

Andreas Winzer  
Dr. med.

**Naphthochinone als Sabotage-Inhibitoren der Glutathion-Reduktasen in Malaria-infizierten Erythrozyten.  
Kinetische und kristallographische Analyse neuartiger Substanzen.**

Geboren am 13.01.1980 in Aalen.  
Staatsexamen am 19.11.2007 an der Universität Heidelberg.

Promotionsfach: Biochemie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. R. H. Schirmer

Oxidativer Stress als wirkungsvoller Therapieansatz gegen die Malaria hat sich auch gegen Chloroquin-unempfindliche Erregerstämme bewährt und kann darüber hinaus auch Medikamenten-Resistenzen zurückdrängen. In der Stress-Abwehr des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* spielen die Glutathionreduktasen des Erregers und des Wirtserythrocyten eine Schlüsselrolle. Die Glutathionreduktase katalysiert die Reaktion  $\text{NADPH} + \text{Glutathiondisulfid} + \text{H}^+ = \text{NADP}^+ + 2 \text{Glutathionthiol}$ ; diese GSH-Moleküle sind die Träger der antioxidativen Reduktionsäquivalente. Zu den prooxidativen Pharmaka gehören Naphthochinone wie das Menadion. Als Inhibitoren der antioxidativen Glutathionreduktase und als subversive Substrate dieses Enzyms tragen Naphthochinone in zweifacher Weise zur Radikalbildung und Verknappung an Redoxäquivalenten bei. Zu den Ergebnissen im Einzelnen:

**Reversible Hemmwirkung neuentwickelter Naphthochinone auf Glutathionreduktasen.** Am stärksten wurde das Humanenzym im IC<sub>50</sub>-Test durch das Benzylmenadion HB29 beeinträchtigt (IC<sub>50</sub> = 1,4 µM), während der niedrigste Wert für die Parasiten-Glutathionreduktase mit dem Fluor-Benzylmenadion HB40 (2,1 µM) gemessen wurde. Die übrigen Fluor-Naphthochinone erwiesen sich als schwächere reversible Inhibitoren. Die Ergebnisse im niedrigen µM Bereich entsprachen in etwa den Werten für das saure Naphthochinon M5, das sich bereits im Tierversuch als hochwirksam gegen verschiedene *P. falciparum*-Stämme gezeigt hatte.

Kovalente Enzymmodifikationen durch Fluor-haltige Naphthochinone.

Die getesteten Substanzen führten zu einer zeitabhängigen irreversiblen Inaktivierung der orthologen Glutathionreduktasen. Dieser Prozess war abhängig von NADPH, dem reduzierenden Substrat dieser Enzyme in situ. Die Inaktivierung ließ sich weder durch Dialyse noch durch Waschen und Zentrifugation des kristallisierten Proteins rückgängig machen. Obwohl die Glutathiondisulfid-Reduktion irreversibel gehemmt war, konnte das modifizierte Enzym mit unveränderter katalytischer Effizienz weiterhin Menadion - das Standard-Naphthochinon - als Substrat umsetzen.

**Kristallstruktur des durch Fluor-M5 irreversibel gehemmten Enzyms.** Nach Kristallisation in Gegenwart von etwa 1 M Ammoniumsulfat konnte die Kristallstruktur der modifizierten Human-Glutathionreduktase mit einem R<sub>frei</sub> von 25,6% bis auf 1,7 °Å aufgelöst werden. Der Inhibitor war eindeutig kovalent an das katalytische Cys 58 gebunden, an die Stelle der Austrittsgruppe Fluorid tritt in Thioetherbindung der Schwefel des Cysteins. Die Position des gebundenen Naphthochinons wurde zusätzlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit His 467', Arg 347, Arg 37 and Tyr 14 stabilisiert.

**Naphthochinone als subversive Substrate der Glutathionreduktasen.** Die Fluormenadion-Derivate HB28 und HB49 erwiesen sich als effizienteste Substrate der Glutathionreduktase. Am schnellsten wurden sie von dem parasitären Enzym umgesetzt. Die  $k_{cat}$ -Werte waren dabei 700- bzw. 30-mal höher als die Vergleichswerte mit dem Standard-Naphthochinon Menadion. Darüber hinaus ließ sich mit diesen Substanzen zum ersten Mal eine sigmoidale Enzymkinetik für die Reduktion eines Chinons nachweisen. Somit legt die Enzymkinetik nahe, dass das Chinon an unterschiedlichen Stellen im dimeren Protein reduziert wird. Es sei noch erwähnt, dass Targets von subversiven Substraten nicht durch Gen-Knockout-/Gen-Rescue-Experimente validiert werden können.

**Molekulare Mechanismen der Wirkungen des Naphthochinons Fluor-M5 auf die Human-Glutathionreduktase.** Für den Wirkstoff HB27 wurden mit biochemischen und kristallographischen Methoden die beiden Wirkmechanismen aufgeklärt. Fluor-M5 wird unter quasi-physiologischen Bedingungen in einer NADPH-abhängigen Reaktion von der Glutathionreduktase reduziert und dabei zum präformierten Chinonmethid aktiviert. Ein zweites Molekül NADPH reduziert dann das Disulfid im aktiven Zentrum der Glutathionreduktase, wobei zwei Thiolgruppen entstehen. Das hochreaktive Thiol des Cys 58 reagiert nun mit dem zuvor aktivierten Fluor-M5 unter Freisetzung des Fluoridions. Die am Cys 58 kovalent modifizierte Glutathionreduktase ist nicht mehr in der Lage, das physiologische Substrat Glutathiondisulfid zu reduzieren, wohl aber das Naphthochinon. Dieser Redoxpendler führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxid und  $H_2O_2$ . **Insgesamt bewirkt also Fluor-M5 als Sabotage-Inhibitor die Umwandlung des rein antioxidativen Enzyms Glutathionreduktase in ein rein prooxidatives Enzym.**