infolge des Ergebnisses des Gelfiltrationsversuches von rTrxR Δ 16 mit ³H-GSSG (Abschnitt 2.2.2.4) sein (Glutathionylierung an Cysteinen ausserhalb der *active site*, da TrxR_{ox} gemeinsam mit ³H-GSSG eluiert (Casagrande *et al.*, 2002; Lind *et al.*, 1998)). Umfangreiche Untersuchungen eventuell mittels Massenspektrometrie würden Aufschluss über diese TrxR-Modifikation geben, welche

eine für dieses Enzym neuartige Regulationsmöglichkeit mit biologischer Relevanz darstellen könnte.

4.3 *Neuere Aspekte der Cysteinmutante der humanen TrxR (hTrxR^{U498C})*

Da die rTrxR^{U498C} bereits Gegenstand intensiver Studien anderer wissenschaftlicher Gruppen war (Fujiwara *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000; Zhong and Holmgren, 2000), sollen hier nur kurz die neueren Aspekte angesprochen werden.

Menadion, Vitamin K3, 2-Methyl-1,4-naphthochinon, gehört zur Gruppe der Chinone, einer heterogenen Gruppe natürlicher Substanzen, die z.T. in der Medizin verwendet werden, aber z.T. auch Umweltgifte darstellen (Monks *et al.*, 1992). Chinone allgemein können entweder Substrate oder Inhibitoren der TrxR sein und wurden ihren Eigenschaften entsprechend in verschiedene Gruppen eingeteilt (Bironaite *et al.*, 1998; Cenas *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die TrxR gemischte Ein- und Zwei-Elektronen-Reduktionsreaktionen der Chinone katalysiert. Diese können vom C-terminalen Cys-Sec-Motif und von einem zweiten Redoxzentrum (z.B. FAD) ausgehen. Menadion selbst wurde bereits intensiv als ein Modell für den Chinon-Redoxzyklus verwendet, um die Effekte von oxidativem Stress, insbesondere durch Superoxid, im Säugetiersystem aufzuklären (Flattery-O'Brien and Dawes, 1998; Ochi, 1996). Innerhalb des Redoxzyklus findet die Autoxidation von Menadion-Reduktionsprodukten statt. Dabei erfolgen zwei Ein-Elektronenübertragungsschritte mit der Bildung von Semichinon-Zwischenprodukten. Allerdings wird die Superoxidbildung aufgrund des Unterschieds zwischen dem Sauerstoff-Redoxpotential und dem Ein- und Zwei-Elektronen-Redoxpotential im chemischen Gleichgewicht nicht favorisiert. Deshalb kann Menadion auch unabhängig davon seine signifikanten antikanzerogenen Eigenschaften über Zellzyklusarrest und/oder Apoptose bei gleichzeitig relativ niedriger Zytotoxizität ausüben (Ham *et al.*, 2000). Die hohe *in vitro*-Aktivität der hTrxR^{U498C} bei der Menadionreduktion ist das erste Beispiel dafür, dass der Austausch des Selenocysteins gegen Cystein auch zu einer aktiveren Spezies als das Wildtypenzym führen kann.

Im Zusammenhang mit der signifikanten Apoptoseinduktion durch die hTrxR^{U498C} in Zellkultur im Vergleich zu anderen TrxR-Varianten (vgl. Ergebnis des BioPORTER-Versuches, Abschnitt 3.3.3) und der möglichen Interaktion mit Apoptoseinduktoren wie Menadion und anderen Redoxzyklern in der Zelle wird derzeit versucht, den Verlauf der zellulären apoptotischen Kaskade unter dem Einfluss der TrxR zu rekonstruieren.

4.4 Inhibition der humanen Thioredoxinreduktase durch Cis-Diamindichlorplatin-Komplexe

Mit den neu entwickelten Cis-Diamindichlorplatin-Komplexen **13a-c** und **20** konnte die Doppelliganden-Strategie erfolgreich umgesetzt werden. Es ist auch bereits bekannt, dass das Zusammenbringen kleiner Moleküle, die jeweils nur mit millimolarer Affinität an benachbarten Stellen von Zielproteinen binden, zu zweiseitig orientierten größeren Molekülen mit submikromolarer Affinität führen kann (Hajduk *et al.*, 1997). Da sowohl Nitrofurane als auch Cisplatin mit Flavoenzymen interagieren und überdies Cisplatin in die DNA-Doppelhelix interkaliert, wurden sie als Muttersubstanzen eingesetzt. Die Affinität des Nitrofurans für das N-terminale Redoxpaar sowie die spezifische Erkennung des elektronenreichen C-terminalen Selenolats durch das Cisplatinende führen letztendlich zu einer irreversiblen Hemmung der TrxR, was sich günstig auf die Toxizität von Krebszellen mit hohen Glutathionleveln auswirkt. Durch den Cisplatingehalt dieser Verbindungen lassen sich die Effekte von TrxR-Hemmung und DNA-Bindung gut miteinander kombinieren und können einen Beitrag zur Überwindung der Chemosensitivität leisten. Im Folgenden werden einzelne Charakteristika der Inhibitoren im Hinblick auf die Gesamtbewertung der Effektivität von Cisplatin-Komplexen diskutiert.

4.4.1 Interpretation der steady-state-Kinetiken mit den Inhibitoren **8**, **13a-c** und **20**

Die unkompetitive DTNB-Kinetik mit dem hTrxR-WT aus Plazenta zeigt, dass eine vorherige DTNB-Bindung des reduzierten Enzyms den Kontakt des Nitrofurans **8** (N'-(2-naphthylmethyl)-5-nitro-2-furancarbohydrazid) mit einer anderen Bindestelle am Enzym fördert. Die Dissoziationskonstante für den reversiblen Komplex von 16 μM drückt die signifikante Affinität dieser Substanz für eine bis jetzt noch nicht näher charakterisierte Bindestelle der TrxR aus. Die kompetitive Kinetik der trunkeierten Variante hTrxR Δ 16 mit DTNB als Substrat bedeutet, dass deren DTNB-Bindung die Affinität des Inhibitors **8** für die Bindestelle am N-terminalen Redoxzentrum herabsetzt. Diese Erkenntnisse lassen sich mit der Annahme vereinbaren, dass die Bindung des Inhibitors **8** an den reduzierten hTrxR-WT erst nach Assoziation des Substrates am C-terminalen Redoxzentrum verwirklicht werden kann. Darüber hinaus ist offensichtlich, dass kleinere Elektronenakzeptoren wie DTNB mit dem Nitrofuran **8** um die N-terminale Bindestelle der hTrxR Δ 16 konkurrieren (Abb. 3.16). Dies bestätigte auch die Untersuchung der zeitabhängigen TrxR-Inaktivierung (Abschnitt 4.4.2). Die Kombination der Nitrofuranverbindung mit Cisplatin führt schließlich zu CDDP-Komplexen (**13a-c** und **20**), die als potente Inhibitoren die authentische TrxR mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich (84-275 nM) hemmen.

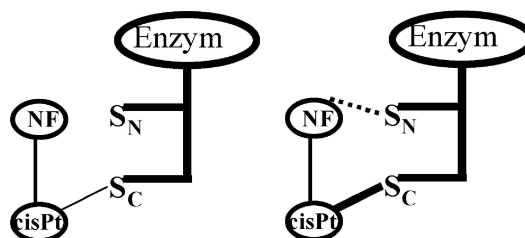


Abb. 4.5: Doppelliganden-Strategie und Enzymkoordination in Zusammenhang mit dem Inaktivierungsprozess. Der Cisplatinanteil (cisPt) strebt zum C-terminalen Redoxzentrum (S_C), jedoch wird die irreversible Bindung erst durch die N-terminale Koordination (S_N) des Nitrofuranteils (NF) verwirklicht.

4.4.2 Zeitabhängige Inaktivierung großer Thioredoxinreduktasen durch CDDP-Komplexe

Die Werte für die halbmaximale Enzymhemmung (IC_{50} -Werte bzw. $i_{0.5}$ -Werte) wurden in Versuchen mit 10-minütiger Vorinkubation der TrxR und ihrer Mutanten ermittelt. Die submikromolaren Werte für die Hemmung des (Selenocystein-enthaltenden) hTrxR-WT auf der einen und die mikromolaren Werte für die Hemmung der Mutanten auf der anderen Seite sprechen für das Selenocystein als Haupt-*target* der CDDP-Komplexe. Betrachtet man die niedrigsten Werte von 21-38 μM , die im Trx-Assay mit der hTrxR^{U498C} gemessen wurden und die höchsten Werte von 130-265 μM , gemessen im DTNB-Assay, wird deutlich, dass eine Konkurrenz zwischen DTNB, nicht aber Trx, und den CDDP-Komplexen um die N-terminale Bindestelle am aktiven Zentrum stattfindet.

Die Hemmung durch die Komplexe ist sehr effektiv und führt letztendlich zur irreversiblen Inaktivierung des hTrxR-WT, wahrscheinlich durch kovalente Modifikation des Selenocysteins. Die Realisierung der kovalenten Modifikation benötigt eine gewisse Zeit (Geschwindigkeitskonstante k_i , z.B. 0.96 min^{-1} für Inhibitor **20**), so dass die Inaktivierung der Enzymmoleküle bei Inkubation von Enzym-NADPH-Inhibitormischungen im Laufe der Zeit zunimmt und am Ende auch durch Dialyse nicht mehr rückgängig gemacht werden kann. Betrachtet man die C-terminale Bindungsstelle des Inhibitors am Enzym und den Hemmmechanismus, so beeinflussen die *target*-Aminosäuren die Hemmung stark und der Austausch des Selenocysteins durch ein Cystein oder gar das Fehlen dieser Aminosäuren verschlechtern deutlich den Hemmeffekt.

4.4.3 Kooperativität und Spezifität der TrxR-Hemmung

Anhand der Cisplatin-Verbindungen **13a-c** und **20** konnte zum ersten Mal ein im Verlauf der TrxR-Hemmung induzierter kooperativer Effekt beobachtet werden. Ein kooperatives Verhalten der TrxR ist auch anzunehmen, da z.B. der rTrxR-Trx-Komplex in einem 3D-Strukturmodell mit einem flexiblen C-terminalen Arm für den Elektronentransfer ohne größere Konformationsänderungen dargestellt wurde (Abb. 6 in Sandalova *et al.*, 2001). Nach der bisher einzigen Struktur von Säuger-TrxRs mit mäßiger Auflösung bei 3 Å, die mittels *molecular replacement* von der GR-Struktur abgeleitet wurde, nimmt der C-terminale Teil beim reduzierten Enzym eine Konformation an dessen Oberfläche ein und es wird angenommen, dass dieser Teil beim oxidierten Enzym in der *active site* verborgen liegt (Sandalova *et al.*, 2001). Das Nichtvorhandensein größerer sterischer Behinderungen während der Konformationsänderung des C-Terminus beim Übergang von der EH_2 - zur EH_4 -Form könnte erklären, warum keine kooperativen Effekte während den Kinetiken mit NADPH und Trx beobachtet werden.

Die relative Spezifität der CDDP-Komplexe für das Selenenzym TrxR wird deutlich, wenn man ihre Aktivität am mechanistisch und strukturell ähnlichen, aber nicht selenhaltigen Enzym GR heranzieht. Letzteres Enzym wird sehr viel (bis zu 15-fach) schlechter gehemmt als die TrxR (hTrxR-WT). Es kann auch angenommen werden, dass die GR-Hemmung eher durch die Nitrofuranyl-Interaktion am konservierten CVNVGC-Redoxzentrum zustande kommt (vgl. den deutlich niedrigeren IC_{50} -Wert der Verbindung **8** an der GR im Vergleich zur hTrxR (DTNB-Assay), Tabelle 3-III) (Cenas *et al.*, 1991).

4.4.4 Schlussfolgerung

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen, von der Nitrofurancarbohydrazid-Verbindung **8** abgeleiteten vier Cisplatin-Komplexe **13a-c** und **20** sind potente und TrxR-spezifische irreversible Inhibitoren, anhand derer Enzyme mit multiplen Bindestellen studiert werden können. Die TrxR kann als Zielmolekül von Platinverbindungen zur Prävention einer Chemoresistenz in Zellen durchaus von Nutzen sein (Details zu Zytotoxizitätsstudien und Cisplatinvergleich in Zellkultur siehe Millet *et al.*, 2005). Unterstützt werden kann sie dabei von der GR, deren Hemmung durch CDDP-Komplexe zwar schwach, aber signifikant ist und synergistische Effekte hervorrufen kann (*multi-target*-Strategie des Inhibitor designs). Die Inhibitorstudien liefern wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Auswahl neuer Leit-substanzen mit irreversiblen Eigenschaften gegenüber der TrxR und einer verbesserten Pharmakokinetik. Vielversprechende Substanzen könnten Pt(IV)-Komplexe sein, die sich in ihrer doppelseitigen Ethylendiamin-N,N'-di-3-propansäureester-Form als effektive Substanzen mit antikanzerogenen Eigenschaften erwiesen haben (schnelle Reaktion mit dem *target* bei geringer Toxizität im Hinblick auf Nebeneffekte, eventuell orale Verabreichung möglich, bessere Pharmakokinetik (Galanski *et al.*, 2003)) (Kaludjerovic *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu Pt(II)-Verbindungen können Pt(IV)-Verbindungen in Tumorzellen über oxidativen Stress Nekrose auslösen, was wiederum für eine TrxR-Inhibition spricht. Dies könnte ein neuer Ansatzpunkt sein, die Tumorregression unabhängig von der Beeinflussung apoptotischer Stoffwechselwege und deren adaptierter Resistenzmechanismen voranzutreiben.

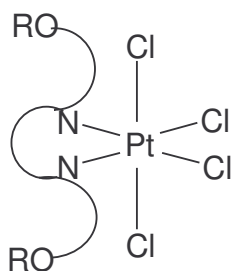


Abb. 4.6: Allgemeine Struktur von Pt(IV)-Komplexen (R = Pentyl- oder Butylalkohol).

4.5 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe

2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe sind effektive und irreversible Inhibitoren der hTrxR aus Plazenta in nanomolaren Konzentrationen, während sie deren Mutanten (hTrxR^{U498C}, hTrxR Δ 16) nicht hemmen, daher ist das Selenocystein das primäre *target* am Enzym (Becker *et al.*, 2001; Urig *et al.*, 2005). Da sie darüber hinaus antiproliferative Effekte auf Hirntumorzellen sowie auf Zellen von Tumoren im Hals-Nasen-Ohrenbereich ausüben (Becker *et al.*, 2001), waren sie Gegenstand der im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten vorklinischen Studien in Kooperation mit der Abteilung für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Heidelberg (AG Herold-Mende) zur Beurteilung ihres chemotherapeutischen Potentials.

An einem Ratten-Gliommodell wurden verschiedene Therapieschemata ausgetestet, die die Beeinflussung unterschiedlicher Tumorstadien zum Ziel hatten und zu unterschiedlichen (wenn auch niedriger als erwarteten) Hemmeffekten führten. Ergänzend erfolgten Untersuchungen von Redoxparametern, Apoptosemarkern sowie von Gen- und Proteinregulationen.

Der Beweis konnte erbracht werden, dass das antikanzerogene Potential der Terpyridinplatin-Komplexe nicht ausschließlich in der DNA-Modifikation, sondern in Kombination mit dem Redoxregulationsmechanismus und seinen weiteren Verflechtungen in der zellulären Signalkaskade begründet liegt, mit dem Zielpunkt der Schwächung der Tumorzelle bis zu deren Tod.

4.5.1 In vivo-Effekte der Terpyridinplatin-Komplexe

Die folgende Abbildung zeigt die Effekte der Verbindung I₂₃2N auf das Wachstum von Glioblastomen im Tiermodell. Der Tumor wuchs ohne Behandlung auf die dreifache Größe heran. Dieses starke Wachstum erklärt den begrenzten Zeitrahmen für eine erfolgreiche Therapie. Die Therapiephase dauerte nur 6 Tage in der sogenannten späten Therapie (von Tag 9 bis Tag 15) und innerhalb dieser kurzen Zeit waren die Effekte bei den behandelten Tieren signifikant (Wachstumshemmung, kein Wachstumsstop).

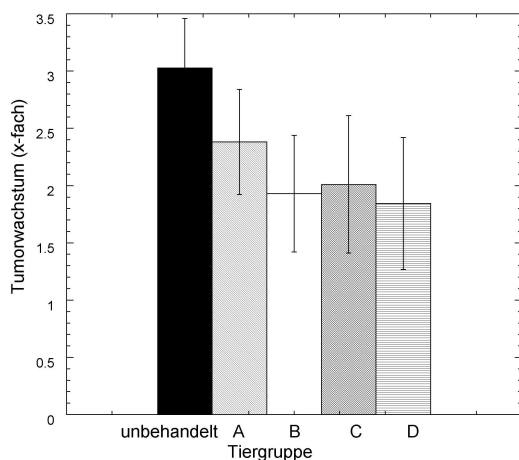


Abb. 4.7: Mittelwerte und Standardabweichungen der MRI-Daten von Kontrollratten (schwarzer Balken) und Ratten, die mit I₂₃2N in der "späten Therapie" behandelt wurden. Therapiegruppen: A, Tiere mit 25 mg/kg; B, Tiere mit 35 mg/kg; C, Tiere mit 50 mg/kg. Angegeben ist das Tumorstadium am Ende der Therapiephase und bezieht sich auf das Tumorstadium in den Kontrolltieren zu diesem Zeitpunkt.

Die Behandlung von Patienten mit Glioblastomen beginnt häufig erst bei einem erneuten Auftreten des Tumors, wenn dieser noch relativ klein ist oder wenn der Tumor chirurgisch nicht vollständig entfernt werden konnte. Diese Situation, die auch als "*minimal residual disease*" bezeichnet wird, entspricht der hier durchgeführten "frühen Therapie" mit den

Terpyridinplatin-Komplexen. Der Tumor sprach auf diese Therapieform etwas besser an, mit einer prozentualen Größenreduktion von bis zu 40%. Dies beweist, dass Tumore in der Entwicklungsphase empfänglicher für den chemotherapeutischen Effekt sind als weiter entwickelte Tumore. Dennoch konnte hier gezeigt werden, dass die Platinkomplexe durchaus zu späteren Zeitpunkten in der Tumorprogression noch aktiv sind, was ein vielversprechendes Ergebnis darstellt.

Es gibt auch Hinweise, dass die zytotoxischen Effekte besonders in Tumorzellen verbreitet sind, da immortalisierte humane Endothelzellen mit einer 50%igen Proliferationshemmung erst bei 15 μM weitaus weniger von den Effekten der Terpyridinplatin-Komplexe betroffen sind (Christel Herold-Mende, persönliche Mitteilung). Nicht zuletzt ist der geringe Einfluss auf weitere physiologische Parameter in Blut und Geweben und der damit zu erwartenden geringen Nebenwirkungen der Platintherapie ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen Chemotherapeutika, für die myelotoxische, nephro- und neurotoxische Wirkungen beschrieben sind (Jendrossek *et al.*, 2003; Mrugala *et al.*, 2004; Parney and Chang, 2003; Wen and Kesari, 2004). Die histologischen Befunde bestätigten eine normale Gewebeszusammensetzung.

Antioxidative Parameter, die in den Geweben und im Blut der behandelten und unbehandelten Ratten mit Glioblastomen bestimmt wurden, zeigten gewisse Regulationseffekte, die im Rahmen dieser Arbeit herausgearbeitet werden konnten. Allerdings ist aufgrund der festgestellten kompensatorischen Regulationen zwischen einzelnen Parametern keine Störung des Redoxgleichgewichtes insgesamt, sondern vielmehr eine durch den oxidativen Eingriff hervorgerufene gewollte systematische Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der chemotherapeutischen Wirkung zu beobachten. Regulationseffekte zwischen enzymatischen Parametern konnten bei TrxR, GPx, GR und GST festgestellt werden. So wurde in der Lunge eine signifikante kompensatorische Hochregulation der GR beobachtet, entsprechend den Effekten früherer Zellkulturen (Becker *et al.*, 2001). Die GST, ein zentrales Enzym bei Konjugations- und Biotransformationsreaktionen während des Entgiftungsprozesses (Hayes *et al.*, 2005), war bezeichnenderweise in sieben von zehn Geweben hochreguliert. Demgegenüber stand die deutliche Reduktion der Aktivitäten der Selenoproteine TrxR und GPx in den meisten Geweben (Abb. 3.19 A und B). Während jedoch die spezifische Aktivität der TrxR im unbehandelten Hirntumor im Vergleich zum unbehandelten gesunden Hirnteil nur um 20% höher war, stieg sie bei der GPx auf über 200% (!) an. Da in gesundem und krankem Hirnteil keine Änderungen im Selengehalt festgestellt wurden (Urig *et al.*, 2005), hat diese Enzym-Hochregulation einen anderen Ursprung. Die erhöhte GPx-Aktivität in Gliazellen (Savolainen, 1978) und Glioblastomzellen (die vorliegende Studie) sowie die Tendenz des Gehirns zur Selenretention sprechen für die GPx-Aktivität als Malignitätskriterium für Hirntumore. Der Aspekt der GPx-Aktivität als Marker für Hirntumore soll in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Die signifikante Reduktion der TrxR-Aktivität im behandelten Hirntumorgewebe spricht für eine deutliche *in vivo*-Antwort über die Blut-Hirn-Schranke und stellt einen Vorteil des Terpyridinplatin-Komplexes I₂₃2N gegenüber anderen chemotherapeutischen Eingriffen dar (De Angelis *et al.*, 1998).

Betrachtet man die pharmakokinetischen Eigenschaften beider Terpyridinplatin-Komplexe, I₂₃2N und I₂₅2N, so muss die *in vivo*-Interaktion von metallhaltigen Verbindungen mit Thiol- und Selenolgruppen mit einbezogen werden. Erste Daten zur Bindung von 2,2':6,2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe an Serumalbumin und Glutathion wurden in Studien von Ross *et al.*, 2001, aufgezeigt und aus diesem Grund sowie aufgrund bisheriger Erfahrungen wird vermutet, dass die Plasma-Halbwertszeit der freien Verbindungen sehr niedrig ist (geschätzt < 1 min). Die Halbwertszeit der konjugierten Verbindungen scheint aber eher im Bereich der Halbwertszeit von Albumin zu liegen ($t_{1/2} \sim 2$ h, $t_{1/10} \sim 33$ h). Dennoch zeigen die Ergebnisse

aus Neutronenaktivierungsanalyse und hTrxR-Hemmstudien auf, dass die Komplexe dennoch ihr zelluläres Zielkompartiment erreichen.

4.5.2 Differentielle Genom- und Proteomanalyse von Glioblastomzellen nach Behandlung mit 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexen

Die zytotoxischen Effekte von I₂₃2N scheinen nicht, wie erst vermutet, über Apoptose vermittelt zu werden. Der Zusammenhang zwischen der antiapoptotischen Wirkung des Trx-Systems auf der einen Seite (Soini *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2002) und die Auslösung der Apoptose durch Chemotherapeutika, die Einfluss auf das Redoxsystem nehmen, auf der anderen Seite (Arnér *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2000; Sasada *et al.*, 1999) ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch wurde auch berichtet, dass die Apoptose über Trx-hemmende Substanzen ohne Störung der zellulären Redoxhomöostase möglich ist (Pallis *et al.*, 2003). Allerdings geht man heute eher dazu über, dass die Apoptose entgegen früherer Annahmen (Hofmann *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2001), nicht direkt von der natürlich vorkommenden unbeeinflussten TrxR ausgelöst werden kann, sondern nur dann, wenn sie in irgendeiner Form gestört wird (veränderte Aktivität durch Selenverlust oder Blockade des Selenocysteins) (Anestal and Arner, 2003).

Unter den in dieser Arbeit gewählten und für eine eindeutige Detektion optimierten Bedingungen konnten für den Terpyridinplatin-Komplex I₂₃2N keine apoptotischen Wirkungen beobachtet werden. Eine teilweise beschriebene Resistenz von Glioblastomzellen (T98G) gegenüber Apoptose durch DNA-schädigende Agenzien wurde durch Positivkontrollen (u.a. durch Staurosporin als bekanntem Apoptoseinduktor) ausgeschlossen. Die gewählte Inkubationszeit in Kombination mit der Dosis von I₂₃2N lag ebenfalls in einem Bereich, der in der Zellkultur zu deutlichen Hemmeffekten geführt hatte (Becker *et al.*, 2001). Interessanterweise wurde kürzlich berichtet, dass etablierte Therapieverfahren wie BCNU-Behandlung und Gamma-Bestrahlung nicht zu einer hohen Apoptoserate führen und dass sogar Doxorubicin, welches deutliche Effekte *in vitro* zeigte, *in vivo* scheiterte-höchstwahrscheinlich durch mangelndes Überwinden der Blut-Hirn-Schranke (Jeremias *et al.*, 2004).

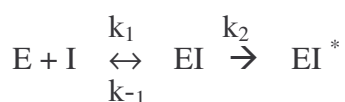
Diese Erkenntnisse lassen noch einige Fragen offen und führten dazu, dass feinere Regulationen vielleicht erst stattfinden müssen, um den langfristigen zellulären Hemmeffekt hervorzurufen. Solche Mechanismen wurden dann auf genomischer und proteomischer Seite untersucht (Abschnitt 3.5.7-3.5.9) und sind sehr komplex, so dass man mit eindeutigen Zuordnungen zu jenem oder diesem Signaleffekt vorsichtig sein muss. Derzeitige Erklärungsansätze aus unseren Studien beschäftigen sich mit dem Zellzyklusarrest und seinen Folgen für den Redoxmetabolismus und den Gesamtmetabolismus der Zelle. Zellzyklus-komponenten, die regulativ und inhibierend in den Zellzyklus eingreifen, wurden als *targets* der 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe identifiziert (Hochregulation von GSPT1, CDKN1A, GADD45A, Cyclin G-assoziierte Kinase). Andere Komponenten des Zellzyklus, die in einer bestimmten Zellzyklusphase prominent sind, wurden dann herunterreguliert (CCNE1, CCNB1). Apoptoseassoziierte Komponenten (Bcl2, Bax, Fas) wurden auf Genebene herunterreguliert und könnten mit ein Grund für die fehlende Apoptose sein. Demgegenüber steht, dass ein Zellzyklusarrest auch durchaus ohne den langfristigen Effekt der Apoptose Hemmeffekte, z.B. über Seneszenzerscheinungen, ausüben kann. Die Auslösung der zellulären Seneszenz über Chemotherapeutika steht aktuell in der Diskussion (Chang *et al.*, 1999; Roninson, 2002; Shay and Roninson, 2004) und man kann in der nächsten Zeit noch einige neue Aspekte auf diesem Gebiet erwarten. Die Analysen der zellulären Antwort auf Terpyridinplatin-komplexe werden zur Aufklärung des Wirkmechanismus noch weiter intensiviert.

4.6 Phosphol-Komplexe als potentielle redox-modifizierende Chemotherapeutika

4.6.1 Kinetische Beschreibung des Inhibitionsmechanismus

Die Hemmung der hGR durch die Phospholkomplexe kann beschrieben werden durch eine erste Kompetition mit GSSG (die z.T. nur bei höheren Inhibitorkonzentrationen beobachtet werden können, vgl. Abb. 3.25 und Deponte *et al.*, 2005) und einer darauffolgenden irreversiblen Reaktion. Die beiden Schritte können auch ineinander greifen und Mischformen (*mixed type inhibition*) ergeben. Es hängt dann von den zeitlich abgestimmten Messbedingungen ab, welchen Enzymzustand man festhält. Die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung ist ein zuverlässiger Test auf irreversible Hemmung. Entgegen dem reversiblen Inhibitor (im vorliegenden Fall den Pt-Phospholverbindungen), der einen sofortigen Abfall der Enzymaktivität bis auf einen bestimmten konstanten Wert bewirkt, hat der irreversible Inhibitor eine exponentielle Abnahme der Aktivität zur Folge. Wird die Inhibitorkonzentration niedrig, aber effektiv genug gewählt (\geq zweifache Enzymkonzentration), ist die Hemmwirkung anfänglich kaum erkennbar und der Hemmeffekt wird sich erst im Laufe der Zeit aufbauen. Bindet der Inhibitor sehr stark an das Enzym, nimmt im Anfangsbereich des Zeitverlaufs die Enzymaktivität nahezu linear ab. In diesem linearen Bereich lässt sich die Stöchiometrie der Inhibitorbindung bestimmen.

Aus der Zeitabhängigkeit der hGR-Inhibition folgt, dass die anfängliche Kompetition mit GSSG schnell (mit einer maximalen Geschwindigkeitskonstante k_i von 1.2 min^{-1} bei Überschuss an Inhibitor) von der irreversiblen Komponente zur Bildung des kovalenten Endprodukts überlagert wird.



Für die irreversible Bindung des Au-Phosphols **1** an die hGR(EH₂) kann dieses Reaktionsschema zugrundegelegt werden. Dieses beinhaltet, dass zunächst ein reversibler Assoziationskomplex EI gebildet wird, der in einem irreversiblen Prozeß in die inaktive EI*-Form übergeht. In Analogie zur Michaelis-Menten-Gleichung ist, vorausgesetzt $[\text{I}] \gg [\text{E}]_0$, die zeitliche Bildung der inaktiven Enzymform EI* der Konzentration des reversiblen [EI]-Komplexes direkt proportional. Es lässt sich eine entsprechende Geschwindigkeitsgleichung anwenden und die kinetischen Komponenten bestimmen (siehe Cisplatinstudie, Abschnitte 3.4, 4.4). Die zeitabhängige Inaktivierung der GR durch die Phospholkomplexe erfolgt sehr schnell, so dass die Inkubation der Komponenten z.T. bei 4°C durchgeführt wurde, um messbare und mit den in diesem Zusammenhang durchgeführten *stopped-flow*-Kinetiken vergleichbare Werte zu bekommen (Deponte *et al.*, 2005). Da die halbmaximale Enzymhemmung ($i_{0.5}$) im unteren nanomolaren Bereich lag, bestand für die Messungen eine Konzentrationsgrenze, weil man auf eine deutliche GR-Kontrollaktivität zurückgreifen musste. Die Messungen erfolgten mit 100 nM hGR (EH₂) und 1-3 Äquivalenten Au-Phosphol **1** in Vorinkubationsansätzen (Details siehe Deponte *et al.*, 2005) und sollten Anhaltspunkte für die kinetische Beschreibung liefern. Somit wurde die Maximalgeschwindigkeit (k_i) der GR-Hemmung von 1.2 min^{-1} bei relativ kleinem Überschuss an Inhibitor **1** ermittelt (Kinetik pseudo-erster Ordnung, k_{app} bzw. $k_{\text{obs}} = k_i [\text{I}]_0 / (K_i + [\text{I}]_0)$, daraus ergibt sich ein $t_{1/2} = \ln 2 / k_i$ von weniger als 1 min (0.6 min).

Aufgrund der letzten Ausführungen wird (unterstützt von Dialyse- und Kristallisations-experimenten) nicht angenommen, dass die Pt-Phosphole kovalente Inhibitoren der hGR sind. Insgesamt kann die GR-Hemmung durch die unterschiedlichen Phospholverbindungen wie folgt beurteilt werden. Die Au-Verbindungen **1** und **2** wiesen aufgrund der freien Rotation der Inter-Ring-C-C-Bindung bei Raumtemperatur eine hohe Dynamik auf (Fave *et al.*, 2003). Diese Flexibilität erleichtert ihnen den Eintritt in die Glutathion-Bindungsseite der hGR, während die analogen Pt-Verbindungen mit ihren starren Metallringen (Chelatisierung mit dem Pyridyl-Phospholliganden) an dieser Stelle nicht so anpassungsfähig sind. Die Pt-Phosphole **3** und **4** mit bis zu einem um den Faktor 1000 (!) höheren $i_{0,5}$ -Werten sind deutlich schlechtere Inhibitoren der hGR, d.h. schlechtere Konkurrenten für GSSG.

Abschließend soll noch auf den molekularen Mechanismus der Hemmung der hGR eingegangen werden, der zu dem im Kristall beobachteten irreversiblen Endzustand der hGR geführt hat. Die Modifikationen am Cys58 und Cys63 können anhand der Tatsache erklärt werden, dass Cys-S-Atome bekannt sind für eine effektive Cl-Abstraktion in Lösung (Abrams and Murrer, 1993; Shaw, 1999; Zou *et al.*, 2000) und das Au(I) eine hohe Affinität für Schwefel hat.

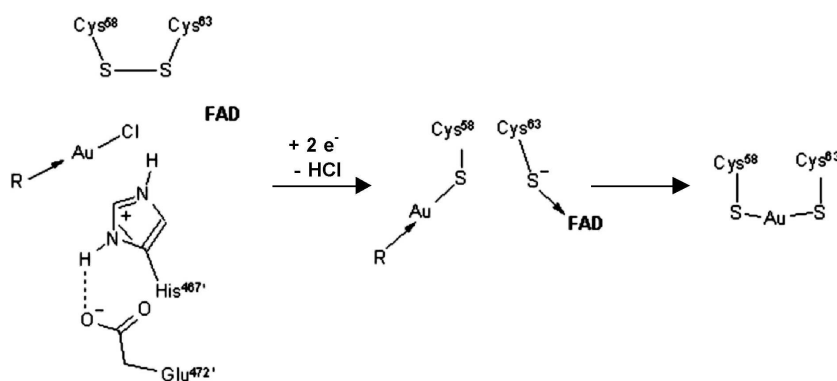


Abb. 4.8: Mechanismus des Inhibitors **1** (**2**) ($R \rightarrow \text{Au-Cl}$, $R = \text{Phospholligand}$) im aktiven Zentrum der hGR (Modell). Die reduzierte hGR kann am Cys63 und Cys58 kovalent modifiziert werden. Am durch Reduktion über NADPH und FAD gebildeten Thiolat des Cys58 bindet nach Cl-Abstraktion zunächst ein Inhibitormolekül (Cys58-S-Au-Phosphol-Zwischenprodukt). Nach dem nukleophilen Angriff des vorhandenen Cys63-Thiolats am Goldatom wird der Phospholligand entlassen und das S-Au-S-kordinierte Endprodukt gebildet (Deponte *et al.*, 2005).

Im Unterschied zu der hGR sind an der hTrxR-Hemmung alle Phosphol-Verbindungen in gleichem Maße beteiligt, mit $i_{0,5}$ -Werten von 1-8 nM (niedrigste Werte im DTNB-Assay gemessen). Dies zeigt, dass Au(I)- und Pt(II)-Verbindungen hoch affin für die TrxR sind und am C-terminalen Redoxzentrum der TrxR binden. Das Haupt-target ist damit das Selenocystein, denn die Hemmung von TrxR-Mutanten ohne diese Aminosäure verläuft weit weniger effektiv (bis zu drei Größenordnungen schlechter, Tabelle 3-VI). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die flexiblen Au-Verbindungen **1** und **2** auch am N-terminalen Redoxzentrum interagieren können, denn Sekundärplots der Kinetik zeigen nicht-lineare Beziehungen, was für eine Bindung an mehr als einer Stelle des Enzyms spricht (vgl. auch Abb. 3.16).

Die Konkurrenz von DTNB mit dem Inhibitor am N-terminalen aktiven Zentrum konnte auch in dieser Inhibitorstudie bestätigt werden. Dafür spricht, dass eine eindeutige kompetitive Komponente der TrxR-Hemmung nur im DTNB-Assay beobachtet werden kann (Abschnitt 3.6.2) und die hTrxR $\Delta 16$ mit alleinigem N-terminalen Redoxzentrum auch gehemmt wird und die $i_{0,5}$ -Werte der hTrxR^{U498C} im DTNB-Assay höher sind. Die kompetitive Komponente geht aber so schnell in eine irreversible Hemmung über, dass sie mit

der herkömmlichen photometrischen Methode nicht mehr bestimmt werden kann. *Stopped-flow*-Kinetiken wären an dieser Stelle interessant (Schätzwert für $t_{1/2} = \leq 0.5$ s).

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die TrxR durch Au(I)-Phospholverbindungen sehr effektiv gehemmt wird ($k_i \geq 1.5 \text{ s}^{-1}$) unter der Annahme einer S-Au-Se-Koordination am C-terminalen aktiven Zentrum. Des Weiteren sind Pt(II)-Phospholverbindungen spezifische TrxR-Inhibitoren mit einer 400-fach höheren Affinität für TrxR im Vergleich zur GR. Damit sind sie die besten bisher bekannten TrxR-Inhibitoren (der Au(I)-Phospholkomplex ist der beste bekannte GR-Inhibitor).

4.6.2 Weitere Effekte

Aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit in der Zellkultur (bis zu 30-fach bessere Werte der Au-Phosphole an Glioblastomzellen im Vergleich zum therapeutisch häufig eingesetzten BCNU, Abschnitt 3.6.4) wurde die Au(I)-Phospholverbindung **1** auf ihr DNA-Interkalationsvermögen untersucht, um weitere zelluläre *targets* zu identifizieren. Tatsächlich zeigt sich ein starker Bindungseffekt an der DNA, der momentan noch weiter untersucht wird, um quantitative Aussagen bzgl. DNA-Hemmung auf der einen und TrxR-Hemmung bzw. Eingriff in den Redoxmetabolismus auf der anderen Seite zu treffen. Beide Effekte komplementieren sich im Hinblick auf die Toxizität von Glioblastomzellen.

4.6.3 Strukturelle Aspekte

Die irreversible Hemmung der GR durch [1-Phenyl-2,5-di(2-pyridyl)phosphol]gold(I)chlorid (**1**) resultiert in einer kristallografisch determinierten einmaligen S-Au^I-S-Geometrie. Die Struktur der modifizierten hGR ist (nach ausführlichen Recherchen in den Proteindatenbanken) die erste Röntgenstruktur eines Au(I)-Komplexes mit nahezu linearer Geometrie zwischen den Cystein-S-Atomen mit einem S-Au-S-Winkel von 167.5°. Die S-Au-Koordination ist charakteristisch für Au(I). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für das wegen seiner therapeutischen Eigenschaften bei Arthritis bekannte Auranofin ([[(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosato-S)triethylphosphingold(I)]] angenommen, aber nie bewiesen. Es wurde hypothetisiert, dass der Au(I)-Komplex während des Absorptionsvorganges beide Liganden, den Schwefelzuckerteil und den Triethylphosphinteil, freisetzen könnte, was schließlich zu den finalen Gold-Proteinthiol-Addukten führen würde (Abrams and Murrer, 1993). Es existiert darüber hinaus in der Literatur ein Strukturbeispiel mit linearer Geometrie zwischen Gold, dem Nε2-Stickstoff eines Histidins im aktiven Zentrum und einem P-Atom eines Triethylphosphinteils (PEt₃) (Zou *et al.*, 2000). Da Au(I) lediglich eine moderate Affinität für Stickstoffliganden hat, wurde eine Au-Koordination nicht erwartet, sondern man nahm an, dass [AuPEt₃]⁺ nach Chloridfreisetzung am Protein gebunden würde, gefolgt von einer anschließenden Freisetzung der Abgangsgruppe PEt₃ und damit eine S-Au-S-Koordination erleichtert würde. Die Röntgenstrukturanalyse bestätigte somit, dass (Phosphin)-Au-Cl-Komplexe als *prodrugs* anhand eines schrittweisen Ligandenaustausches agieren.

Das mit einem Pyridylphosphol-Au-Fragment modifizierte Cys284 an der hGR-Oberfläche liegt weit entfernt vom aktiven Zentrum, so dass von ihm kein regulatorischer Einfluss auf die Gesamthemmung zu erwarten ist. Außerdem kann man aufgrund dieser Modifikation darauf schließen, dass der Cl⁻-Ligand leichter ausgetauscht wird als der Phospholligand. Die Cys284-Interaktion geschieht völlig unabhängig von den Interaktionen in dem aktiven Zentrum der GR, d.h. kann auch gleichzeitig mit dieser stattfinden. Das oberflächenexponierte Cys284 war zuvor als mögliche Bindestelle für oxidiertes Glutathionyl-Glutathion identifiziert worden

(Karplus *et al.*, 1989). Der 18 Aminosäuren lange flexible N-terminale Teil der hGR kann strukturanalytisch nicht determiniert werden, daher ist es wahrscheinlich, dass das exponierte Cys3 der hGR ebenfalls eine Modifikation (wie am Cys284) trägt (Becker *et al.*, 1995). Abschließend ist noch die Struktur des möglichen biologischen Dimers der hGR aufgeführt, welches aus den beiden Monomeren der Einheitszelle entlang der zweizähligen kristallographischen Axe gebildet wird.

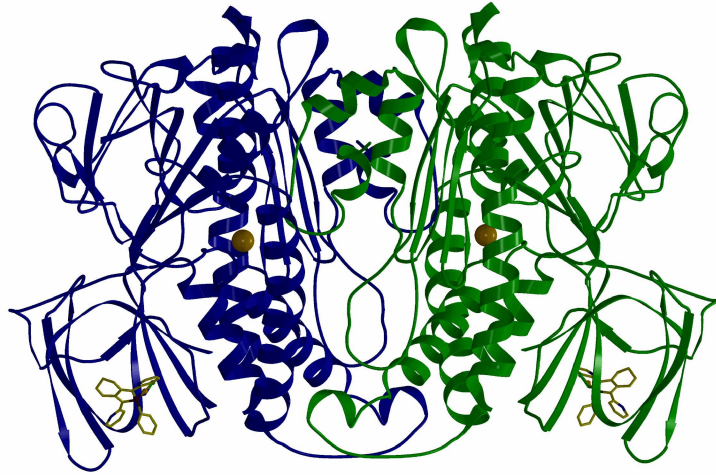


Abb. 4.9: Biologisches Dimer der GR, modifiziert mit zwei Goldatomen (goldfarbene Kugeln) in den aktiven Zentren (Cys58-S-Cys63) und zwei Molekülen Au-Phosphol (ohne Cl) an den Positionen 284 (Oberflächen-cysteine).

4.7 Zur Kristallisation und Strukturaufklärung von Thioredoxinreduktasen

Die große Form der TrxR kristallisiert im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Pyridinnukleotid-Disulfidreduktasefamilie (Abschnitt 1.1.1.2) wesentlich schlechter. Dies kann zum einen darin begründet sein, dass das Enzym durch seine variablen Redoxzustände (bis zur potentiellen EH₆-Form im Gegensatz zur EH₂-Form der GR) und den flexiblen Arm verschiedene Konformationen einnehmen kann und daher weniger homogen erscheint. Versuche, den C-terminalen Arm mittels Substratbeigabe (Trx) zu fixieren, brachten bisher keine Verbesserung der Kristallisationseigenschaften der TrxR. Die Kristallisation des TrxR-Wildtyps mit Selenocystein stellt eine große Herausforderung dar, denn die Voraussetzung für seine Homogenität und Stabilität ist der Selengehalt. Liegt ein Gemisch aus selenhaltiger und selenfreier TrxR vor, kann der Kristallisationsprozess beeinflusst werden. Daher ist für zukünftige Kristallisationsexperimente ein zusätzlicher Reinigungsschritt z.B. mittels der PAO-Sepharose-Methode (Abschnitt 4.1.2) zu empfehlen. TrxR-Isolate aus Geweben können auf diese Weise auch von GR-Restbeständen befreit werden und einer unerwünschten GR-Kristallisation vorbeugen.

Die Kristallisation der rekombinanten, am Sec-mutierten humanen TrxR-Form (hTrxR^{U498C}) ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen und die ersten Daten ihrer Röntgenstrukturanalyse wurden bereits vorgestellt (Abschnitt 3.7.2.2). Diese sind ähnlich zu den Daten, die an einem rTrxR-Mutanten-Kristall gewonnen wurden, jedoch werden die Strukturverfeinerungen genauere Aufschlüsse über die Strukturähnlichkeit der hTrxR und rTrxR geben.

4.7.1 Bekannte TrxR-Strukturen anderer Spezies

Die Thioredoxinreduktase aus *Escherichia coli* wurde zuerst untersucht und führte zur ersten TrxR-Struktur überhaupt (Waksman *et al.*, 1994; Zanetti and Williams, 1967). Es stellte sich heraus, dass sich diese TrxR mit ihrem 35 kDa-Molekulargewicht von den übrigen Disulfidreduktasen (z.B. der Glutathionreduktase oder der Liponamiddehydrogenase mit ungefähr 55 kDa) deutlich unterscheidet. Mechanistische Studien ergaben, dass die Katalyse der prokaryotischen TrxR zu einer für die Mitglieder der Disulfidreduktasefamilie untypischen Domänenausrichtung führt. Die unterschiedliche Orientierung der FAD- und NADPH-Domäne zueinander, die durch eine Rotation dergleichen um 67° zustande kommt, konnte kristallografisch anhand alternativer TrxR-Konformationen gezeigt werden (Lennon *et al.*, 2000; Waksman *et al.*, 1994). Das Cys-Cys-Redoxzentrum liegt tatsächlich in der NADPH-, nicht in der FAD-Domäne, wie man es sonst von Enzymen mit diesen Cofaktoren gewohnt ist. Die dreidimensionale Struktur der *E. coli*-TrxR unterscheidet sich also deutlich von der übrigen Flavoenzyme und nach den Untersuchungen von TrxRs anderer Organismen ist klar, dass kleine und große TrxRs aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede wenig Gemeinsamkeiten haben (bezeichnend ist auch die relativ niedrige Sequenzidentität beider Enzymklassen von 25%). Interpretative Ansätze können also nicht anhand von wechselseitigen Vergleichen zwischen dem prokaryotischen und eukaryotischen System vollzogen werden. Dennoch schließen sich beide Systeme nicht gegenseitig aus, denn jüngere Studien belegen die Coexistenz von kleinen und großen Thioredoxinreduktasen in einem Organismus und geben den Evolutionsaspekten (Abschnitt 1.1.1.3) wieder eine gewisse Aktualität (Novoselov and Gladyshev, 2003).

4.7.2 Die Struktur der Säugetier-TrxR

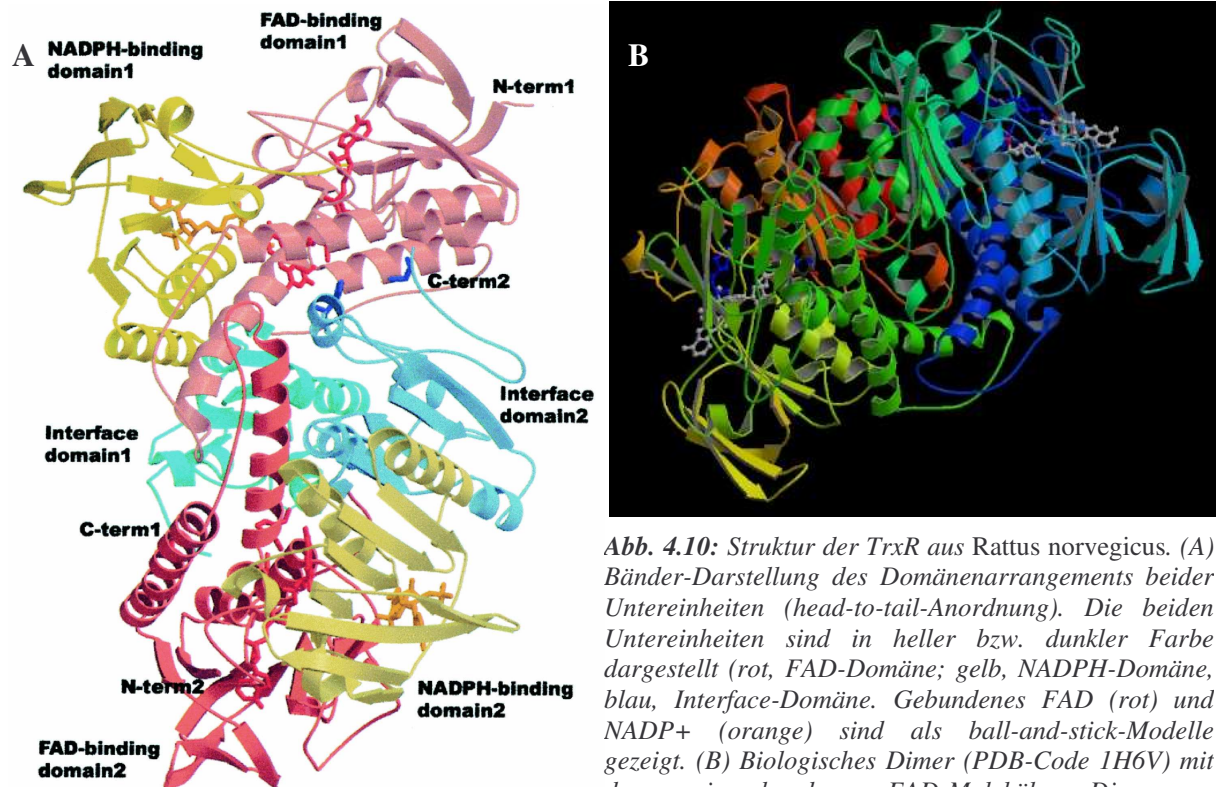


Abb. 4.10: Struktur der TrxR aus *Rattus norvegicus*. (A) Bänder-Darstellung des Domänenarrangements beider Untereinheiten (head-to-tail-Anordnung). Die beiden Untereinheiten sind in heller bzw. dunkler Farbe dargestellt (rot, FAD-Domäne; gelb, NADPH-Domäne, blau, Interface-Domäne). Gebundenes FAD (rot) und NADP⁺ (orange) sind als ball-and-stick-Modelle gezeigt. (B) Biologisches Dimer (PDB-Code 1H6V) mit den zwei gebundenen FAD-Molekülen. Die asymmetrische Einheit im Kristall besteht aus drei rTrxR-Dimeren; die hier isoliert dargestellte Molekülkonformation wird für das biologische Dimer angenommen.

Die Struktur der Cysteinmutante aus *Rattus norvegicus* (rTrxR^{U498C}) ist die bislang einzige Struktur einer großen TrxR und wurde im Komplex mit dem Cofaktor NADP⁺ mittels Röntgenstrukturanalyse bei 3.0 Å gelöst (Abb. 4.3). Die Dimerstruktur der GR aus humanen Erythrozyten (PDB-Code 1GRA) mit 36% Sequenzidentität zur TrxR wurde als Suchmodell für das *molecular replacement* verwendet. Die Gesamtstruktur der TrxR gleicht der der GR einschließlich der konservierten Aminosäurereste für die Bindung der beiden Cofaktoren NADPH und FAD. Der für die große TrxR typische C-terminale Arm konnte kristallografisch ermittelt werden. Die letzten 13 Aminosäurereste vor der C-terminalen Erweiterung der TrxR (AS 470-483) nehmen die gleiche Konformation ein wie die entsprechenden Reste der GR. Die danach folgenden AS-Reste, V484, T485 und K486, sind in Richtung der Oberfläche der TrxR ausgerichtet und verlaufen antiparallel zum β -Faltblatt in der *interface*-Domäne. An Position R487 macht die AS-Kette einen Knick und verläuft dann parallel zum äußeren Strang des anderen β -Faltblatts. Durch eine Wendung an der Position S495 wird der restliche Teil des C-terminalen Arms (die letzten vier Aminosäuren G, C, U, G) schließlich dem aktiven Zentrum (mit C, C) der zweiten Untereinheit zugewendet. Es ist anzunehmen, dass der C-Terminus bei der humanen TrxR-Mutante (hTrxR^{U498C}) ähnlich ausgerichtet ist, jedoch sind drei andere Aminosäuren A, S und A anstatt S, D und G an den Positionen 495, 491 und 490 vorhanden (Abb. 4.3). Die Ausrichtung zum C-C-Paar im aktiven Zentrum kann daher etwas anders erfolgen. Eine Interaktion zwischen dem Sauerstoffatom der Hauptkette von C498 und der Seitenkette von Y116 konnte festgestellt werden. Letztere Aminosäure ist konserviert in der GR und interagiert mit gebundenem Glutathion. 30% der Aminosäurereste in der *interface*-Domäne der TrxR sind konserviert in der GR und umgekehrt sind solche Reste, die

bei der GR Wasserstoffbrückenbindungen mit GSSG bilden, auch konserviert in der TrxR. Trotz dieser und anderer struktureller Gemeinsamkeiten konnte mittels *Protein-engineering* (Abschnitt 4.2) keine TrxR mit GR-Aktivität hergestellt werden. Eine höhere Strukturauflösung wäre im Hinblick auf die Untersuchung feinerer Unterschiede zwischen den beiden Enzymen wünschenswert. Außerdem existieren noch keine Strukturdaten über die Realisierung der Trx-Bindung, es wurde lediglich ein Model des Trx-TrxR-Komplexes erstellt, welches das gebundene Trx an der Oberfläche der TrxR in seiner kürzesten Entfernung zum C-terminalen Redoxpaar zeigt. Die endgültige Konformation des C-Terminus der TrxR im oxidierten bzw. reduzierten Zustand konnte bislang strukturell nicht über die Kristallform erfasst werden, was eventuell auf vorhandene Mischzustände zurückgeführt werden kann. Die Kristallisation unter anaeroben Bedingungen würde sich hier anbieten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die im Säugerorganismus als selenhaltiges Enzym vorkommende homodimere Thioredoxinreduktase (TrxR: $\text{TrxS}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Trx(SH)}_2 + \text{NADP}^+$) ist zusammen mit der Glutathionreduktase zentraler Bestandteil des zellulären Thiolmetabolismus, der über die antioxidative Abwehr hinaus auch an der Redoxregulation intra- und extrazellulärer Prozesse beteiligt ist. Das Thioredoxin- und das Glutathionsystem arbeiten in verschiedenen Organismen als parallele, sich ergänzende oder aber auch als sich ersetzende Systeme. Eine Besonderheit des Thioredoxinsystems liegt im Selenocysteingehalt der TrxR, der die Substratvielfalt dieses Enzyms begründet. Über die Beeinflussung des Selenocysteins, sei es durch Modifikation oder Mutation, lässt sich die TrxR und ihr Thioredoxinsystem nachhaltig funktionell und strukturell verändern. Hier setzt die redoxmodifizierende Chemotherapie an, die den oxidativen Begleiterscheinungen und den veränderten Funktionen solcher Systeme im Krankheitsverlauf Rechnung trägt (Gromer *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Beiträge zur biochemischen und kristallographischen Charakterisierung der Flavoproteine Thioredoxinreduktase und Glutathionreduktase im Hinblick auf ihr Potential als Zielmoleküle neu entwickelter Disulfidreduktaseinhibitoren geleistet. Die Inhibitorstudien wurden durch Studien an verschiedenen TrxR-Mutanten, weiterführenden differentiellen Genom- und Proteomanalysen sowie Studien am Tiermodell komplementiert.

Für die TrxR-Studien wurden rekombinante und native TrxR aus humaner Plazenta verwendet. Zur Gewinnung der nativen TrxR aus 17 Plazenten wurde ein etabliertes Aufreinigungsverfahren in acht Schritten angewendet und weiter optimiert, so dass 17.8 mg selenhaltiges Enzym isoliert werden konnten. Im heterologen System konnten TrxR-Mutanten ohne Selenocystein in ausreichenden Mengen exprimiert werden. Diese bestanden in einer am C-terminalen Selenocystein mutierten TrxR-Mutante sowie in anderen, C-terminal-verkürzten TrxR-Mutanten und wurden auf Substratspezifität und Katalyseeigenschaften untersucht. Die Substrateigenschaften der trunkierten TrxR-Mutanten konnten die von Holmgren aufgestellte Hypothese einer GR-ähnlichen TrxR nach der Entfernung des C-Terminus widerlegen. Trotz ihrer homologen Bereiche in den Substratbindungsregionen sind die TrxR und GR nicht ineinander zu überführen. Die Cysteinmutante der hTrxR wurde vergleichend zum Selenocystein-Wildtyp charakterisiert. Trotz einer sonst geringen Aktivität mit den üblichen Substraten Trx und DTNB erwies sie sich als potentes Enzym in der Menadionreduktion ($k_{\text{cat}}/K_M = 7.4 \pm 1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) *in vitro* und im Zusammenhang mit einem induzierten Lipid-Transfer in die Zelle als apoptoseauslösend. Anhand dieser und anderer Varianten der TrxR können die komplexen zellulären Funktionen des Trx-Systems aufgeklärt werden.

Die Kristallisation der humanen TrxR stand ebenfalls im Mittelpunkt dieser Dissertation. Während die Kristallisation der nativ gereinigten TrxR mit Selen lediglich zu Mikrokristallen auf Präzipitat führte, gelang es, große und optisch hochwertige Einkristalle der Cysteinmutante der TrxR zu produzieren, von der erste Röntgenstrukturdaten bis 2.9 Å gewonnen werden konnten.

Da die Kenntnis der charakteristischen Eigenschaften der TrxR-Mutanten auch der Aufklärung mechanistischer Aspekte in den Inhibitorstudien dient, wurden diese ebenso wie die GR als selenfreie Vergleichsvarianten zum hTrxR-Wildtyp mit einbezogen.

Die erste im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestete Inhibitorklasse setzte sich aus an Nitrofurancarbohydrazid gekoppelten *Cis*-Diamindichlorplatin-Komplexen (CDDP-Komplexe) zusammen, anhand derer getestet werden sollte, ob die Linkertechnik zwischen

reversiblen und irreversiblen Inhibitoren mit moderaten Eigenschaften zu irreversiblen Inhibitoren mit potenten Eigenschaften führt. Dies konnte bestätigt werden, denn die CDDP-Komplexe erwiesen sich in enzymatischen *in vitro*-Untersuchungen als irreversible und selektive Inhibitoren der NADPH-reduzierten TrxR im nanomolaren Konzentrationsbereich, mit maximalen Geschwindigkeitskonstanten k_i um 1 min^{-1} in Kinetiken pseudo-erster Ordnung. Zellkulturexperimente und DNA-Interaktionsstudien bestätigten, dass die TrxR-Hemmung der CDDP-Komplexe einen bedeutenden Beitrag zur Toxizität in Tumorzellen leisten kann (Millet *et al.*, 2005).

Die bekannten *in vitro*-Eigenschaften der Inhibitorklasse der 2,2':6',2''-Terpyridinplatin(II)-Komplexe sollten in dieser Dissertation *in vivo* in einem Glioblastom-Rattenmodell untersucht werden. Die in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Heidelberg durchgeführten Tierversuchsreihen mit verschiedenen Therapiemodellen und MRI-Auswertungen wurden durch Messungen verschiedener biochemischer, insbesondere redox-chemischer Parameter in den Geweben der Ratten ergänzt. Es ergaben sich gewebespezifische Veränderungen in der Redoxaktivität mit einer spezifischen TrxR-Hemmung im Tumorgewebe, die aber nicht mit der Auslösung der apoptotischen Kaskade einhergingen. Genom- sowie Proteomanalysen von behandelten Glioblastomzellen weisen auf einen chemotherapeutisch induzierten Zellzyklusarrest hin. Es konnte somit gezeigt werden, dass Veränderungen auf Redoxebene unter Beibehaltung normaler oxidativer Verhältnisse chemotherapeutische Wirkungen unterstützen (Urig *et al.*, 2005; Ahmadi *et al.*, 2005).

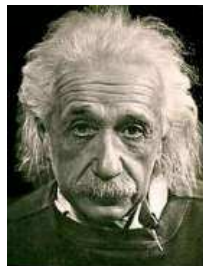
Phosphole sind Phosphacyclopentadiene mit schwachem aromatischen Charakter, die bisher nicht für ihre Hemmeigenschaften von Enzymen bekannt waren und deshalb eine neue und besonders interessante Substanzklasse potentieller Chemotherapeutika darstellen. Das Inhibitorpotential zweier Platin- und zweier Goldkomplexe konnte in intensiven Kinetikstudien an der TrxR und der GR bestätigt werden, mit einer deutlichen Präferenz der Platin-Phospholkomplexe für die TrxR. Gold-Phospholkomplexe sind sehr effiziente Inhibitoren beider Disulfidreduktasen im unteren nanomolaren Bereich und gehen nach einer ersten kompetitiven Kinetik sehr schnell in die irreversible Phase zur kovalenten Modifikation der Enzyme über. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit, einen hGR-Phosphol-Komplex zu kristallisieren und seine Röntgenstruktur bei 2.6 \AA zu lösen. Die lineare S-Au-S-Geometrie zwischen den Cysteinen im aktiven Zentrum der hGR konnte zum ersten Mal in einer Proteinstruktur beobachtet werden (Urig *et al.*, in press; Koncarevic *et al.*, 2005; Deponte *et al.*, 2005).

Ergänzende DNA-Schmelzkurvenanalysen und Proliferationsstudien in Glioblastom-Zellkultur ergaben für die Phospholkomplexe Aktivitäten im mikromolaren Bereich und unterstreichen ebenfalls den chemotherapeutisch günstigen Effekt über die Redoxregulation.

The most beautiful thing we can experience is the mysterious.

It is the source of all true art and science.

- Albert Einstein, 1879-1955 –



Paul Ehrlich (1854-1915)**Vater der Chemotherapie**

Das von ihm entdeckte "Salvarsan" war das erste Chemotherapeutikum der Medizingeschichte. 1908 erhielt er zusammen mit Ilja Iljitsch Metschnikow den Nobelpreis für Medizin für seine Entdeckungen auf dem Gebiet der Chemotherapie (Wertbestimmung des Diphtherieserums).

Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.

"Die Gesellschaft erstrebt einen regionalen Zusammenschluss der an der Chemotherapie, ihren Grundlagen und ihrer Anwendung interessierten Human- und Veterinärmediziner, Naturwissenschaftler und solcher Kreise, die diese Interessen unterstützen."

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abate, C., Luk, D. and Curran, T. (1990) A ubiquitous nuclear protein stimulates the DNA-binding activity of fos and jun indirectly. *Cell Growth Differ.*, **1**, 455-462.
- Abrams, M.J. and Murrer, B.A. (1993) Metal compounds in therapy and diagnosis. *Science*, **261**, 725-730.
- Ahmadi, R., Urig, S., Hartmann, M., Helmke, B.M., Koncarević, S., Allenberger, B., Kienhoefer, C., Neher, M., Steiner, H.-H., Unterberg, A., Herold-Mende, C. and Becker, K. (2005) Antiglioma Activity of 2,2':6',2''-terpyridineplatinum(II) complexes in a rat model - effects on cellular redox metabolism. *Free Radic. Biol. Med.*, *in press*.
- Alberts, B., Bray, D. and Lewis, J. (2002) *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
- Anders, M.W. and Dekant, W. (1998) Glutathione-dependent bioactivation of haloalkenes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 501-537.
- Anderson, M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.*, **111-112**, 1-14.
- Andersson, M., Holmgren, A. and Spyrou, G. (1996) NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10116-10120.
- Anestal, K. and Arner, E.S. (2003) Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J. Biol. Chem.*, **278**, 15966-15972.
- Arnér, E.S., Bjornstedt, M. and Holmgren, A. (1995) 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3479-3482.
- Arnér, E.S. and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6102-6109.
- Arnér, E.S., Nakamura, H., Sasada, T., Yodoi, J., Holmgren, A. and Spyrou, G. (2001) Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1170-1178.
- Arnér, E.S., Nordberg, J. and Holmgren, A. (1996) Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 268-274.
- Arnér, E.S., Sarioglu, H., Lottspeich, F., Holmgren, A. and Bock, A. (1999a) High-level expression in *Escherichia coli* of selenocysteine-containing rat thioredoxin reductase utilizing gene fusions with engineered bacterial-type SECIS elements and co-expression with the selA, selB and selC genes. *J. Mol. Biol.*, **292**, 1003-1016.
- Arnér, E.S., Zhong, L. and Holmgren, A. (1999b) Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.*, **300**, 226-239.
- Arcott, L.D., Gromer, S., Schirmer, R.H., Becker, K. and Williams, C.H., Jr. (1997) The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 3621-3626.
- Arteel, G.E., Briviba, K. and Sies, H. (1999) Function of thioredoxin reductase as a peroxynitrite reductase using selenocystine or ebselen. *Chemical Research in Toxicology*, **12**, 264-269.
- Arthur, J.R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol. Life Sci.*, **57**, 1825-1835.
- Bachur, N.R., Gordon, S.L. and Gee, M.V. (1978) A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res.*, **38**, 1745-1750.
- Bai, J., Nakamura, H., Kwon, Y.W., Hattori, I., Yamaguchi, Y., Kim, Y.C., Kondo, N., Oka, S., Ueda, S., Masutani, H. and Yodoi, J. (2003) Critical roles of thioredoxin in nerve growth factor-mediated signal transduction and neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Neurosci.*, **23**, 503-509.
- Baker, A., Payne, C.M., Briehl, M.M. and Powis, G. (1997) Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **57**, 5162-5167.

- Balendiran, G.K., Dabur, R. and Fraser, D. (2004) The role of glutathione in cancer. *Cell. Biochem. Funct.*, **22**, 343-352.
- Bandyopadhyay, S., Starke, D.W., Mieyal, J.J. and Gronostajski, R.M. (1998) Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J. Biol. Chem.*, **273**, 392-397.
- Bar-Noy, S., Gorlatov, S.N. and Stadtman, T.C. (2001) Overexpression of wild type and SeCys/Cys mutant of human thioredoxin reductase in *E. coli*: the role of selenocysteine in the catalytic activity. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 51-61.
- Bauer, H., Gromer, S., Urbani, A., Schnolzer, M., Schirmer, R.H. and Muller, H.M. (2003a) Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4272-4281.
- Bauer, H., Massey, V., Arscott, L.D., Schirmer, R.H., Ballou, D.P. and Williams, C.H., Jr. (2003b) The mechanism of high Mr thioredoxin reductase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 33020-33028.
- Becker, K., Gromer, S., Schirmer, R.H. and Muller, S. (2000) Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6118-6125.
- Becker, K., Gui, M. and Schirmer, R.H. (1995) Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *Eur. J. Biochem.*, **234**, 472-478.
- Becker, K., Gui, M., Traxler, A., Kirsten, C. and Schirmer, R.H. (1994) Redox processes in malaria and other parasitic diseases. Determination of intracellular glutathione. *Histochemistry*, **102**, 389-395.
- Becker, K., Herold-Mende, C., Park, J.J., Lowe, G. and Schirmer, R.H. (2001) Human thioredoxin reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2' '- terpyridine)platinum(II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy. *J. Med. Chem.*, **44**, 2784-2792.
- Becker, K., Krebs, B. and Schirmer, R.H. (1991) Protein-chemical standardization of the erythrocyte glutathione reductase activation test (EGRAC test). Application to hypothyroidism. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **61**, 180-187.
- Becker, K., Savvides, S.N., Keese, M., Schirmer, R.H. and Karplus, P.A. (1998) Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO- carriers. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 267-271.
- Becker, K. and Schirmer, R.H. (1995) 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea as thiol-carbamoylating agent in biological systems. *Methods Enzymol.*, **251**, 173-188.
- Begemann, M., Kashimawo, S.A., Heitjan, D.F., Schiff, P.B., Bruce, J.N. and Weinstein, I.B. (1998) Treatment of human glioblastoma cells with the staurosporine derivative CGP 41251 inhibits CDC2 and CDK2 kinase activity and increases radiation sensitivity. *Anticancer Res.*, **18**, 2275-2282.
- Behne, D. and Kyriakopoulos, A. (2001) Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.*, **21**, 453-473.
- Beutler, E. (1984) Redox Cell Metabolism-A Manual of Biochemical Methods. *Grune & Stratton, London*.
- Biot, C., Dessolin, J., Grellier, P. and Davioud-Charvet, E. (2003) Double-drug development against antioxidant enzymes from *Plasmodium falciparum*. *Redox. Rep.*, **8**, 280-283.
- Birner, P., Piribauer, M., Fischer, I., Gatterbauer, B., Marosi, C., Ungersbock, K., Rossler, K., Budka, H. and Hainfellner, J.A. (2002) Prognostic relevance of p53 protein expression in glioblastoma. *Oncol. Rep.*, **9**, 703-707.
- Bironaite, D., Anusevicius, Z., Jacquot, J.P. and Cenas, N. (1998) Interaction of quinones with Arabidopsis thaliana thioredoxin reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1383**, 82-92.
- Bjornstedt, M., Kumar, S. and Holmgren, A. (1992) Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8030-8034.
- Black, D.L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 291-336.
- Blumenstiel, K., Schoneck, R., Yardley, V., Croft, S.L. and Krauth-Siegel, R.L. (1999) Nitrofurans as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1791-1799.
- Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B. and Zinoni, F. (1991) Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.*, **5**, 515-520.

- Bohme, C.C., Arscott, L.D., Becker, K., Schirmer, R.H. and Williams, C.H., Jr. (2000) Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Comparison with the human enzyme. *J. Biol. Chem.*, **275**, 37317-37323.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bradshaw, T.D., Bibby, M.C., Double, J.A., Fichtner, I., Cooper, P.A., Alley, M.C., Donohue, S., Stinson, S.F., Tomaszewski, J.E., Sausville, E.A. and Stevens, M.F. (2002) Preclinical evaluation of amino acid prodrugs of novel antitumor 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazoles. *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 239-246.
- Bradshaw, T.D., Matthews, C.S., Cookson, J., Chew, E.H., Shah, M., Bailey, K., Monks, A., Harris, E., Westwell, A.D., Wells, G., Laughton, C.A. and Stevens, M.F. (2005) Elucidation of thioredoxin as a molecular target for antitumor quinols. *Cancer Res.*, **65**, 3911-3919.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T. and Schmitt, C.A. (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, **436**, 660-665.
- Briehl, M.M., Baker, A.F., Siemankowski, L.M. and Morreale, J. (1997) Modulation of antioxidant defenses during apoptosis. *Oncol. Res.*, **9**, 281-285.
- Britten, R.A., Green, J.A. and Warenus, H.M. (1992) Cellular glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) activity in human ovarian tumor biopsies following exposure to alkylating agents. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **24**, 527-531.
- Buness, A., Huber, W., Steiner, K., Sultmann, H. and Poustka, A. (2005) arrayMagic: two-colour cDNA microarray quality control and preprocessing. *Bioinformatics*, **21**, 554-556.
- Cailleau, R., Olive, M. and Cruciger, Q.V. (1978) Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, **14**, 911-915.
- Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A. and Ghezzi, P. (2002) Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 9745-9749.
- Cenas, N., Nivinskas, H., Anusevicius, Z., Sarlauskas, J., Lederer, F. and Arner, E.S. (2004) Interactions of quinones with thioredoxin reductase: a challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein. *J. Biol. Chem.*, **279**, 2583-2592.
- Cenas, N.K., Bironaite, D.A., Kulys, J.J. and Sikhova, N.M. (1991) Interaction of nitrofurans with glutathione reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 195-199.
- Chae, H.Z., Kang, S.W. and Rhee, S.G. (1999) Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.*, **300**, 219-226.
- Chang, B.D., Broude, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K. and Roninson, I.B. (1999a) A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.*, **59**, 3761-3767.
- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J. and Roninson, I.B. (1999b) Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, **18**, 4808-4818.
- Chen, J. and Berry, M.J. (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J. Neurochem.*, **86**, 1-12.
- Ciriolo, M.R., Paci, M., Sette, M., De Martino, A., Bozzi, A. and Rotilio, G. (1993) Transduction of reducing power across the plasma membrane by reduced glutathione. A ¹H-NMR spin-echo study of intact human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 711-718.
- Compton, S.J. and Jones, C.G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.*, **151**, 369.
- Cooper, C.E., Patel, R.P., Brookes, P.S. and Darley-Usmar, V.M. (2002) Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 489-492.
- Cortes, A., Cascante, M., Cardenas, M.L. and Cornish-Bowden, A. (2001) Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data. *Biochem. J.*, **357**, 263-268.

- Cotgreave, I.A. and Gerdes, R.G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 1-9.
- Cusumano, M., Di Pietro, M.L., Giannetto, A. and Romano, F. (2000) Influence of DNA on the rate of ligand substitution in platinum(II) terpyridine complexes. *Inorg. Chem.*, **39**, 50-55.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Davioud-Charvet, E., Becker, K., Landry, V., Gromer, S., Loge, C. and Sergheraert, C. (1999) Synthesis of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzamides) as alternative substrates for trypanothione reductase and thioredoxin reductase: a microtiter colorimetric assay for inhibitor screening. *Anal. Biochem.*, **268**, 1-8.
- Davioud-Charvet, E., McLeish, M.J., Veine, D.M., Giegel, D., Arscott, L.D., Andricopulo, A.D., Becker, K., Muller, S., Schirmer, R.H., Williams, C.H., Jr. and Kenyon, G.L. (2003) Mechanism-based inactivation of thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum* by Mannich bases. Implication for cytotoxicity. *Biochemistry*, **42**, 13319-13330.
- De Angelis, L.M., Burger, P.C., Green, S.B. and Cairncross, H.G. (1998) Malignant Gliomas: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann. Neurol.*, **44**, 691-695.
- Deas, O., Dumont, C., MacFarlane, M., Rouleau, M., Hebib, C., Harper, F., Hirsch, F., Charpentier, B., Cohen, G.M. and Senik, A. (1998) Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.*, **161**, 3375-3383.
- Denicourt, C. and Dowdy, S.F. (2004) Medicine. Targeting apoptotic pathways in cancer cells. *Science*, **305**, 1411-1413.
- Deponte, M., Urig, S., Arscott, L.D., Fritz-Wolf, K., Réau, R., Herold-Mende, C., Koncarevic, S., Meyer, M., Davioud-Charvet, E., Ballou, D.P., Williams, C.H., Jr. and Becker, K. (2005) Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *J. Biol. Chem.*, **280**, 20628-20637.
- Dessolin, J., Biot, C. and Davioud-Charvet, E. (2001) Bromination studies of the 2,3-dimethylnaphthazarin core allowing easy access to naphthazarin derivatives. *J. Org. Chem.*, **66**, 5616-5619.
- Donnellan, R. and Chetty, R. (1999) Cyclin E in human cancers. *Faseb J.*, **13**, 773-780.
- Ejima, K., Nanri, H., Toki, N., Kashimura, M. and Ikeda, M. (1999) Localization of thioredoxin reductase and thioredoxin in normal human placenta and their protective effect against oxidative stress. *Placenta*, **20**, 95-101.
- Engman, L., Al-Maharik, N., McNaughton, M., Birmingham, A. and Powis, G. (2003a) Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium antioxidants. *Anticancer Drugs*, **14**, 153-161.
- Engman, L., Al-Maharik, N., McNaughton, M., Birmingham, A. and Powis, G. (2003b) Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 5091-5100.
- Engman, L., Kandra, T., Gallegos, A., Williams, R. and Powis, G. (2000) Water-soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anticancer Drug Des.*, **15**, 323-330.
- Farber, P.M., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Becker, K. and Schirmer, R.H. (1998) Recombinant *Plasmodium falciparum* glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Lett.*, **422**, 311-314.
- Fave, C., Cho, T.Y., Hissler, M., Chen, C.W., Luh, T.Y., Wu, C.C. and Réau, R. (2003) First examples of organophosphorus-containing materials for light-emitting diodes. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9254-9255.
- Fave, C., Hissler, M., Karpati, T., Rault-Berthelot, J., Deborde, V., Toupet, L., Nyulaszi, L. and Réau, R. (2004) Connecting pi-chromophores by sigma-P-P bonds: new type of assemblies exhibiting sigma-pi-conjugation. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6058-6063.
- Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A. and Vlamis-Gardikas, A. (2005) A novel monothiol glutaredoxin (GRX4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*
- Filomeni, G., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 1057-1064.

- Filomeni, G., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. (2003) Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *Faseb J.*, **17**, 64-66.
- Findlay, V.J., Townsend, D.M., Saavedra, J.E., Buzard, G.S., Citro, M.L., Keefer, L.K., Ji, X. and Tew, K.D. (2004) Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug. *Mol. Pharmacol.*, **65**, 1070-1079.
- Flattery-O'Brien, J.A. and Dawes, I.W. (1998) Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8564-8571.
- Forman, H.J. and Dickinson, D.A. (2003) Oxidative signaling and glutathione synthesis. *Biofactors*, **17**, 1-12.
- Friesen, C., Kiess, Y. and Debatin, K.M. (2004) A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ.*, **11**, S73-S85.
- Frischer, H. and Ahmad, T. (1977) Severe generalized glutathione reductase deficiency after antitumor chemotherapy with BCNU" [1,3-bis(chloroethyl)-1-nitrosourea]. *J. Lab. Clin. Med.*, **89**, 1080-1091.
- Fujiwara, N., Fujii, T., Fujii, J. and Taniguchi, N. (2001) Roles of N-terminal active cysteines and C-terminal cysteine-selenocysteine in the catalytic mechanism of mammalian thioredoxin reductase. *J. Biochem.*, **129**, 803-812.
- Furman, C., Rundlof, A.K., Larigauderie, G., Jaye, M., Bricca, G., Copin, C., Kandoussi, A.M., Fruchart, J.C., Arner, E.S. and Rouis, M. (2004) Thioredoxin reductase 1 is upregulated in atherosclerotic plaques: specific induction of the promoter in human macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 71-85.
- Galanski, M., Arion, V.B., Jakupec, M.A. and Keppler, B.K. (2003) Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 2078-2089.
- Gan, L., Liu, Q., Xu, H.-B., Zhu, Y.-S. and Yang, X.-L. (2002) Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biological Trace Element Research*, **89**, 165-175.
- Gasdaska, J.R., Gasdaska, P.Y., Gallegos, A. and Powis, G. (1996) Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue. *Genomics*, **37**, 257-259.
- Gasdaska, P.Y., Gasdaska, J.R., Cochran, S. and Powis, G. (1995) Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.*, **373**, 5-9.
- Gatti, L., Supino, R., Perego, P., Pavesi, R., Caserini, C., Carenini, N., Righetti, S.C., Zuco, V. and Zunino, F. (2002) Apoptosis and growth arrest induced by platinum compounds in U2-OS cells reflect a specific DNA damage recognition associated with a different p53-mediated response. *Cell Death Differ.*, **9**, 1352-1359.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119**, 493-501.
- Ghibelli, L., Coppola, S., Rotilio, G., Lafavia, E., Maresca, V. and Ciriolo, M.R. (1995) Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 313-320.
- Gilberger, T.W., Walter, R.D. and Muller, S. (1997) Identification and characterization of the functional amino acids at the active site of the large thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29584-29589.
- Gladyshev, V.N., Factor, V.M., Housseau, F. and Hatfield, D.L. (1998) Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 488-493.
- Gladyshev, V.N., Kryukov, G.V., Fomenko, D.E. and Hatfield, D.L. (2004) Identification of trace element-containing proteins in genomic databases. *Annu Rev Nutr.*, **24**, 579-596.
- Gladyshev, V.N., Stadtman, T.C., Hatfield, D.L. and Jeang, K.T. (1999) Levels of major selenoproteins in T cells decrease during HIV infection and low molecular mass selenium compounds increase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 835-839.
- Gorlatov, S.N. and Stadtman, T.C. (1998) Human thioredoxin reductase from HeLa cells: selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activity and reduction with NADPH influences

- affinity to heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, **95**, 8520-8525.
- Gorlatov, S.N. and Stadtman, T.C. (1999) Human selenium-dependent thioredoxin reductase from HeLa cells: properties of forms with differing heparin affinities. *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**, 133-142.
- Gottlieb, R.A. (2001) Mitochondria and apoptosis. *Biological Signals and Receptors*, **10**, 147-161.
- Grobben, B., De Deyn, P.P. and Slegers, H. (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.*, **310**, 257-270.
- Gromer, S. (1998) Die Thioredoxinreduktase von Mensch und Maus-ein Selenoenzym als Zielmolekül von Chemotherapeutika. *Biochemiezentrum*. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Gromer, S., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Schirmer, R.H. and Becker, K. (1998a) Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20096-20101.
- Gromer, S. and Gross, J.H. (2002) Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase. Implications for the antitumor effects of selenium. *J. Biol. Chem.*, **277**, 9701-9706.
- Gromer, S., Johansson, L., Bauer, H., Arscott, L.D., Rauch, S., Ballou, D.P., Williams, C.H., Jr., Schirmer, R.H. and Arner, E.S. (2003) Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 12618-12623.
- Gromer, S., Merkle, H., Schirmer, R.H. and Becker, K. (2002) Human placenta thioredoxin reductase: preparation and inhibitor studies. *Methods Enzymol.*, **347**, 382-394.
- Gromer, S., Schirmer, R.H. and Becker, K. (1997) The 58 kDa mouse selenoprotein is a BCNU-sensitive thioredoxin reductase. *FEBS Lett.*, **412**, 318-320.
- Gromer, S., Urig, S. and Becker, K. (2004) The thioredoxin system--from science to clinic. *Med. Res. Rev.*, **24**, 40-89.
- Gromer, S., Wissing, J., Behne, D., Ashman, K., Schirmer, R.H., Flohe, L. and Becker, K. (1998b) A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, **332** (Pt 2), 591-592.
- Haapasalo, H., Kylaniemi, M., Paunul, N., Kinnula, V.L. and Soini, Y. (2003) Expression of antioxidant enzymes in astrocytic brain tumors. *Brain Pathol.*, **13**, 155-164.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B.C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 743-749.
- Hagg, D., Englund, M.C., Jernas, M., Schmidt, C., Wiklund, O., Hulten, L.M., Ohlsson, B.G., Carlsson, L.M., Carlsson, B. and Svensson, P.A. (2005) Oxidized LDL induces a coordinated up-regulation of the glutathione and thioredoxin systems in human macrophages. *Atherosclerosis*.
- Hajduk, P.J., Meadows, R.P. and Fesik, S.W. (1997) Discovering high-affinity ligands for proteins. *Science*, **278**, 497,499.
- Ham, S.W., Song, J.H., Kim, H.I. and Jin, S. (2000) Mechanism of cell cycle arrest by menadione. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **21**, 1173-1174.
- Harting, I., Hartmann, M., Jost, G., Sommer, C., Ahmadi, R., Heiland, S. and Sartor, K. (2003) Differentiating primary central nervous system lymphoma from glioma in humans using localised proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurosci. Lett.*, **342**, 163-166.
- Hay, C., Fave, C., Hissler, M., Rault-Berthelot, J. and Réau, R. (2003) Synthesis and electronic properties of alternating alpha,alpha'-thiophene-phosphole oligomers. *Org. Lett.*, **5**, 3467-3470.
- Hay, C., Hissler, M., Fischmeister, C., Rault-Berthelot, J., Toupet, L., Nyulaszi, L. and Réau, R. (2001) Phosphole-containing pi-conjugated systems: from model molecules to polymer films on electrodes. *Chem. Eur. J.*, **7**, 4222-4236.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 51-88.
- Hecker, B. (2004) Untersuchungen zum eukaryontischen Thioredoxinstoffwechsel: Expression der Thioredoxin-Glutathion-Reduktase und vergleichende Studien zum Dimerisierungsverhalten von Thioredoxinen. *Institut für Biochemie der Ernährung*. Justus-Liebig-Universität, Giessen.

- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, **6**, 986-994.
- Henderson, G.B., Murgolo, N.J., Kuriyan, J., Osapay, K., Kominos, D., Berry, A., Scrutton, N.S., Hinchliffe, N.W., Perham, R.N. and Cerami, A. (1991) Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 8769-8773.
- Herold-Mende, C., Steiner, H.H., Andl, T., Riede, D., Buttler, A., Reisser, C., Fusenig, N.E. and Mueller, M.M. (1999) Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab. Invest.*, **79**, 1573-1582.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K. and Yodoi, J. (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 3633-3638.
- Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K. and Yodoi, J. (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, **274**, 27891-27897.
- Hofmann, E.R., Boyanapalli, M., Lindner, D.J., Weihua, X., Hassel, B.A., Jagus, R., Gutierrez, P.L. and Kalvakolanu, D.V. (1998) Thioredoxin reductase mediates cell death effects of the combination of beta interferon and retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6493-6504.
- Holmgren, A. and Bjornstedt, M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.*, **252**, 199-208.
- Hu, J., Ma, X., Lindner, D.J., Karra, S., Hofmann, E.R., Reddy, S.P. and Kalvakolanu, D.V. (2001) Modulation of p53 dependent gene expression and cell death through thioredoxin-thioredoxin reductase by the Interferon-Retinoid combination. *Oncogene*, **20**, 4235-4248.
- Huang, R.P., Hossain, M.Z., Huang, R., Gano, J., Fan, Y. and Boynton, A.L. (2001) Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer*, **92**, 130-138.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A. and Vingron, M. (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, **18 Suppl 1**, S96-104.
- Irmeler, A., Bechthold, A., Davioud-Charvet, E., Hofmann, V., Réau, R., Gromer, S., Schirmer, R.H. and Becker, K. (2002) Disulfide reductases-current development. *Flavins and Flavoproteins*, **14th ed.**, 803-815.
- Ishikawa, T. (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 463-468.
- Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N.M. and Sies, H. (2003) Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **42**, 4742-4758.
- Jacobsen, B.S. and Branton, D. (1977) Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science*, **195**, 302-304.
- Jansen, B.A., Brouwer, J. and Reedijk, J. (2002) Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 197-202.
- Jendrossek, V., Belka, C. and Bamberg, M. (2003) Novel chemotherapeutic agents for the treatment of glioblastoma multiforme. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **12**, 1899-1924.
- Jeremias, I., Steiner, H.H., Benner, A., Debatin, K.M. and Herold-Mende, C. (2004) Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. *Acta Neurochir. (Wien)*, **146**, 721-729.
- Jiang, Z., Arner, E.S., Mu, Y., Johansson, L., Shi, J., Zhao, S., Liu, S., Wang, R., Zhang, T., Yan, G., Liu, J., Shen, J. and Luo, G. (2004) Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 94-101.
- Johansson, C. (2004) Biochemical properties of human glutaredoxins. *Thesis, Medical Nobel Institute for Biochemistry, Karolinska Institutet, Stockholm.*

- Johansson, L., Chen, C., Thorell, J.O., Fredriksson, A., Stone-Elander, S., Gafvelin, G. and Arner, E.S. (2004) Exploiting the 21st amino acid-purifying and labeling proteins by selenolate targeting. *Nat. Methods*, **1**, 61-66.
- Jordan, A. and Reichard, P. (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 71-98.
- Kahlos, K., Soini, Y., Saily, M., Koistinen, P., Kakko, S., Paakko, P., Holmgren, A. and Kinnula, V.L. (2001) Up-regulation of thioredoxin and thioredoxin reductase in human malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer*, **95**, 198-204.
- Kaludjerovic, G.N., Miljkovic, D., Momcilovic, M., Djinovic, V.M., Stojkovic, M.M., Sabo, T.J. and Trajkovic, V. (2005) Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int. J. Cancer*, **116**, 479-486.
- Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Muller, H.M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. and Becker, K. (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **291**, 643-646.
- Karplus, P.A., Krauth-Siegel, R.L., Schirmer, R.H. and Schulz, G.E. (1988) Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea. A crystallographic analysis. *Eur. J. Biochem.*, **171**, 193-198.
- Karplus, P.A., Pai, E.F. and Schulz, G.E. (1989) A crystallographic study of the glutathione binding site of glutathione reductase at 0.3-nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, **178**, 693-703.
- Karplus, P.A. and Schulz, G.E. (1987) Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **195**, 701-729.
- Karplus, P.A. and Schulz, G.E. (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **210**, 163-180.
- Kawai, H., Kiura, K., Tabata, M., Yoshino, T., Takata, I., Hiraki, A., Chikamori, K., Ueoka, H., Tanimoto, M. and Harada, M. (2002) Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. *Lung Cancer*, **35**, 305-314.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.
- Kettle, A.J. and Winterbourn, C.C. (1994) Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol.*, **233**, 502-512.
- Khan, I.A. and Luduena, R.F. (1991) Possible regulation of the in vitro assembly of bovine brain tubulin by the bovine thioredoxin system. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1076**, 289-297.
- Kim, H.Y. and Gladyshev, V.N. (2004) Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol. Biol. Cell.*, **15**, 1055-1064.
- Kirkpatrick, D.L., Ehrmantraut, G., Stettner, S., Kunkel, M. and Powis, G. (1997) Redox active disulfides: the thioredoxin system as a drug target. *Oncol. Res.*, **9**, 351-356.
- Kirkpatrick, D.L., Watson, S., Kunkel, M., Fletcher, S., Ulhaq, S. and Powis, G. (1999a) Parallel syntheses of disulfide inhibitors of the thioredoxin redox system as potential antitumor agents. *Anticancer Drug Des.*, **14**, 421-432.
- Kirkpatrick, D.L., Watson, S. and Ulhaq, S. (1999b) Structure-based drug design: combinatorial chemistry and molecular modeling. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **2**, 211-221.
- Kirsch, M. and De Groot, H. (2001) NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *Faseb J.*, **15**, 1569-1574.
- Kitz, R. and Wilson, I.B. (1962) Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 3245-3249.
- Klatt, P. and Lamas, S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4928-4944.
- Klatt, P. and Lamas, S. (2002) c-Jun regulation by S-glutathionylation. *Methods Enzymol.*, **348**, 157-174.
- Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C. and Cavenee, W.K. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **61**, 215-225; discussion 226-219.

- Koncarevic, S., Deponte, M., Fritz-Wolf, K., Meyer, M., Urig, S., Fischer, M., Réau, R., Davioud-Charvet, E. and Becker, K. (2005) Mass spectrometric analysis of human glutathione reductase modified by a gold-phosphole inhibitor. *Flavins and Flavoproteins*, in press
- Kontou, M., Will, R.D., Adelfalk, C., Wittig, R., Poustka, A., Hirsch-Kauffmann, M. and Schweiger, M. (2004) Thioredoxin, a regulator of gene expression. *Oncogene*, **23**, 2146-2152.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946-950.
- Krauth-Siegel, R.L., Arscott, L.D., Schonleben-Janias, A., Schirmer, R.H. and Williams, C.H., Jr. (1998) Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry*, **37**, 13968-13977.
- Krohne-Ehrich, G., Schirmer, R.H. and Untucht-Grau, R. (1977) Glutathione reductase from human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **80**, 65-71.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guidgo, R. and Gladyshev, V.N. (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, **300**, 1439-1443.
- Kuo, D.J. and Jordan, F. (1983) Active site directed irreversible inactivation of brewers' yeast pyruvate decarboxylase by the conjugated substrate analogue (E)-4-(4-chlorophenyl)-2-oxo-3-butenic acid: development of a suicide substrate. *Biochemistry*, **22**, 3735-3740.
- Kurosaki, H., Yamakawa, N., Sumimoto, M., Kimura, K. and Goto, M. (2003) Interaction of binuclear xylylthiolato(2,2',2"-terpyridine)platinum(II) complexes with DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 825-828.
- Kwon, Y.W., Masutani, H., Nakamura, H., Ishii, Y. and Yodoi, J. (2003) Redox regulation of cell growth and cell death. *Biol. Chem.*, **384**, 991-996.
- Kyritsis, A.P., Bondy, M.L., Hess, K.R., Cunningham, J.E., Zhu, D., Amos, C.J., Yung, W.K., Levin, V.A. and Bruner, J.M. (1995) Prognostic significance of p53 immunoreactivity in patients with glioma. *Clin. Cancer. Res.*, **1**, 1617-1622.
- Leca, F., Lescop, C., Toupet, L. and Réau, R. (2004) A new family of P,N chelates: stereoselective synthesis of 2-pyridyl-2-phospholenes in the coordination sphere of palladium(II) complexes. *Organometallics*, **23**, 6191-6201.
- Lee, S.R., Bar-Noy, S., Kwon, J., Levine, R.L., Stadtman, T.C. and Rhee, S.G. (2000) Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 2521-2526.
- Lennon, B.W., Williams, C.H., Jr. and Ludwig, M.L. (2000) Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science*, **289**, 1190-1194.
- Lewin, B. (1997) *Genes VI*. Oxford Univ Pr (Sd).
- Li, L., Thomas, R.M., Suzuki, H., De Brabander, J.K., Wang, X. and Harran, P.G. (2004) A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. *Science*, **305**, 1471-1474.
- Lincoln, D.T., Ali Emadi, E.M., Tonissen, K.F. and Clarke, F.M. (2003) The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res.*, **23**, 2425-2433.
- Lind, C., Gerdes, R., Hamnell, Y., Schuppe-Koistinen, I., von Lowenhielm, H.B., Holmgren, A. and Cotgreave, I.A. (2002) Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **406**, 229-240.
- Lind, C., Gerdes, R., Schuppe-Koistinen, I. and Cotgreave, I.A. (1998) Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 481-486.
- Lippoldt, A., Padilla, C.A., Gerst, H., Andbjør, B., Richter, E., Holmgren, A. and Fuxe, K. (1995) Localization of thioredoxin in the rat brain and functional implications. *J. Neurosci.*, **15**, 6747-6756.
- Lockshin, R.A. and Zakeri, Z. (2004) Caspase-independent cell death? *Oncogene*, **23**, 2766-2773.
- Löffler, G. and Petrides, P. (1997) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lovell, M.A., Xie, C., Gabbita, S.P. and Markesbery, W.R. (2000) Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 418-427.

- Lowe, G., Droz, A.S., Vilaivan, T., Weaver, G.W., Park, J.J., Pratt, J.M., Tweedale, L. and Kelland, L.R. (1999) Cytotoxicity of 2,2':6',2' '-terpyridineplatinum(II) complexes against human ovarian carcinoma. *J. Med. Chem.*, **42**, 3167-3174.
- Lowther, W.T., Brot, N., Weissbach, H., Honek, J.F. and Matthews, B.W. (2000a) Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 6463-6468.
- Lowther, W.T., Brot, N., Weissbach, H. and Matthews, B.W. (2000b) Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry*, **39**, 13307-13312.
- Lundstrom, J. and Holmgren, A. (1990) Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9114-9120.
- Lundstrom-Ljung, J., Birnbach, U., Rupp, K., Soling, H.D. and Holmgren, A. (1995) Two resident ER-proteins, CaBP1 and CaBP2, with thioredoxin domains, are substrates for thioredoxin reductase: comparison with protein disulfide isomerase. *FEBS Lett.*, **357**, 305-308.
- Luthman, M. and Holmgren, A. (1982) Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*, **21**, 6628-6633.
- Lyttle, M.H., Satyam, A., Hocker, M.D., Bauer, K.E., Caldwell, C.G., Hui, H.C., Morgan, A.S., Mergia, A. and Kauvar, L.M. (1994) Glutathione-S-transferase activates novel alkylating agents. *J. Med. Chem.*, **37**, 1501-1507.
- Ma, S., Caprioli, R.M., Hill, K.E. and Burk, R.F. (2003) Loss of selenium from selenoproteins: conversion of selenocysteine to dehydroalanine *in vitro*. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **14**, 593-600.
- Mannervik, B. and Danielson, U.H. (1988) Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **23**, 283-337.
- Mau, B.L. and Powis, G. (1992) Mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase by antitumor quinoid compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1613-1620.
- Maurice, M.M., Nakamura, H., Gringhuis, S., Okamoto, T., Yoshida, S., Kullmann, F., Lechner, S., van der Voort, E.A., Leow, A., Versendaal, J., Muller-Ladner, U., Yodoi, J., Tak, P.P., Breedveld, F.C. and Verweij, C.L. (1999) Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **42**, 2430-2439.
- May, J.M., Mendiratta, S., Hill, K.E. and Burk, R.F. (1997) Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22607-22610.
- McNaughton, M., Engman, L., Birmingham, A., Powis, G. and Cotgreave, I.A. (2004) Cyclodextrin-derived diorganyl tellurides as glutathione peroxidase mimics and inhibitors of thioredoxin reductase and cancer cell growth. *J. Med. Chem.*, **47**, 233-239.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760.
- Merritt, E.A. and Bacon, D.J. (1997) *Methods Enzymol.*, **277**, 505-524.
- Meuillet, E.J., Mahadevan, D., Berggren, M., Coon, A. and Powis, G. (2004) Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **429**, 123-133.
- Miller, T.M., Moulder, K.L., Knudson, C.M., Creedon, D.J., Deshmukh, M., Korsmeyer, S.J. and Johnson, E.M., Jr. (1997) Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J. Cell. Biol.*, **139**, 205-217.
- Millet, R., Urig, S., Jacob, J., Amtmann, E., Moulinoux, J.P., Gromer, S., Becker, K. and Davioud-Charvet, E. (2005) Synthesis of 5-nitro-2-furancarbohydrazides and their cis-diamminedichloroplatinum complexes as bitopic and irreversible inhibitors of large thioredoxin reductases. *J. Med. Chem. in press*, **28**.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E. and Spyrou, G. (2000) The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxid. Redox. Signal.*, **2**, 801-810.
- Miranda-Vizuete, A., Sadek, C.M., Jimenez, A., Krause, M., Sutovsky, P. and Oko, R. (2004) The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxid. Redox. Signal.*, **6**, 25-40.
- Miskiniene, V., Sarlauskas, J., Jacquot, J.P. and Cenas, N. (1998) Nitroreductase reactions of Arabidopsis thaliana thioredoxin reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 275-283.

- Missirlis, F., Phillips, J.P. and Jackle, H. (2001) Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, **11**, 1272-1277.
- Missirlis, F., Ulschmid, J.K., Hirosawa-Takamori, M., Gronke, S., Schafer, U., Becker, K., Phillips, J.P. and Jackle, H. (2002) Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single *Drosophila* gene are both essential for viability. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11521-11526.
- Miyazaki, K., Noda, N., Okada, S., Hagiwara, Y., Miyata, M., Sakurabayashi, I., Yamaguchi, N., Sugimura, T., Terada, M. and Wakasugi, H. (1998) Elevated serum level of thioredoxin in patients with hepatocellular carcinoma. *Biotherapy*, **11**, 277-288.
- Monks, T.J., Hanzlik, R.P., Cohen, G.M., Ross, D. and Graham, D.G. (1992) Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 2-16.
- Moskovitz, J. (2005a) Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**, 213-219.
- Moskovitz, J. (2005b) Roles of methionine sulfoxide reductases in antioxidant defense, protein regulation and survival. *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 1451-1457.
- Mrugala, M.M., Kesari, S., Ramakrishna, N. and Wen, P.Y. (2004) Therapy for recurrent malignant glioma in adults. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, **4**, 759-782.
- Mugesh, G., Klotz, L.O., du Mont, W.W., Becker, K. and Sies, H. (2003) Selenenyl iodide: a new substrate for mammalian thioredoxin reductase. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 2848-2852.
- Mukherjee, A., Westwell, A.D., Bradshaw, T.D., Stevens, M.F., Carmichael, J. and Martin, S.G. (2005) Cytotoxic and antiangiogenic activity of AW464 (NSC 706704), a novel thioredoxin inhibitor: an *in vitro* study. *Br. J. Cancer*, **92**, 350-358.
- Muller, J.G., Bucheler, U.S., Kayser, K., Schirmer, R.H., Werner, D. and Krauth-Siegel, R.L. (1993) Glutathione reductase in human and murine lung tumors: high levels of mRNA and enzymatic activity. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, **39**, 389-396.
- Mustacich, D. and Powis, G. (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, **346 Pt 1**, 1-8.
- Nakamura, H. (2005) Thioredoxin and its related molecules: update 2005. *Antioxid. Redox. Signal.*, **7**, 823-828.
- Nalvarte, I., Damdimopoulos, A.E., Nystom, C., Nordman, T., Miranda-Vizuete, A., Olsson, J.M., Eriksson, L., Bjornstedt, M., Arner, E.S. and Spyrou, G. (2004) Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 54510-54517.
- Negoescu, A. (2000) Apoptosis in cancer: therapeutic implications. *Histol. Histopathol.*, **15**, 281-297.
- Nikitovic, D. and Holmgren, A. (1996) S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19180-19185.
- Norbury, C.J. and Zhivotovsky, B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, **23**, 2797-2808.
- Nordberg, J. and Arner, E.S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1287-1312.
- Nordberg, J., Zhong, L., Holmgren, A. and Arner, E.S. (1998) Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10835-10842.
- Nordhoff, A., Bucheler, U.S., Werner, D. and Schirmer, R.H. (1993) Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446→Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. *Biochemistry*, **32**, 4060-4066.
- Nordman, T., Xia, L., Bjorkhem-Bergman, L., Damdimopoulos, A., Nalvarte, I., Arner, E.S., Spyrou, G., Eriksson, L.C., Bjornstedt, M. and Olsson, J.M. (2003) Regeneration of the antioxidant ubiquinol by lipoamide dehydrogenase, thioredoxin reductase and glutathione reductase. *Biofactors*, **18**, 45-50.
- Novoselov, S.V. and Gladyshev, V.N. (2003) Non-animal origin of animal thioredoxin reductases: implications for selenocysteine evolution and evolution of protein function through carboxy-terminal extensions. *Protein Sci.*, **12**, 372-378.

- Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H., Kryukov, G.V., Xiang, Y., Weeks, D.P., Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N. (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo J.*, **21**, 3681-3693.
- Oblong, J.E., Gasdaska, P.Y., Sherrill, K. and Powis, G. (1993) Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*, **32**, 7271-7277.
- Ochi, T. (1996) Menadione causes increases in the level of glutathione and in the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicology*, **112**, 45-55.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, **4**, 2411-2423.
- Pace, G.W. and Leaf, C.D. (1995) The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 523-528.
- Pai, E.F., Karplus, P.A. and Schulz, G.E. (1988) Crystallographic analysis of the binding of NADPH, NADPH fragments, and NADPH analogues to glutathione reductase. *Biochemistry*, **27**, 4465-4474.
- Pai, E.F. and Schulz, G.E. (1983) The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1752-1757.
- Pallis, M., Bradshaw, T.D., Westwell, A.D., Grundy, M., Stevens, M.F. and Russell, N. (2003) Induction of apoptosis without redox catastrophe by thioredoxin-inhibitory compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 1695-1705.
- Parney, I.F. and Chang, S.M. (2003) Current chemotherapy for glioblastoma. *Cancer J.*, **9**, 149-156.
- Patenaude, A., Murthy, M.R. and Mirault, M.E. (2005) Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 1063-1080.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.
- Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vazquez, J., Marina, A., Garcia de Lacoba, M., Perez-Sala, D. and Lamas, S. (2001) Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry*, **40**, 14134-14142.
- Pommepeuy, I., Terro, F., Petit, B., Trimoreau, F., Bellet, V., Robert, S., Hugon, J., Labrousse, F. and Yardin, C. (2003) Brefeldin A induces apoptosis and cell cycle blockade in glioblastoma cell lines. *Oncology*, **64**, 459-467.
- Powis, G., Mustacich, D. and Coon, A. (2000) The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 312-322.
- Powis, G., Oblong, J.E., Gasdaska, P.Y., Berggren, M., Hill, S.R. and Kirkpatrick, D.L. (1994) The thioredoxin/thioredoxin reductase redox system and control of cell growth. *Oncol. Res.*, **6**, 539-544.
- Rakauskiene, G.A., Cenas, N.K. and Kulys, J.J. (1989) A 'branched' mechanism of the reverse reaction of yeast glutathione reductase. An estimation of the enzyme standard potential values from the steady-state kinetics data. *FEBS Lett.*, **243**, 33-36.
- Rengby, O., Johansson, L., Carlson, L.A., Serini, E., Vlamis-Gardikas, A., Karsnas, P. and Arner, E.S. (2004) Assessment of production conditions for efficient use of *Escherichia coli* in high-yield heterologous recombinant selenoprotein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5159-5167.
- Rice-Evans, C. and Miller, N.J. (1994) Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.*, **234**, 279-293.
- Rietveld, P., Arscott, L.D., Berry, A., Scrutton, N.S., Deonarain, M.P., Perham, R.N. and Williams, C.H., Jr. (1994) Reductive and oxidative half-reactions of glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **33**, 13888-13895.
- Rigobello, M.P., Callegaro, M.T., Barzon, E., Benetti, M. and Bindoli, A. (1998) Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 370-376.
- Roninson, I.B. (2002) Tumor senescence as a determinant of drug response *in vivo*. *Drug Resist. Updat.*, **5**, 204-208.

- Rooseboom, M., Commandeur, J.N., Floor, G.C., Rettie, A.E. and Vermeulen, N.P. (2001) Selenoxidation by flavin-containing monooxygenases as a novel pathway for beta-elimination of selenocysteine Se-conjugates. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 127-134.
- Ross, S.A., Carr, C.A., Briet, J.W. and Lowe, G. (2000) Transfer of 4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine platinum(II) between human serum albumin, glutathione and other thiolate ligands. A possible selective natural transport mechanism for the delivery of platinum(II) drugs to tumour cells. *Anticancer Drug Des.*, **15**, 431-439.
- Rozell, B., Hansson, H.A., Luthman, M. and Holmgren, A. (1985) Immunohistochemical localization of thioredoxin and thioredoxin reductase in adult rats. *Eur. J. Cell. Biol.*, **38**, 79-86.
- Ruefli, A.A., Davis, J.E., Suttan, V.R., Trapani, J.A., Smyth, M.J. and Johnstone, R.W. (2001) Dissection the apoptotic mechanisms of chemotherapeutic drugs and lymphocytes to design effective anticancer drugs. *Drug Development Research*, **52**, 549-557.
- Ruefli, A.A., Smyth, M.J. and Johnstone, R.W. (2000) HMBA induces activation of a caspase-independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Blood*, **95**, 2378-2385.
- Rundlof, A.K. and Arner, E.S. (2004) Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxid. Redox. Signal.*, **6**, 41-52.
- Rundlof, A.K., Carlsten, M. and Arner, E.S. (2001) The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1, and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30542-30551.
- Rundlof, A.K., Janard, M., Miranda-Vizuete, A. and Arner, E.S. (2004) Evidence for intriguingly complex transcription of human thioredoxin reductase 1. *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 641-656.
- Rybnikova, E., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J.A., Spyrou, G. and Pelto-Huikko, M. (2000) Expression of novel antioxidant thioredoxin-2 in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 1669-1678.
- Saito, I., Shimuta, M., Terauchi, K., Tsubota, K., Yodoi, J. and Miyasaka, N. (1996) Increased expression of human thioredoxin/adult T cell leukemia-derived factor in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.*, **39**, 773-782.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J.*, **17**, 2596-2606.
- Salinas, A.E. and Wong, M.G. (1999) Glutathione S-transferases--a review. *Curr. Med. Chem.*, **6**, 279-309.
- Salinas, G., Selkirk, M.E., Chalar, C., Maizels, R.M. and Fernandez, C. (2004) Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends Parasitol.*, **20**, 340-346.
- Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. and Schneider, G. (2001) Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 9533-9538.
- Sarma, G.N., Savvides, S.N., Becker, K., Schirmer, M., Schirmer, R.H. and Karplus, P.A. (2003) Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. *J. Mol. Biol.*, **328**, 893-907.
- Sasada, T., Nakamura, H., Ueda, S., Sato, N., Kitaoka, Y., Gon, Y., Takabayashi, A., Spyrou, G., Holmgren, A. and Yodoi, J. (1999) Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 504-514.
- Savolainen, H. (1978) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in rat brain. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **21**, 173-176.
- Savvides, S.N., Scheiwein, M., Bohme, C.C., Arteel, G.E., Karplus, P.A., Becker, K. and Schirmer, R.H. (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2779-2784.
- Schallreuter, K.U., Gleason, F.K. and Wood, J.M. (1990) The mechanism of action of the nitrosourea anti-tumor drugs on thioredoxin reductase, glutathione reductase and ribonucleotide reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1054**, 14-20.
- Schallreuter, K.U. and Wood, J.M. (1988) The activity and purification of membrane-associated thioredoxin reductase from human metastatic melanotic melanoma. *Biochim. Biophys. Acta*, **967**, 103-109.

- Schirmer, M., Scheiwein, M., Gromer, S., Becker, K. and Schirmer, R.H. (1999) Disulfide reductases are destabilized by physiologic concentrations of NADPH. *Flavins and Flavoproteins*, **13**, 857-862.
- Schirmer, R.H., Bauer, H. and Becker, K. (2002) Glutathione reductase. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, **5**, 1471-1475.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M. and Lowe, S.W. (2002) A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, **109**, 335-346.
- Schulz, G.E., Schirmer, R.H. and Pai, E.F. (1982) FAD-binding site of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.*, **160**, 287-308.
- Schweizer, U., Brauer, A.U., Kohrle, J., Nitsch, R. and Savaskan, N.E. (2004) Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **45**, 164-178.
- Seemann, S. and Hainaut, P. (2005) Roles of thioredoxin reductase 1 and APE/Ref-1 in the control of basal p53 stability and activity. *Oncogene*, **24**, 3853-3863.
- Shaw, C.F. (1999) Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.*, **99**, 2589-2600.
- Shay, J.W. and Roninson, I.B. (2004) Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, **23**, 2919-2933.
- Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 213-219.
- Sies, H. and Cadenas, E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **311**, 617-631.
- Smart, D.K., Ortiz, K.L., Mattson, D., Bradbury, C.M., Bisht, K.S., Sieck, L.K., Brechbiel, M.W. and Gius, D. (2004) Thioredoxin reductase as a potential molecular target for anticancer agents that induce oxidative stress. *Cancer Res.*, **64**, 6716-6724.
- Smith, A.D., Guidry, C.A., Morris, V.C. and Levander, O.A. (1999) Aurothioglucose inhibits murine thioredoxin reductase activity *in vivo*. *Journal of Nutrition*, **129**, 194-198.
- Soini, Y., Kahlos, K., Napankangas, U., Kaarteenaho-Wiik, R., Saily, M., Koistinen, P., Paaakko, P., Holmgren, A. and Kinnula, V.L. (2001) Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 1750-1757.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1409-1416.
- Stadtman, T. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 83-100.
- Steiner, H.H., Herold-Mende, C., Bonsanto, M., Geletneky, K. and Kunze, S. (1998) [Prognosis of brain tumors: epidemiology, survival time and clinical course]. *Versicherungsmedizin*, **50**, 173-179.
- Stoll, V.S., Simpson, S.J., Krauth-Siegel, R.L., Walsh, C.T. and Pai, E.F. (1997) Glutathione reductase turned into trypanothione reductase: structural analysis of an engineered change in substrate specificity. *Biochemistry*, **36**, 6437-6447.
- Su, D. and Gladyshev, V.N. (2004) Alternative splicing involving the thioredoxin reductase module in mammals: a glutaredoxin-containing thioredoxin reductase 1. *Biochemistry*, **43**, 12177-12188.
- Su, D., Novoselov, S.V., Sun, Q.A., Moustafa, M.E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N. (2005) Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 26491-26498.
- Sullivan, A., Syed, N., Gasco, M., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Attard, M., Hiller, L., Farrell, P.J., Smith, P., Lu, X. and Crook, T. (2004) Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, **23**, 3328-3337.
- Sun, Q.A., Kirnarsky, L., Sherman, S. and Gladyshev, V.N. (2001) Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 3673-3678.
- Suzukake, K., Vistica, B.P. and Vistica, D.T. (1983) Dechlorination of L-phenylalanine mustard by sensitive and resistant tumor cells and its relationship to intracellular glutathione content. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 165-167.
- Takizawa, S., Matsushima, K., Shinohara, Y., Ogawa, S., Komatsu, N., Utsunomiya, H. and Watanabe, K. (1994) Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain. *J. Neurol. Sci.*, **122**, 66-73.

- Tamura, T. and Stadtman, T.C. (1996) A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 1006-1011.
- Thornalley, P.J. (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Mol. Aspects Med.*, **14**, 287-371.
- Tu, L.C., Melendy, T. and Beerman, T.A. (2004) DNA damage responses triggered by a highly cytotoxic monofunctional DNA alkylator, hedamycin, a pluramycin antitumor antibiotic. *Mol. Cancer Ther.*, **3**, 577-585.
- Turunen, N., Karihtala, P., Mantyniemi, A., Sormunen, R., Holmgren, A., Kinnula, V.L. and Soini, Y. (2004) Thioredoxin is associated with proliferation, p53 expression and negative estrogen and progesterone receptor status in breast carcinoma. *Apmis*, **112**, 123-132.
- Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M. and Yodoi, J. (2002) Redox control of cell death. *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 405-414.
- Ueno, M., Masutani, H., Arai, R.J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J. and Nikaido, T. (1999) Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 35809-35815.
- Urig, S., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., Alber, D. and Becker, K. (2005a) Platinum(II) complexes: inhibition of thioredoxin reductase in glioblastoma therapy. *Flavins and Flavoproteins*, **15**.
- Urig, S., Fritz-Wolf, K., Réau, R., Herold-Mende, C., Tóth, K., Davioud-Charvet, E. and Becker, K. (2005b) Undressing of phosphine gold(I) therapeutic agents as irreversible inhibitors of human disulfide reductases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. in press*
- Van Gelder, R.N., von Zastrow, M.E., Yool, A., Dement, W.C., Barchas, J.D. and Eberwine, J.H. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 1663-1667.
- Waksman, G., Krishna, T.S., Williams, C.H., Jr. and Kuriyan, J. (1994) Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *J. Mol. Biol.*, **236**, 800-816.
- Walensky, L.D., Kung, A.L., Escher, I., Malia, T.J., Barbuto, S., Wright, R.D., Wagner, G., Verdine, G.L. and Korsmeyer, S.J. (2004) Activation of apoptosis *in vivo* by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*, **305**, 1466-1470.
- Wang, D. and Lippard, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 307-320.
- Watson, W.H., Pohl, J., Montfort, W.R., Stuchlik, O., Reed, M.S., Powis, G. and Jones, D.P. (2003) Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *J. Biol. Chem.*, **278**, 33408-33415.
- Weichsel, A., Gasdaska, J.R., Powis, G. and Montfort, W.R. (1996) Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure*, **4**, 735-751.
- Wen, P.Y. and Kesari, S. (2004) Malignant gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **4**, 218-227.
- Whanger, P.D. (2001) Selenium and the brain: a review. *Nutr. Neurosci.*, **4**, 81-97.
- Wipf, P., Hopkins, T.D., Jung, J.K., Rodriguez, S., Birmingham, A., Southwick, E.C., Lazo, J.S. and Powis, G. (2001) New inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system based on a naphthoquinone spiroketal natural product lead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2637-2641.
- Wipf, P., Lynch, S.M., Birmingham, A., Tamayo, G., Jimenez, A., Campos, N. and Powis, G. (2004) Natural product based inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 1651-1658.
- Wong, K.K., Vanoni, M.A. and Blanchard, J.S. (1988) Glutathione reductase: solvent equilibrium and kinetic isotope effects. *Biochemistry*, **27**, 7091-7096.
- Zanetti, G. and Williams, C.H., Jr. (1967) Characterization of the active center of thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5232-5236.
- Zapun, A., Bardwell, J.C. and Creighton, T.E. (1993) The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry*, **32**, 5083-5092.
- Zelphati, O., Wang, Y., Kitada, S., Reed, J.C., Felgner, P.L. and Corbeil, J. (2001) Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. *J. Biol. Chem.*, **276**, 35103-35110.

- Zhang, J., Li, Y.D., Patel, J.M. and Block, E.R. (1998) Thioredoxin overexpression prevents NO-induced reduction of NO synthase activity in lung endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **275**, L288-293.
- Zhao, R., Masayasu, H. and Holmgren, A. (2002) Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 8579-8584.
- Zhong, L., Arner, E.S. and Holmgren, A. (2000a) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 5854-5859.
- Zhong, L., Arner, E.S., Ljung, J., Aslund, F. and Holmgren, A. (1998) Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8581-8591.
- Zhong, L. and Holmgren, A. (2000) Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18121-18128.
- Zhong, L., Persson, K., Sandalova, T., Schneider, G. and Holmgren, A. (2000b) Purification, crystallization and preliminary crystallographic data for rat cytosolic selenocysteine 498 to cysteine mutant thioredoxin reductase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **56 (Pt 9)**, 1191-1193.
- Zou, J., Taylor, P., Dornan, J., Robinson, S.P., Walkinshaw, M.D. and Sadler, P.J. (2000) First crystal structure of a medically relevant gold protein complex: unexpected binding of $[\text{Au}(\text{PEt}_3)]^+$ to Histidine. *Angew. Chem., Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **112, 39**, 3054-3057, 2931-2934.