

Sven Kohler

Dr. med.

## **Charakterisierung der *Trypanosoma cruzi* Liponamiddehydrogenase als Zielmolekül der Medikamentenentwicklung**

Geboren am 11.01.1974 in Bensheim

Reifeprüfung am 14.06.1993 in Bensheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis SS 2001

Physikum am 19.03.1997 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Mannheim

Praktisches Jahr in Kapstadt (Chirurgie), Mannheim (Innere) und Ludwigshafen (plastische Chirurgie)

Staatsexamen am 26.11.2001 an der Universität Heidelberg, Klinikum Mannheim

Promotionsfach: Biochemie

Betreuerin: Frau Prof. Dr. R. L. Krauth-Siegel

*Trypanosomen* und *Leishmanien* sind Erreger verschiedener parasitärer Tropenkrankheiten. So ist *Trypanosoma cruzi* Erreger der Chagas-Krankheit, der dritthäufigsten parasitären Tropenkrankheit weltweit.

Die Liponamiddehydrogenase (LipDH) ist ein Teilenzym verschiedener Multienzymkomplexe wie z.B. der Pyruvatdehydrogenase. Verschiedene Medikamente gegen die akute Phase der Chagas-Krankheit wie Nifurtimox wirken wahrscheinlich als subversive Substrate der LipDH.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die LipDH aus *T. cruzi* näher zu charakterisieren und neu synthetisierte Naphthochinone als subversive Substrate zu testen und mit der entsprechenden Aktivität der Schweineherz LipDH zu vergleichen.

Im Einzelnen zeigten sich die folgenden Ergebnisse:

- 1) Die Reinigung der rekombinanten *T. cruzi* LipDH wurde verbessert, so dass sich die Haltbarkeit des Proteins deutlich verlängerte, die spezifische Aktivität mit 300 U/mg

der des authentischen aus dem Parasiten isolierten Enzyms entsprach und das Protein besser kristallisierte.

- 2) Da Parasiten empfindlicher auf oxidativen Stress reagieren als Säugetierzellen, sind als neue potentielle Medikamente gegen die Chagas-Krankheit Verbindungen interessant, die als Redoxpendler den oxidativen Stress der Parasiten erhöhen. Als solche Verbindungen wurden neu synthetisierte Naphthochinone untersucht. Die Naphthochinonreduktase-Aktivität der *T. cruzi* LipDH wurde mit der des Schweineherzenzyms verglichen. Es zeigte sich, dass Plumbagon-Derivate besser als Menadion-Derivate reduziert werden, und dass Plumbagon-Derivate mit ungeladenen Seitenketten vom Parasitenenzym effektiver reduziert werden als vom Säugerenzym. Zudem wurde festgestellt, dass der Anteil an Ein-Elektronenreduktion bei den Plumbagon-Derivaten höher ist als bei den Menadion-Derivaten. Dies ist insofern wichtig, als die dabei entstehenden Semichinone hauptverantwortlich für die Entstehung des oxidativen Stresses sind.
- 3) Ein Cysteinylrest im aktiven Zentrum der *T. cruzi* LipDH wurde mit Jodacetamid alkyliert, wodurch die Dihydroliponamiddehydrogenase-Aktivität gehemmt wurde. Oxidase-Aktivität und Naphthochinonreduktase-Aktivität blieben jedoch erhalten. Da die Naphthochinonreduktion des modifizierten Enzyms überwiegend eine Ein-Elektronenreaktion ist, zeigt dies, dass an dieser das redoxaktive Dithiol/Disulfid nicht beteiligt ist.
- 4) Die Naphthochinonreduktase-Aktivität der *T. cruzi* LipDH wurde unter anaeroben Bedingungen getestet. Diese Versuche zeigten, dass die Naphthochinonreduktase-Aktivität von dem jeweiligen Derivat abhängt. Während Plumbagon keine Aktivität im Anaeroben zeigt, ist mit Menadion eine Aktivität zu messen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Plumbagon mehr Ein-Elektronenreduktion zeigt als Menadion, und dass unter anaeroben Bedingungen die O<sub>2</sub>-vermittelte Ein-Elektronenreduktion gehemmt wird.
- 5) Die *T. cruzi* LipDH wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal kristallisiert. Damit ist die Grundlage geschaffen, röntgenstrukturanalytisch die Struktur des Enzyms zu bestimmen. Dies ist u.a. deshalb interessant, weil bisher noch keine Struktur einer

eukaryonten LipDH bekannt ist. Zur detaillierten Untersuchung des Reaktionsmechanismus wäre die Proteinstruktur der LipDH wichtig. Zudem könnte auf der Suche nach neuen Medikamenten gegen die Chagas-Krankheit versucht werden, Verbindungen herzustellen, die auf die Struktur der LipDH zugeschnitten sind (*structure based drug design*).