

Markus Schirmer
Dr. med.

Ein Doppelhelix-Motiv als Zielstruktur des Drug Design: Die Interface-Domäne obligat dimerer Disulfidreduktasen

Geboren am 08.05.1973 in Künzelsau
Reifeprüfung am 19.05.1992 in Möckmühl
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis SS 2001
Physikum am 11.09.1996 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Karlsbad-Langensteinbach
Staatsexamen am 20.06.2001 an der Universität Heidelberg

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

Glutathion- und Thioredoxinreduktasen sind zentraler Bestandteil der intrazellulären antioxidativen Kapazität und halten ein reduzierendes Milieu aufrecht. Davon profitieren wegen ihres gesteigerten Stoffwechsels besonders auch Tumorzellen oder der in den Erythrozyten parasitierende Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Bei der Suche nach neuen Antimalariamitteln erscheint somit eine Steigerung des oxidativen Stresses durch Hemmung der Glutathion- und Thioredoxinreduktasen der Wirtszellen und der Plasmodien als ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. Eine Möglichkeit besteht in der Blockierung des Zusammentretens der Untereinheiten dieser Disulfidreduktasen, die nur in homodimerer Form funktionstüchtig sind.

Die Helix H11 im engsten Kontaktbereich der Untereinheiten bewerkstelligt im besonderen den Zusammenhalt des Dimers und fungiert bei der posttranslationalen Monomerfaltung als zentrales Kontroll- und Steuerelement. Teilaspekte meiner Arbeit waren Untersuchungen zur Bedeutung bestimmter Aminosäuren in der Kontakthelix, die Stabilität der Enzyme gegenüber denaturierenden Einflüssen, ihre Fähigkeit zur Redimerisierung nach vorausgegangener Entfaltung sowie insbesondere das Design und die Testung von Peptidimitaten der Kontakthelix als potentiellen Dimerisierungshemmern.

Die Integrität der Aminosäuresequenz in der Kontakthelix ist offensichtlich essentiell für die Enzymstruktur. Eine schon früher durchgeführte G446E/F447P-Mutation bei der humanen Glutathionreduktase hatte den völligen Aktivitäts- und Strukturverlust zur Folge. Im entsprechenden Sequenzbereich der *Plasmodium falciparum*-Glutathionreduktase habe ich eine analoge Zweipunktmutation gesetzt. Die Mutante unterschied sich vom Wildtyp in

folgenden Kriterien: Sie hatte keine nachweisbare Enzymaktivität. Der Absorptionskoeffizient A_{461}/A_{280} als ein Maß für den FAD-Gehalt von $< 0,001$ (Wildtyp: 0,14) spricht für die Nichtausbildung der FAD-Domäne. Weiterhin gelang eine Bindung an 2',5'-ADP-Sepharose nicht, was für eine nicht regulär gefaltete NADPH-Domäne spricht. Dies bestätigte sich auch durch einen Fällungsversuch mit 30 % Polyethylenglykol: Das K_D für NADPH lag bei $> 1\text{mM}$, wohingegen sich beim Wildtyp ein $K_M (=K_D)$ für NADPH von etwa $5\ \mu\text{M}$ ergab. Die korrekte Expression der Mutante konnte durch eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese ($M_r = 57\ \text{kDa}$) sowie durch Antikörper-Erkennung im Westernblot nachgewiesen werden. Die Plasmodien-Glutathionreduktase ist also wie das Humanenzym sehr intolerant gegenüber Mutationen in diesem zentralen Bereich der Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten.

Die Stabilität der vier Enzyme - der humanen und *Plasmodium falciparum*-Glutathion- und Thioredoxinreduktasen (hGR, PfGR, hTrxR und PfTrxR) - variierte erheblich gegenüber denaturierenden Substanzen wie Guanidiniumchlorid (GdnHCl). Ein Aktivitätsverlust von $> 95\ %$ wurde zwischen $4,0\ \text{M}$ GdnHCl für die hGR und $1,5\ \text{M}$ GdnHCl für die hTrxR beobachtet. Bei allen vier Enzymen zeigte sich neben der Inaktivierung bei hohen GdnHCl-Konzentrationen auch eine Aktivierung bei $< 0,5\ \text{M}$ GdnHCl. In niedrigen Konzentrationen erhöht GdnHCl vermutlich die Tendenz des Wassers, diese Proteine auszuschließen, was eine Proteinstabilisierung und Aktivitätszunahme bewirkt. Mit NADPH im physiologischen Bereich genügte zur Inaktivierung sowohl geringere GdnHCl-Konzentrationen als auch niedrigere Temperaturen. Diese destabilisierenden Effekte sind durch NADPH-induzierte Konformationsänderungen zu erklären, die nicht allein durch Reduktion der Enzymmoleküle bedingt sind.

Ein Testsystem mit Denaturierung und Renaturierung für potentielle Peptidinhibitoren war erforderlich. Ein ähnliches System bestand bereits für die hGR. Die Bedingungen für die Renaturierung wurden optimiert und auf die PfGR sowie – stärker modifiziert – auf die Thioredoxinreduktasen ausgedehnt. Nach Denaturierung mit GdnHCl und Renaturierung durch starke Verdünnung des Denaturans ergaben sich die besten Werte wie folgt: Für die hGR wurde bei einer Enzymkonzentration von $1\ \mu\text{g/ml}$ nach $6\ \text{h}$ Renaturierungszeit eine Renaturierungsquote von $\geq 60\ %$ erzielt. Die Werte für die PfGR waren bei $2\ \mu\text{g/ml}$ Enzym in der Renaturierung $\geq 70\ %$ nach $6\ \text{h}$, für die hTrxR bei $2\ \mu\text{g/ml}$ knapp $50\ %$ nach $2\ \text{h}$ und für die PfTrxR bei $60\ \mu\text{g/ml}$ $\geq 50\ %$ nach $3\ \text{h}$. Damit war das Denaturierungs-

/Renaturierungssystem geeignet für die Testung von Peptidinhibitoren, die nach der Methode des "Drug Design" konzipiert worden waren.

Maßgeschneiderte Peptidinhibitoren als Dimerisierungshemmstoffe bieten eine vielversprechende Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung homodimerer Disulfidreduktasen. Ausgehend von einem 24 Aminosäuren umfassenden Peptidimitat der hGR aus dem Bereich der Kontakthelix wurden die korrespondierenden Sequenzen für die PfGR, hTrxR und PfTrxR durch Computeralignment ermittelt und die Peptide synthetisiert. Das K24_{PfGR} stabilisierte die PfGR beträchtlich, für K24_{hTrxR} und K24_{PfTrxR} konnten Hemmwirkungen auf die Faltung insbesondere der hTrxR nachgewiesen werden ($EC_{50\%} \approx 50 \mu\text{M}$). Im Vergleich zu Kontrollen mit K24_{PfGR} oder dem unspezifischen Rinderserumalbumin waren die inhibierenden Effekte des K24_{hGR} auf die hGR-Dimerisierung deutlich. Überdies konnte durch NMR-Spektroskopie eine Anlagerung des K24_{hGR} an die Kontakthelix H11 des hGR-Enzyms bereits nachgewiesen werden. Deshalb wurden im nächsten Schritt verkürzte Varianten des K24_{hGR} mit 11 bis 19 Aminosäuren untersucht.

Das Peptid K16_{hGR} (Aminosäurereste 439-454 im hGR-Enzym) stellte sich im Vergleich zu allen anderen getesteten Sequenzen als ein bedeutend wirksamerer Inhibitor der Renaturierung heraus. Der $EC_{50\%}$ -Hemmwert von 0,5-1 μM bestätigte sich auch bei 37 °C bzw. in Gegenwart physiologischer NADPH-Konzentrationen. Des weiteren hemmt K16_{hGR} auch die Rückfaltung der PfGR ($EC_{50\%}$ ebenfalls 0,5-1 μM) und hTrxR ($EC_{50\%} = 10 \mu\text{M}$). Zu beachten ist hierbei, dass diese $EC_{50\%}$ -Werte auf eine K-Peptid-freie Kontrolle bezogen sind, wahrscheinliche unspezifische Aktivierungseffekte darin also noch enthalten sind. Da die Kontakthelix der Untereinheiten für die Proteinfaltung von so zentraler Bedeutung ist, könnte ein dem K16_{hGR} nachgebildetes Peptidmimetikum katalytisch wirksam sein: Noch während des Translationsprozesses wird die korrekte Faltung unterbunden und die Proteinkette damit für Proteasen zerlegbar. Dasselbe Inhibormolekül stünde für die Faltungshemmung weiterer in *statu nascendi* befindlicher Enzymmoleküle zur Verfügung. Ein solcher Stoff könnte die Eigenschaften eines wirkungsspezifischen, nebenwirkungsarmen und preiswerten Medikaments beispielsweise gegen die Malaria in sich vereinigen. Wie intensive Forschungen an Enzymen anderer pathogener Erreger wie etwa dem HIV zeigen, eröffnet sich für die Anwendung des Konzepts der Dimerisierungshemmung ein weites Feld. Durch gezieltes Medikamentendesign unter Einsatz von Röntgenstrukturanalyse und Computermodellierung ist die Entwicklung neuer hochwirksamer Substanzen mit selektivem Wirkungsprofil zu erwarten.

