Kliniken/Institute:

Biochemie

Oliver Dirk Inhoff
Dr. med.

Die Trypanothionreduktase als Zielmolekül der antitrypanosomalen Wirkstoffentwicklung

Geboren am 21.06.1975 in Karlsruhe
Reifeprüfung am 15.06.1994 in Ettlingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis WS 2003/04
Physikum am 09.09.1998 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 24.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. R. L. Krauth-Siegel

Trypanosomen und Leishmanien besitzen einen einzigartigen Thiol-Stoffwechsel. Die nahezu ubiquitäre Glutathionreduktase (GR) ist durch die Trypanothionreduktase (TR) ersetzt, wobei die beiden Enzyme eine sich gegenseitig ausschließende Substratspezifität besitzen. Die TR ist essentiell für Vermehrung und Überleben des Parasiten, ihre Struktur ist bekannt und sie kommt in der Säugerwirtszelle nicht vor. Diese Eigenschaften und die Tatsache, dass Trypanosomatiden sehr sensitiv gegenüber oxidativem Stress sind, machen die TR zu einem höchst attraktiven Zielmolekül für das strukturbasierte Wirkstoffdesign auf der Suche nach neuen antiparasitären Wirkstoffen.

Das virtuelle Screening niedermolekularer Substanzbibliotheken mit dem Softwarepaket *FlexX* führte zur Identifizierung zweier wirksamer und gegenüber der Wirts-GR selektiver neuer Inhibitoren der TR. Detaillierte kinetische Untersuchungen zeigten, dass Chlorhexidin rein kompetitiv hemmt ($K_i = 2 \pm 1 \mu\text{M}$), während 4MOF ein vollständig gemischter Inhibitor der TR mit einem K_i - und K_i' -Wert von $6.2 \pm 2 \mu\text{M}$ bzw. $8.5 \pm 2 \mu\text{M}$ ist. *Modelling*-Analysen lassen eine Interaktion von Chlorhexidin und 4MOF mit drei bzw. zwei der fünf, zwischen TR und humaner GR nicht konservierten, AS im aktiven Zentrum der TR vermuten, wodurch die Selektivität der Hemmung erklärt würde. Mit den Verbindungen Chlorhexidin und 4MOF stehen nun zwei für die Wirkstoffentwicklung interessante neue Leitstrukturen zur Verfügung.

Ausgehend von der bekannten kompetitiven und irreversiblen Hemmung von 9-Aminoacridinen bzw. (Terpyridin)Platin(II)-Komplexen wurden vergleichende Inhibitorstudien mit vier verschiedenen (2-Hydroxyethanthiolato)(4'-substituierten-2,2':6',2''-terpyridin)Platin(II)-Acridin-Konjugaten zur Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durchgeführt. Die (Terpyridin)Platin(II)-Acridin-Konjugate erwiesen sich als gemischte Inhibitoren der TR mit K_i - und K_i' -Werten von 0.3-4 bzw. 2-11 μM , aber keine Inhibitoren der humanen GR. Keines der Konjugate zeigte eine irreversible Hemmung der TR. Die kinetischen Analysen deuten darauf hin, dass an das freie Enzym zwei Inhibitor-moleküle, an den ES-Komplex jedoch nur ein Molekül bindet. Die überraschende Feststellung, dass die Kombination eines irreversiblen mit einem kompetitiven Liganden nicht zum Erhalt der irreversiblen Hemmung führt, lässt darauf schließen, dass der Acridinanteil den Bindungsmodus bestimmt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Anthrachinon-Analoga sind schwache oder keine Inhibitoren der TR und steigern die intrinsische substratunabhängige Oxidaseaktivität der TR wenn überhaupt, nur geringfügig. Die beste Hemmwirkung zeigte Tiloron (kompetitiver Hemmtyp mit $K_i = 68 \pm 10 \mu\text{M}$). Die bekannten immunmodulatorischen Effekte, in Kombination mit der Wirkung als TR-Inhibitor, machen Tiloron qualitativ zu einer interessanten Verbindung auf der Suche nach potentiellen anitrypanosomalen Wirkstoffen.

(2,2':6',2''-Terpyridin)Platin(II)-Komplexe sind irreversible Inhibitoren der *Trypanosoma cruzi* TR, aber nicht von humaner GR. Zur näheren Charakterisierung des Bindungsmodus wurden spektroskopische Untersuchungen von mit drei unterschiedlichen (2,2':6',2''-Terpyridin)Platin(II)-Komplexen vollständig gehemmter TR durchgeführt. Die Ergebnisse bei Hemmung der TR in Anwesenheit von NADPH sprechen für eine kovalente Modifikation der nukleophilen Thiolgruppe von Cys52 im aktiven Zentrum. Anscheinend kommt es zum Ersatz des vierten Liganden der Platin(II)-Komplexe durch den Cysteinrest und Fixierung des Metallions am Thiolanion. Die Inaktivierung der TR in Abwesenheit des Reduktionsmittels NADPH kommt möglicherweise durch eine Bindung der Platin(II)-Komplexe an dem direkt an der Katalyse beteiligten His460' zustande. Die Veränderungen durch nachträgliche Zugabe von NADPH lassen teilweise eine passagere oder persistierende Umlagerung der Komplexe im aktiven Zentrum der TR, mit folgender Modifikation von Cys52, vermuten.

Um die Bindung von Inhibitoren an die TR auf atomarer Ebene untersuchen zu können, wurden unmodifizierte TR und mit dem (4'-Chloro-2,2':6',2''-terpyridin)Platin(II)-Amin-Komplex (P1a) gehemmtes Enzym kristallisiert. Die Kristallisation der TR unter publizierten Bedingungen war reproduzierbar und lieferte große Einkristalle ohne Kanten- und Flächendefekte. Durch Einsatz des Microseeding konnten mehrere TR-P1a Kristalle bis zu einer Größe von $288 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ gezüchtet werden. Da die Kristalle allerdings keine einheitliche Oberfläche aufweisen, ist eine weitere Optimierung der Bedingungen notwendig.

(2,2':6',2''-Terpyridin)Platin(II)-Komplexe sind wirksam gegen Trypanosomen in Zellkultur. Zur Klärung der Frage, ob die irreversible Hemmung der *T. cruzi* TR möglicherweise für den zytotoxischen Effekt der (2,2':6',2''-Terpyridin)Platin(II)-Komplexe in Zellkultur mitverantwortlich ist, wurden Blutstromparasiten mit P2a behandelt und anschließend die TR-Aktivität in Gesamtzellextrakten bestimmt. Die Inkubation der Zellen mit P2a führte trotz beginnender Wachstumshemmung der Parasiten nicht zu einer Verringerung der TR-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Gestützt durch die Beobachtung von Krieger *et al.*, dass die Reduktion der TR-Aktivität auf sehr geringe Aktivitäten (1%) nicht zu einer sofortigen Lyse der Zellen führt, lässt das Ergebnis darauf schließen, dass die Inhibition der TR durch P2a nicht die eigentliche Ursache der lysierenden Wirkung ist.