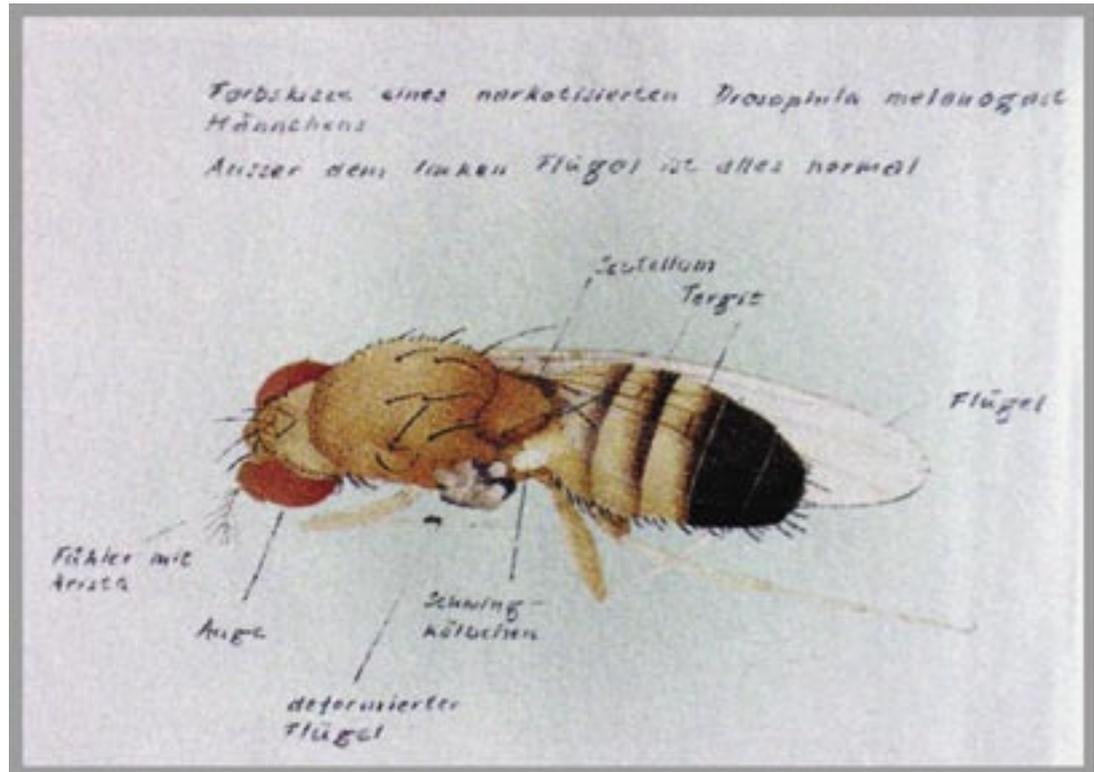


Die Taufliege *Drosophila melanogaster*, ein wichtiger genetischer Modellorganismus, der auch in der Redoxforschung eine zentrale Rolle spielt.



Molekulare Maschinen und Alterung – der humane Redoxstoffwechsel

Von Katja Becker

Oxidativer Stress ist an der Entstehung von degenerativen Erkrankungen, von Infektionskrankheiten sowie von Alterungsprozessen beteiligt. Reaktive und damit potentiell giftige Sauerstoffverbindungen entstehen permanent in unserem Körper, beispielsweise im Rahmen der Zellatmung, der Infektabwehr oder durch UV-Strahlung von außen. Gegen diese oxidative Belastung haben sich im Laufe der Evolution eine ganze Reihe antioxidativer Schutzmechanismen gebildet, zu denen verschiedene Vitamine gehören aber auch Enzyme, die spezifische biochemische Reaktionen katalysieren und daher gerne als „Molekulare Maschinen“ bezeichnet werden. In diesem Artikel werden die Rolle des Redoxstoffwechsels bei Alterungsprozessen, der Wandel des Modells der Redoxhomöostase sowie verschiedene am Redoxstoffwechsel beteiligte molekulare Maschinen vorgestellt.

Der Wunsch, unsterblich zu sein, ist ein großer Traum der Menschheit. Altern ist universell, es ist andererseits ein doch recht individueller Prozess, um nicht zu sagen: der biologische Preis für Individualität. Altern und Tod ermöglichen, dass die Prinzipien der Evolution wirksam werden. Altern geschieht sukzessive, es kann nicht durch ein einziges Phänomen erklärt werden und es gibt kein einfaches Mittel dagegen.

Zunehmend stellt sich in den Biowissenschaften die Frage nach den Ursachen für das Älterwerden. So wurden bislang über 300 verschiedene Theorien über den Alterungsprozess diskutiert. Zu diesen Theorien gehörten einerseits deterministische Modelle, wie die zunehmende Verkürzung repetitiver DNA-Sequenzen an den Enden eukaryontischer Chromosomen, die man auch als Telomere bezeichnet, die Apoptose, also der programmierte Zelltod, oder evolutionsbiologisch bedingte Theorien. Andererseits wurden stochastische Modelle beschrieben, wie die Bildung von „advanced glycation end products“, die zur Quervernetzung von Biomolekülen und damit beispielsweise zur abnehmenden Dehnbarkeit von Geweben führen, oder aber die toxischen Wirkungen reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS). Heute gilt diese traditionelle Kategorisierung als obsolet. Organismen erreichen ein hohes Alter, also ein Alter, das über die natürliche oder essentielle Lebensspanne, wie Darwin sagen würde, hinausgeht, auf der Basis von genetisch festgelegter Langlebigkeit, die die Funktionalität von Reparatursystemen gewährleistet [1 und Referenzen darin]. Nach neueren Theorien wird Altern auf molekularer Ebene durch die zunehmende Schädigung von Biomolekülen erklärt. Diese Schädigung wird insbesondere durch folgende Faktoren bewirkt:

a) durch freie Radikale, deren Bildung abhängig ist von Lebenswandel und Ernährung

b) durch spontan auftretende Fehler bei biochemischen Reaktionen; hier sind insbesondere DNA-Duplikation, Transkription, posttranskriptionale Prozessierung, Translation und posttranslationale Modifikation zu nennen sowie

c) durch ernährungsbedingte Faktoren, zu denen beispielsweise Glucose und Glucose-Metaboliten sowie deren biochemische Wechselwirkungen mit ROS zählen, aber auch metallbasierte Mikronährstoffe.

Die biologischen Folgen einer erhöhten Schädigung von Biomolekülen sind weitreichend. Sie schließen veränderte Genexpression, genomische Instabilität, Mutationen, molekulare Heterogenität, Verlust des Zellteilungspotentials und beeinträchtigte interzelluläre Kommunikation ein. Schädigung zellulärer Re-

paratursysteme führt dann längerfristig zu deren funktioneller Beeinträchtigung, zu zellulärer Dysfunktion, erhöhter Stressanfälligkeit, zu Krankheit und schließlich zum Tode [1, 2].

Reaktive Sauerstoffspezies

ROS entstehen permanent in unserem Körper, beispielsweise im Rahmen der Atmungskette, bei der Infektabwehr und durch UV-Strahlung von außen oder aber durch Signaltransduktionsprozesse, die ja normale physiologische Vorgänge darstellen. Durch oxidativen Stress können nun Proteine, Lipide und Nukleinsäuren geschädigt werden - viele dieser Schädigungen akkumulieren im Alter und sind an der Pathobiochemie von Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Katarakt, Diabetes mellitus,

Professur für Biochemie der Ernährung des Menschen

Die Professur für Biochemie der Ernährung des Menschen befasst sich in Forschung und Lehre mit ernährungsrelevanten biochemischen, molekularbiologischen und zellbiologischen Prozessen. Wir fokussieren hierbei auf den zellulären Redoxstoffwechsel im Menschen, der Taufliede *Drosophila melanogaster* sowie in humanpathogenen Parasiten. Dies schließt Studien zu Struktur-, Mechanismus und Funktion von Proteinen sowie zu Veränderungen von Protein- und Transkriptmustern unter verschiedenen Bedingungen ein. Längerfristige Ziele unserer Arbeitsgruppe sind die rationale, also strukturbasierte Medikamentenentwicklung gegen Tumoren und Parasiten, die Charakterisierung von Riboflavin- bzw. Selen-abhängigen Proteinen sowie die Beeinflussung des Redoxstoffwechsels im Rahmen von Prävention und Therapie verschiedener Erkrankungen (beispielsweise schwere Unterernährung, Transplantationen, Chemotherapie und Krebserkrankungen). Hierbei kommen insbesondere Methoden der Proteinbiochemie, Enzymkinetik, Kristallisation, Röntgenbeugungsanalyse, Molekularbiologie und Strukturbiologie zum Einsatz.

In der Lehre vertritt die Professur die Schwerpunkte Pathobiochemie, Spezielle Biochemie der Ernährung, Methoden der Biochemie sowie Molekularbiologie und genetische Variation. Enge inhaltliche und methodische Bezüge bestehen zu den Nachbardisziplinen der Fachbereiche 08, 09, 10 und 11 (u.a. Sonderforschungsbereich „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ – SFB 535). Die Arbeiten der Gruppe werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft sowie Industriekooperationen kontinuierlich gefördert.

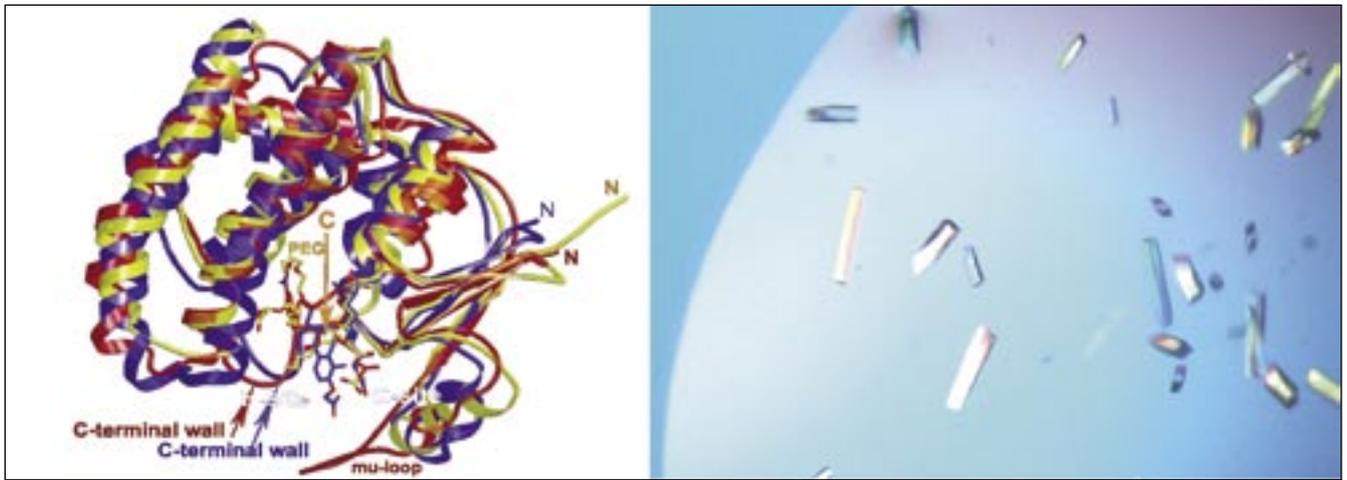


Abb. 1: Überlagerung der Strukturen zweier humaner Glutathion S-Transferasen mit der GST des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (Hiller et al., Protein Structure, 2006).

Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, beteiligt. 1-2%, d.h. etwa 10 l des molekularen Sauerstoffs, der täglich metabolisiert wird, werden zu reaktiven Sauerstoffspezies wie Hydroxylradikalen, Superoxidradikalen oder Wasserstoffperoxid umgewandelt. Dies ist der Preis für die hohen Energieausbeuten, die aerobe Organismen durch die effektive Reduktion von O_2 zu H_2O nutzen können. Die so genannte Sauerstoffrevolution wurde eingeleitet als die sich bildende Ozonschicht die energiereiche UV-Strahlung der Sonne absorbierte und dadurch Leben außerhalb des Wassers ermöglichte. Wegen der fehlenden UV-Strahlung waren dafür abiotische

Synthesen von Biomolekülen praktisch nicht mehr möglich. Diese Moleküle mussten nun von den Organismen selbst hergestellt werden. Die Sauerstoffatmosphäre zerstörte grundlegende Bedingungen für die Entstehung lebender Systeme – es kam zu einer Trennung der Organismen in Aerobier und Anaerobier. Für letztere ist O_2 nutzlos und tödlich, für Aerobier ist Sauerstoff nützlich und gefährlich. Allmählich wurden ältere Biosynthese-Wege durch O_2 -abhängige Reaktionen verfeinert, wie beispielsweise die Synthese von Cholesterin und Steroidhormonen, die zur Komplexität des heutigen aeroben Lebens beitragen. Gleichzeitig wurden

Blausäure, Kohlenmonoxid und Schwefelwasserstoff, Vorzugsreagenzien für lebende Systeme vor der O_2 -Ära, für Aerobier tödliche Gifte.

Redoxhomöostase oder Homöodynamik?

Mehr als 80% des zellulären Sauerstoffverbrauchs findet in Mitochondrien statt – in Zellorganellen, die selbst besonders empfindlich gegenüber ROS sind. Im Alter kann es daher zu Energiedefizit und Herabsetzung der Anpassungsfähigkeit an Stresssituationen kommen [3]. Oxidativer Stress wird durch eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen antagonisiert. Dies ist der Grund, weshalb neben der Kalorienreduktion die Verstärkung der körpereigenen antioxidativen Kapazität als wichtigster ernährungswissenschaftlicher Beitrag zur Verlangsamung des Alterungsprozesses diskutiert wird.

Das Gleichgewicht zwischen oxidativem Stress und antioxidativer Kapazität wurde in der Vergangenheit auch als Redox-Homöostase bezeichnet. Viele solcher traditioneller Modelle zur Homöostase von biologischen Prozessen haben die Biologie, Biochemie, Physiologie und Medizin seit den 30-er Jahren bestimmt. Die biomedizinische Forschung der letzten Jahre zeigte jedoch, dass Homöostase-Modelle, die auf der Annahme basieren, dass Stabilität durch Konstanz erreicht werden kann, meist unvollständig sind. Diese Modelle bezogen neuere Erkenntnisse aus Kybernetik, Kontroll-, Katastrophen-, Chaos-Theorien sowie Systembiologie



Prof. Dr. med. Katja Becker

Biochemie der Ernährung des Menschen
Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ)
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen
Telefon: 0641 99-39121
katja.becker@ernaehrung.uni-giessen.de

Katja Becker, 1965 in Heidelberg geboren, studierte Medizin, promovierte und habilitierte sich 1996 an der Universität Heidelberg. Teile ihrer Ausbildung absolvierte sie an den Universitäten Oxford, Sydney und Basel. Von 1999 bis 2000 war sie Nachwuchsgruppenleiterin am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg. Im Jahr 2000 übernahm sie die Professur für „Biochemie der Ernährung“ an der Universität Gießen. Ihre klinischen und Forschungsarbeiten führten sie zu mehrmonatigen Aufenthalten nach Ghana und Nigeria sowie an das Scripps Research Institute, La Jolla, CA. Auszeichnungen: 1989: Ludolf-Krehl-Preis der Südwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin; 1993 Förderpreis der Stiftung für Ernährungswissenschaft, Göttingen; Förderung durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes; 2000–2005 Mitglied der „Jungen Akademie“, Berlin. 2003 Carus Medaille der Deutschen Gesellschaft für Naturforscher Leopoldina. Wissenschaftliche Schwerpunkte: Zellulärer Redoxstoffwechsel, rationale Medikamentenentwicklung gegen Parasiten und Tumorzellen, Disulfidreduktasen, Selenoproteine.

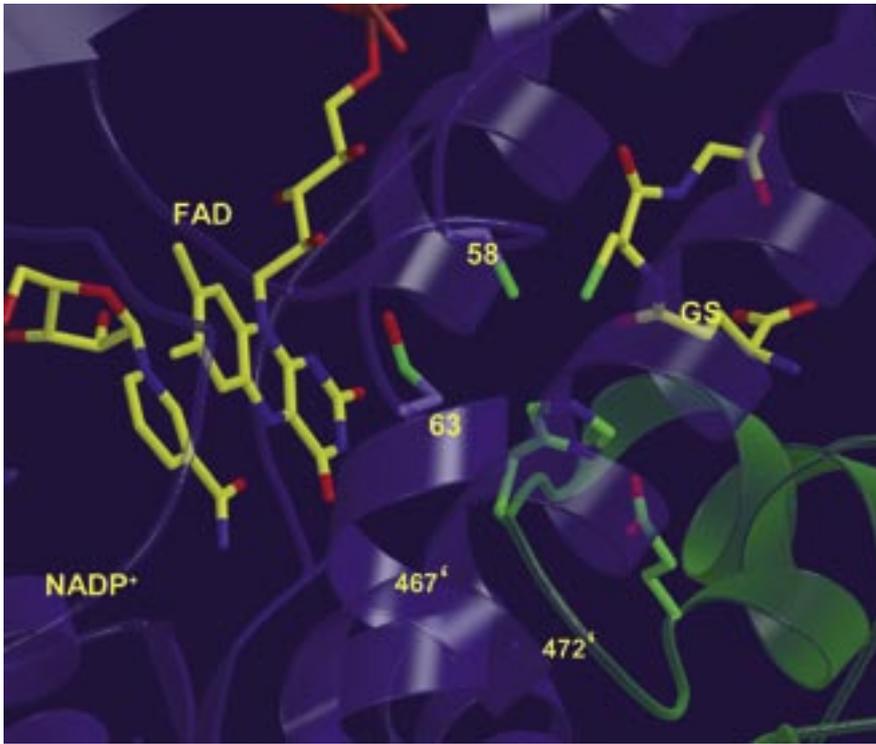


Abb. 2: Oxidation von Cystein 63 im aktiven Zentrum der humanen Glutathionreduktase durch S-Nitrosoglutathion zum Sulfenat (Becker et al., Nature Struct. Biol., 1998).

Glutathionsystem zählen das Tripeptid Glutathion, Glutathionreduktase, die Glutathion in reduziertem Zustand hält, Glutathionperoxidasen, die direkt Peroxide entgiften können, sowie Glutathion S-Transferasen (Abb. 1).

Das Thioredoxinsystem umfasst neben dem kleinen Protein Thioredoxin und der Thioredoxinreduktase insbesondere die antioxidativen Thioredoxinperoxidasen sowie Peroxiredoxine, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind.

Der wissenschaftliche Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe liegt in der funktionellen und strukturellen Charakterisierung von Proteinen, die an zellulären Redoxprozessen beteiligt sind, sowie an der Redoxregulation dieser molekularen Maschinen. Die humane Glutathionreduktase und die selenhaltige Thioredoxinreduktase beispielsweise sind nah verwandte Flavoenzyme. Ihre Produkte, reduziertes Glutathion bzw. Thioredoxin, sind an einer ganzen Reihe essentieller zellulärer Redoxreaktionen beteiligt. Diese schließen die

nicht mit ein, obwohl die Komplexität biologischer Systeme durch diese Methoden zugänglich und beschreibbar wurde. Seit den 90-er Jahren wird daher zunehmend der Begriff Homöodynamik verwendet. Das zugrundeliegende Konzept geht davon aus, dass das interne Milieu komplexer biologischer Systeme nicht permanent konstant, also nicht im Equilibrium, ist, sondern durch dynamische Regulation und Interaktion zwischen verschiedenen Organisationsebenen bestimmt wird. In diesem Zusammenhang wurde auch der Begriff Allosterie geprägt, der davon ausgeht, dass Stabilität in lebenden Systemen durch permanenten Wechsel, also durch Veränderung und nicht durch

Konstanz, erreicht wird [1 und Referenzen darin].

Molekulare Maschinen und Redoxprozesse

Eine ganze Reihe molekularer Maschinen ist an der Perzeption, der Produktion und Entgiftung von oxidativem und nitrosativem Stress im menschlichen Körper beteiligt (Abb. 1 bis 5). Hierzu zählen Transkriptionsfaktoren, Proteine, die an Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind, NADPH-Oxidasen, die ROS zur Infektabwehr einsetzen, Katalase und Superoxiddismutase sowie Komponenten des Thioredoxin- und Glutathionsystems. Zu dem

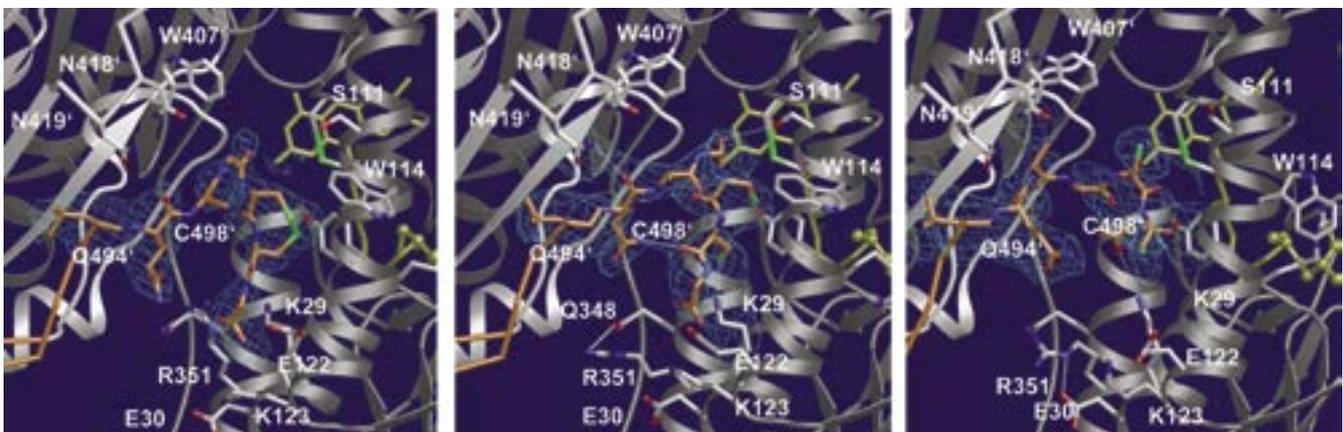


Abb. 3. Das C-terminale Ende der humanen Thioredoxinreduktase stellt einen flexiblen Arm dar, der essentiell an der Katalyse beteiligt ist und aufgrund seines reaktiven Selenocysteinrestes ein interessantes Ziel für die rationale Medikamentenentwicklung darstellt. Vor kurzem gelang die Visualisierung der Bewegung des Armes mittels Röntgenbeugungsanalyse (Fritz-Wolf et al., J. Mol. Biol. (2007), in press.).

Faltung von Exportproteinen, das Übertragen von Elektronen auf die Ribonukleotidreduktase, die den ersten Schritt der DNA-Synthese katalysiert, Reduktion von Transkriptionsfaktoren und antioxidativen Schutz ein.

Im atomaren Detail haben wir die hemmenden Effekte von S-Nitroso-glutathion und Dinitrosyl-Dithiol-Eisen-Komplexen – beides sind physiologische glutathionhaltige NO-Donoren – auf die humane Glutathionreduktase untersucht. Nach Kristallisation zeigte die Röntgenbeugungsanalyse, dass NO-Donoren zur selektiven irreversiblen Oxidation des Cystein 63 im aktiven Zentrum der GR zum Sulfenat bzw. zum Sulfinat führen (siehe Abb. 2 für S-Nitrosoglutathion). Peroxynitrit hingegen, eine weitere wichtige reaktive Stickstoffverbindung, führt zur selektiven Modifikation von an der enzymatischen Katalyse beteiligten Tyrosyl-Resten. Da antioxidative Enzyme essentiell für Tumorzellen und intrazelluläre Parasiten sind, vertiefen diese Hemmstudien nicht nur unser Verständnis von der Wirkung von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies auf intrazelluläre Zielmoleküle sondern dienen uns auch als Grundlage für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika. Für die humane Thioredoxinreduktase, ein Selenoprote-

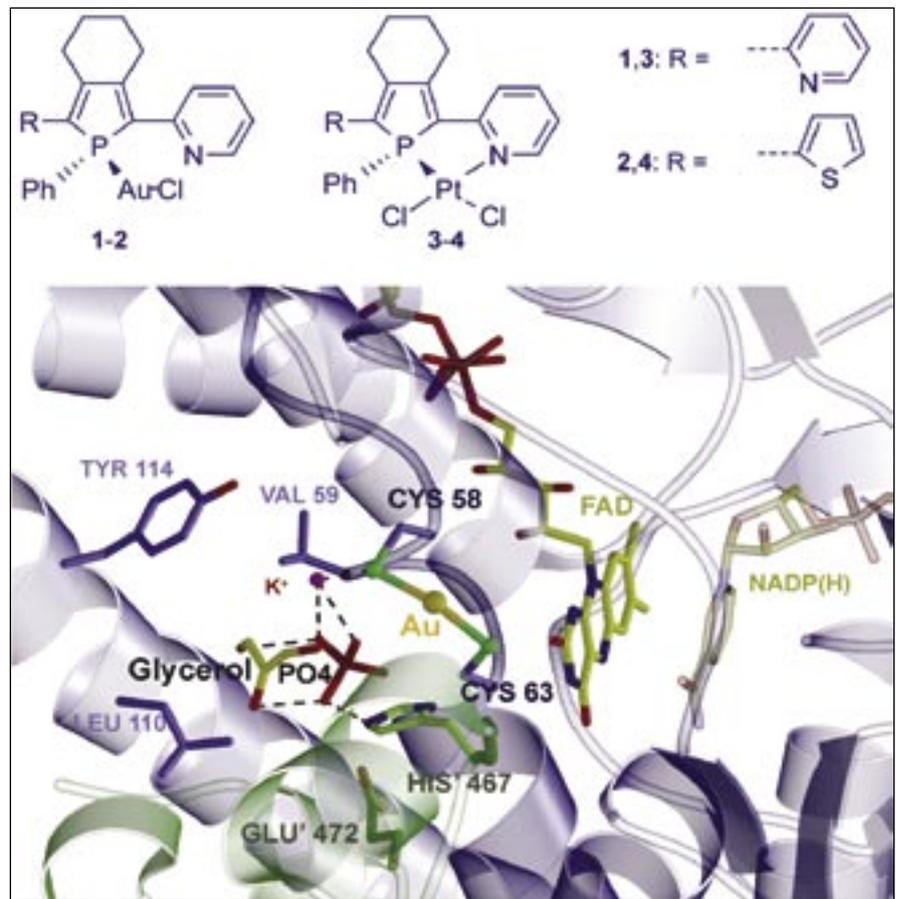


Abb. 4: Hemmung der humanen Glutathionreduktase durch ein Goldphosphol. Wie man in der Röntgenstrukturanalyse sieht, wird das Gold kovalent zwischen den beiden Cysteinresten des aktiven Zentrums gebunden. Dies führt zu einer unter physiologischen Bedingungen irreversiblen Hemmung des Enzyms und beeinträchtigt das Wachstum von Tumorzellen [4].

in, das essentiell an Redoxregulation, antioxidativer Abwehr und DNA-Synthese beteiligt ist, sowie für die humane Gold- und Platinphosphole als hochpotente Inhibitoren identifizieren [4]

(Abb. 4). Diese vielversprechenden potentiellen Chemotherapeutika werden derzeit in einer Kooperation mit der Universität Heidelberg in Tiermodellen getestet. Die vor kurzem gelungene Aufklärung der dreidimensionalen

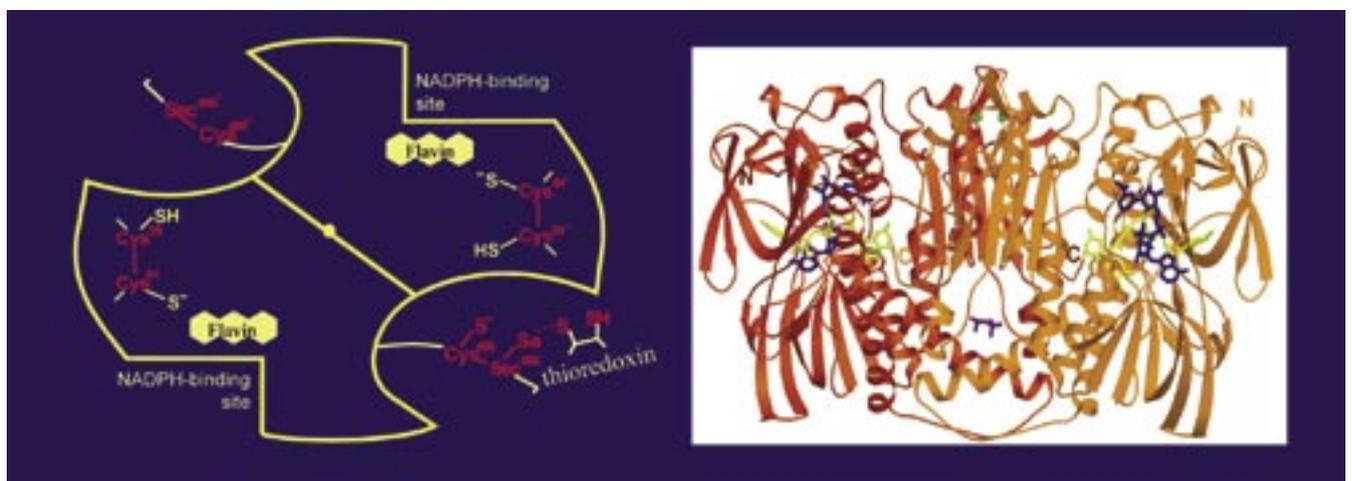


Abb. 5: Die humane Thioredoxinreduktase, ein Selenoprotein und attraktives Zielmolekül für die Medikamentenentwicklung. Links: Schema der katalysierten Reaktion und Struktur des Proteins. Rechts: Dreidimensionale Struktur, die mittels Röntgenbeugungsanalyse erhalten wurde (Fritz-Wolf et al., J. Mol. Biol. (2007), in press.).

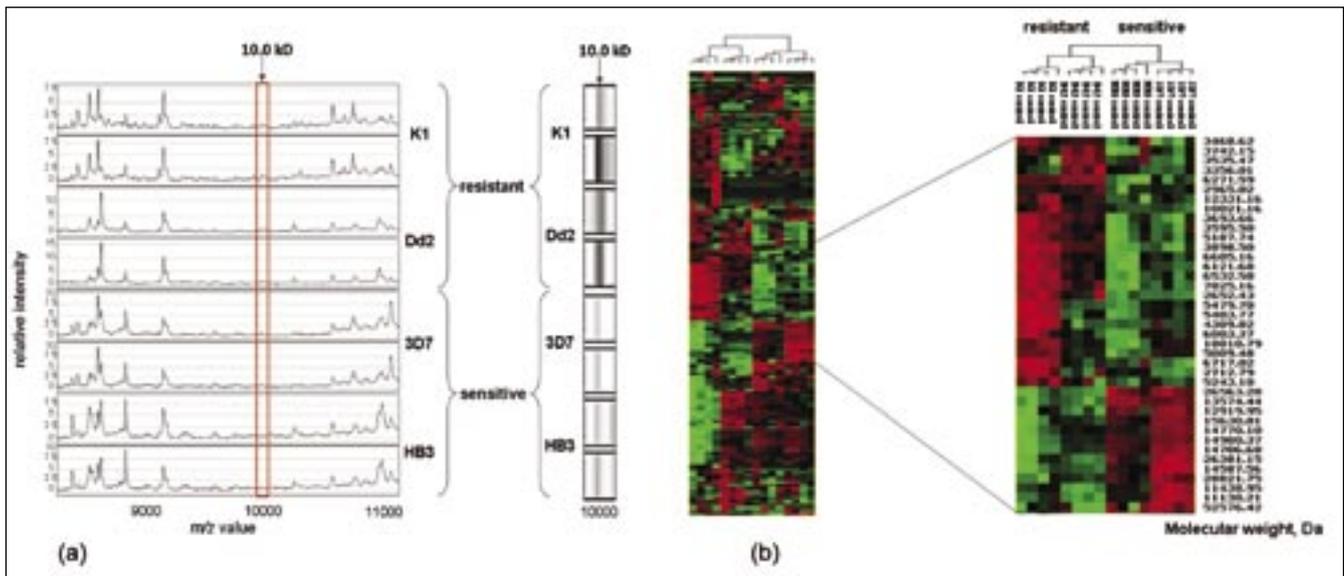


Abb. 6: Differentielle Proteomanalysen mittels SELDI-MS, die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten, bzw. zwischen Medikamenten-resistenten und -sensitiven Zellen zeigen (Koncarevic et al., Proteomics, 2007).

Struktur der TrxR stellt für die weitere Medikamentenentwicklung eine ideale Grundlage dar (Abb. 5). Insbesondere das selenhaltige flexible Ende des Proteins, das essentiell an der Katalyse beteiligt ist, ist als Angriffspunkt für Hemmstoffe attraktiv. Erstmals gelang uns die Visualisierung der Bewegung dieses Redoxarms mittels Röntgenstrukturanalyse (Abb. 3).

Peroxiredoxine (Prx) sind thiolabhängige Peroxidasen, die sowohl an der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies als auch an Signaltransduktions- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Der Mensch besitzt sechs verschiedene Prx, die sich hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation, ihrer Substratspezifität und ihres Katalysemechanismus unterscheiden. Viele Prx können irreversibel überoxidiert werden und haben dann Signalwirkung auf eine Zelle. Ein aktuelles von uns bearbeitetes Forschungsgebiet ist daher das Charakterisieren der Funktion der erythrozytären Prx bei Zellalterungsprozessen.

Glutathion S-Transferasen (GST) katalysieren Entgiftungs- und Biotransformationsreaktionen und können auch Peroxidaseaktivität besitzen und damit direkt oxidativen Stress entgiften. Viele Organismen haben verschiedene GST-Isoenzyme, die u.a. an Alterungsprozessen und Resistenzmechanismen von Tumorzellen und Parasiten beteiligt sind. GSTs sind daher vielversprechende Zielmoleküle für die rationale

Medikamentenentwicklung. In den letzten Jahren haben wir uns im Detail mit humanen und parasitären GSTs befasst. Spezifische Eigenschaften in Struktur und Katalysemechanismus der Enzyme werden derzeit für die Medikamentenentwicklung genutzt (Abb. 1). Um den Wirkmechanismus von etablierten oder neu entwickelten Medikamenten zu untersuchen, bieten sich differentielle Transkriptom- bzw. Proteomanalysen an. Neben der konventionellen 2-dimensionalen Gelelektrophorese werden hierfür SELDI (surface enhanced laser desorption ionization) MS und MudPit (multidimensional protein identification technology)-Analysen genutzt (Abb. 6).

Das redoxaktive kleine Protein Thioredoxin interagiert in humanen Zellen mit mehr als 30 verschiedenen molekularen Partnern. Es reguliert beispielsweise Aktivatoren der JNK- und P38-Kaskaden und steuert auch direkt die Aktivität von NF- κ -B. Unsere Arbeiten an dem genetischen Modellorganismus, *Drosophila melanogaster* (siehe S. 42), zeigten, dass sich der Redoxstoffwechsel der kurzlebigen Taufliege signifikant von dem des Menschen unterscheidet [5]. *Drosophila* besitzt zwar Glutathion als Antioxidans, jedoch keine Glutathionreduktase, um das Glutathion zu regenerieren. Diese Regeneration wird in der Taufliege von Thioredoxin in einer nicht enzymatisch katalysierten Reaktion übernommen, die zum Überleben ausreicht aber weniger effizient ist. In-

teressanterweise weist *Drosophila* Thioredoxin auch deutliche strukturelle und mechanistische Unterschiede zum humanen Thioredoxin auf.

Die Gnade der Langlebigkeit ist also nicht nur von genetischen Faktoren, Umweltbedingungen und Lebenswandel abhängig, sondern ist auch ganz deutlich in den dreidimensionalen Strukturen der molekularen Maschinen, die an Alterungsprozessen beteiligt sind, reflektiert.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rattan SIS (2006) Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. Free Rad Res 40: 1230-1238.
2. Holliday R (2006) Aging is no longer an unsolved problem in biology. Ann NY Acad Sci 1067: 1-9.
3. Harman D (2006) Free radical theory of aging: An update. Ann NY Acad Sci 1067: 10-21.
4. Urig S, Fritz-Wolf K, Réau R, Herold-Mende C, Tóth K, Davioud-Charvet E & Becker K (2006) Undressing of phosphine gold(I) therapeutic agents as irreversible inhibitors of human disulfide reductases. Angew Chem Int Ed Engl, 45: 1881-1886.
5. Kanzok S, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Müller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer RH & Becker K (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. Science 291: 643-646.