

Inhibitoren von Disulfid-Reduktasen als Chemotherapeutica – Design von Wirkstoffen gegen die Chagas-Krankheit und gegen die Malaria

R. Heiner Schirmer*, Joachim G. Müller und R. Luise Krauth-Siegel

Global gesehen, sind parasitäre Erkrankungen wie die Malaria oder die Chagas-Herzkrankheit die größte Bedrohung für eine menschenwürdige Existenz. Das Bewußtsein für dieses Problem und die Herausforderung, eine chinähnliche Substanz gegen die Malaria zu synthetisieren, prägten vor etwa 100 Jahren die Anfänge und die Entwicklung der chemischen Industrie. In dieser Übersicht werden Aspekte des Drug-Designs, einer jungen Disziplin der pharmazeutischen Chemie, behandelt. Im Mittelpunkt stehen das Flavoenzym Glutathion-Reduktase und das vor wenigen Jahren entdeckte Parasitenenzym

Trypanothion-Reduktase. Anhand der Strukturen dieser Moleküle wurden En-



zyminhibitoren als potentielle Chemotherapeutica gegen Parasiten modelliert.

Diskutiert werden auch biochemische und klinische Befunde als Grundlage für das Drug-Design; denn gerade auf physikochemischer submolekularer Ebene muß der Chemiker den Entwicklungsvorsprung der belebten Natur respektieren und nutzen. – Das Bild links zeigt zwei von Malariaerregern zerstörte Erythrocyten. In der Bildmitte verläßt ein Parasit gerade seine Wirtszelle durch eine Bresche in der Zellmembran. Sein Ziel könnte der nächstliegende gesunde Erythrocyt (rechts unten) sein.

Stichworte: Drug-Design · Enzyminhibitoren

1. Einleitung

Drug-Design bedeutet die Anwendung biomolekularer Erkennungsmechanismen auf chemotherapeutische Probleme^[1]. Der erste Schritt ist immer die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins oder eines anderen Makromoleküls, das für einen Krankheitserreger oder einen Krankheitsprozeß eine wesentliche Rolle spielt. An diesem Zielmolekül werden dann mit computergraphischen Methoden Inhibitormoleküle modelliert^[2]. Die entsprechenden Verbindungen werden synthetisiert, auf ihre Wirksamkeit als Chemotherapeutica getestet und gegebenenfalls verbessert. Nach diesem Prinzip wurde beispielsweise der Peptidasehemmer Captopril, der Wirkstoff von Einstiegsmedikamenten bei der Behandlung des Bluthochdrucks, entwickelt^[3]. Der jüngste Erfolg des Drug-Designs ist das gegen Influenzaviren wirksame Guanidinoglycal^[4, 5].

Unser Beitrag befaßt sich mit der Notwendigkeit, neuartige Wirkstoffe gegen parasitäre Infektionskrankheiten zu entwickeln. Im Mittelpunkt stehen dabei die antioxidativen Enzyme Trypanothion-Reduktase und Glutathion-Reduktase als Zielmoleküle des Drug-Designs.

2. Krankheitsbilder der Malaria

In den letzten 25 Jahren hat die Malaria ihre angestammte Rolle als größte Bedrohung für Gesundheit und wirtschaftlichen Wohlstand der Menschheit zurückgewonnen, und sie baut diese Position aus^[6, 7]. Derzeit sind nach den Zahlen der Weltgesundheitsorganisation 1.5 Milliarden Menschen durch die Malaria gefährdet, 300 Millionen Krankheitsfälle werden pro Jahr registriert, mehr als 2 Millionen Menschen – meist Kinder unter fünf Jahren – sterben an der Malaria, und ungezählte Kinder werden zu Krüppeln oder chronisch krank.

Die Erreger der Malaria sind Protozoen, die verkettete Fortpflanzungszyklen im Menschen und in blutsaugenden Anophelesmücken durchlaufen. Zur eigentlichen Erkrankung beim Menschen kommt es, wenn sich die Malariaparasiten in den Erythrocyten, den roten Blutzellen, vermehren. Das klinische Bild ist charakterisiert durch hohes Fieber und ein vernichtendes Krankheitsgefühl. Allgemein bekannt ist die sogenannte *Malaria tertiana*, bei der es an jedem dritten Tag zu einem Fieberschub kommt. Ein solcher Fieberschub kostet dem Energiehaushalt des Kranken bis zu 20000 kJ; da meist unterernährte Kinder zwischen zwei und fünf Jahren betroffen sind, ist Entkräftung in der Regel die Todesursache, der Kranke verhungert also durch die Fieberschübe buchstäblich.

[*] Prof. Dr. R. H. Schirmer, Dr. J. G. Müller, Priv.-Doz. Dr. R. L. Krauth-Siegel
Institut für Biochemie II der Universität
Im Neuenheimer Feld 328, D-69120 Heidelberg
Telefax: Int. + 6221/56-5586

Auch das Immunsystem ist Spitzenbelastungen ausgesetzt. Wenn nur 1 % der Erythrocyten bei Malaria befallen sind, werden alle drei Tage beim Platzen der infizierten Zellen 10–20 g Fremdprotein direkt ins Blutplasma entlassen. Die Malaria ist somit die Sepsis, die Blutvergiftung, par excellence. Vieles deutet darauf hin, daß das Immunsystem und vor allem das Netzwerk der Interleukine nicht durch die Auseinandersetzung mit Bakterien und Tumorzellen, sondern durch die mit Malariaparasiten im Laufe der Evolution für Höchstleistungen programmiert worden sind.

Wesentliche Prinzipien der körpereigenen Krebsabwehr ließen sich demnach aus dem Studium der Erkrankungen durch intrazelluläre Parasiten – der größeren und älteren Bedrohung für höhere Organismen – erklären. Die Empfehlung an die Krebsforschung, die parasitären Erkrankungen mit einzubeziehen, hat auch einen wissenschaftspolitischen Aspekt: Für jeden an Krebs erkrankten Patienten wird um ein Vielfaches mehr an Forschungsgeldern aufgewendet als für jeden an Malaria sterbenden Menschen.

Gefährlicher noch als die *Malaria tertiana* ist die *Malaria tropica*, die durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird und bei der der Fiebertypus weniger charakteristisch ist. Die gefürchtete Komplikation ist hier die zerebrale Malaria, die sich in Halluzinationen, Kopfschmerzen, Krämpfen und schweren Bewußtseinsstörungen äußert. 5 % der Kinder, die die Zerebralmalaria überleben, leiden dauerhaft an neurologischen Schäden wie Halbseitenlähmungen, Blindheit oder Sprachstörungen^[8a]. Wegen ihrer weiten Verbreitung ist die Malaria somit die schwerwiegendste neurologische Erkrankung der Welt.

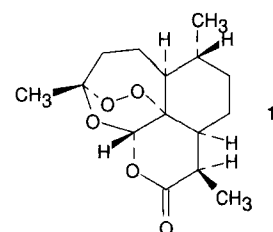
Die chronische Malaria ist vor allem wegen der resultierenden Anämie, der Blutarmut, eine schwere Krankheit. Daß es auch zu psychischen Veränderungen kommt, hat seinen sprachlichen Niederschlag im Begriff „Spleen“ gefunden; Spleen bedeutete ursprünglich die bei Malaria vergrößerte Milz.

Die Entwicklung von Impfstoffen gegen Malaria hat die Erwartungen bisher nicht erfüllt. Allerdings schützt eine von Patarrojo et al. in Kolumbien entwickelte synthetische Peptidvaccine nach den Ergebnissen erster Feldstudien teilweise vor einer Infektion mit *P. falciparum*^[8b].

Malariaparasiten sind gegenüber chemischen Veränderungen ihrer Umwelt sehr anpassungsfähig. Bei Einführung eines neuen Medikaments ist damit zu rechnen, daß die Plasmodien, besonders *Plasmodium falciparum*, nach wenigen Jahren resistent werden. Chloroquin (Resochin), noch vor einem Jahrzehnt das

Mittel der Wahl, ist heute in vielen malariaendemischen Gebieten wirkungslos. Erst seit dem weltweiten Auftreten resistenter *P. falciparum*-Stämme beschäftigt sich die Wissenschaft mit dem Wirkungsmechanismus dieser Verbindung. Die Hemmung einer parasitenspezifischen Häm-Polymerase durch Chloroquin^[8c] ist zur Zeit die attraktivste Hypothese. Der zivile, vor allem aber der militärische Ferntourismus führten maßgeblich zur Verbreitung chloroquinresistenter Erreger.

Zur Zeit (1995) gibt es kein Präparat, das in allen Teilen der Welt vor Malaria schützt; der Bedarf an neuartigen Chemotherapeutica ist dementsprechend groß. Die heute vielversprechendsten Substanzen sind Derivate des Qinghaosu (Artemisinin) **1**, das 1971 von chinesischen Chemikern aus den Blättern von *Artemisia*-Arten isoliert wurde^[9b].



3. Die Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanosomiasis)

Wie die Plasmodien sind die miteinander verwandten Trypanosomen, Leishmanien und Crithidien ebenfalls einzellige Parasiten. Diese drei Gattungen gehören allerdings zu einer anderen Ordnung, den Kinetoplastida; der Name weist auf die typischen propellerartig wirkenden Geißeln hin (Abb. 1 links). Crithidien sind nur insektenpathogen. Trypanosomen und Leishmanien dagegen verursachen in tropischen Ländern schwere Infektionskrankheiten bei Menschen und Haustieren. Beispiele sind die lateinamerikanische Chagas-Krankheit (Erreger: *Trypanosoma cruzi*), die afrikanische Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense*), Orientbeule (*Leishmania tropica*), Kala-Azar (*Leishmania donovani*) sowie die in Afrika verheerende Rinderseuche Nagana (*Trypanosoma congolense*).

In Zusammenarbeit mit Klaus-Dieter Hungerer, Behringwerke Marburg, beschäftigen wir uns vor allem mit *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger einer chronischen Krankheit des Herzens und anderer innerer Organe (Abb. 1 rechts). Die Krankheit – 1909 von Carlos Chagas beschrieben und nach ihm benannt – ist das größte soziomedizinische Problem Südamerikas. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation sind



Heiner Schirmer, geboren 1942, studierte in Basel und Heidelberg Medizin und Philosophie. 1966 promovierte er bei Caspar Rüegg über das „Kontraktile Protein der Arterien“. Nach klinischen Tätigkeiten sowie einem Postdoktorandaufenthalt an der Dartmouth Medical School bei Lafayette Noda kam Schirmer 1970 an das Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, an dem er zusammen mit Georg Schulz nucleotidbindende Proteine analysierte. 1976 war er Bicentennial Lecturer in Boston und Philadelphia. Seit 1980 ist er Professor am Institut für Biochemie II der Universität Heidelberg. Sein Forschungsgebiet, das er gemeinsam mit dem Arbeitskreis der Chemikerin Luise Krauth-Siegel bearbeitet, ist die molekulare Parasitologie als Grundlage der Chemotherapie.

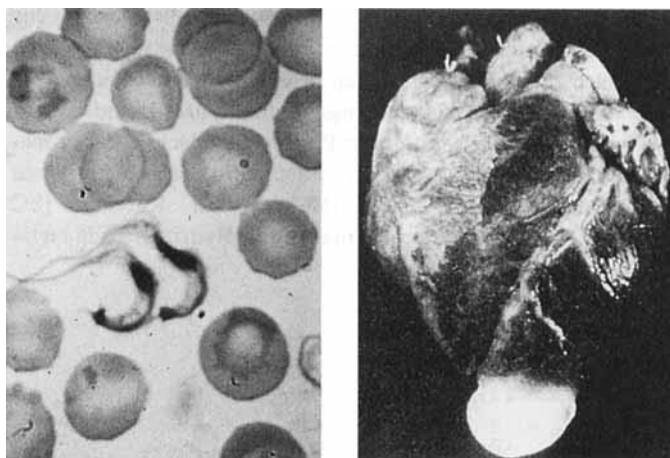


Abb. 1. Der Erreger der Chagas-Krankheit, der Geißel Südamerikas, ist *Trypanosoma cruzi*. Im Zentrum des linken Bildes befinden sich zwei Trypanosomen zwischen Erythrocyten; ihre Ziele sind beispielsweise Herzmuskel-, Nerven- oder andere Zellen. Bei vielen Patienten wird die Krankheit chronisch und führt zur Zerrüttung aller Herzstrukturen. Der plötzliche Herztod erfolgt durch Versagen der Erregungsleitung oder durch Bersten der linken Herzkammerspitz, deren Wand im Laufe der Krankheit papierdünn und sackförmig wird (unten im rechten Bild). Die Pathogenese der Krankheit mit ihrer schleichenden Zerstörung vegetativer Nervenzellen ähnelt demnach dem „gebrochenen Herzen“ aus der Belletristik, das z.B. im Roman Die Kameliendame von A. Dumas fils (1848) und in der darauf basierenden Oper La Traviata von F. M. Piave und G. Verdi (1853) künstlerisch gestaltet wurde.

über 20 Millionen Menschen aus den sozialen Unterschichten mit *T. cruzi* infiziert, dem blutsaugende Raubwanzen als Vektoren dienen. In den USA sind, wahrscheinlich durch Übertragung von Blut und Blutpräparaten aus Südamerika, etwa 100 000 Menschen betroffen.

Auf biochemischer Ebene ist Trypanosomen und Malariaerregern gemeinsam, daß sie auf einen intakten Thiolmetabolismus angewiesen sind, der sie vor reaktiven O_2 -Derivaten und anderen Oxidantien schützt^[9a]. Diese Achillesferse der Parasiten, die Empfindlichkeit gegen oxidativen Streß^[10, 11], ist ein vielversprechender Ansatzpunkt für das Drug-Design.

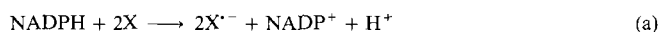
4. Oxidativer Streß als chemotherapeutischer Ansatz

Von 800 L Sauerstoff, die ein Mensch täglich aufnimmt, werden 5%, das entspricht 50 g, in Nebenreaktionen zu reaktiven Sauerstoffspezies wie $O_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} , $ONOO^-$ (Pernitrit), HO^{\cdot} und H_2O_2 , umgesetzt^[12]. Ihre cytotoxischen Wirkungen entfalten diese Substanzen durch Modifikation von Nucleinsäuren, thiolhaltigen Proteinen und Membranlipiden. Fast alle Zellen enthalten daher komplexe Stoffwechselsysteme, um die reaktiven Sauerstoffspezies unschädlich zu machen. Werden diese antioxidativen Systeme überfordert, spricht man vom „oxidativen Streß“ für die Zelle^[12].

Oxidativer Streß ist aber nicht nur eine unvermeidbare Begleiterscheinung des aeroben Lebens, sondern auch ein wichtiges Prinzip der körpereigenen Abwehr: Beim „respiratory burst“ (toxischen Sauerstoffstoß) produzieren Leukocyten und Makrophagen mit Hilfe einer membranständigen Oxidase ($NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\cdot-}$) Superoxidradikale als Ausgangssubstanzen chemischer Kampfstoffe gegen Bakterien, Parasiten und Tumorzellen. In der Haber-Weiss-

Reaktion ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^- + HO^{\cdot}$) entstehen anschließend hochgiftige HO-Radikale^[12d].

Auch zahlreiche pharmakologisch und toxikologisch aktive Substanzen wirken dadurch, daß sie als sogenannte Redoxpendler zu oxidativem Streß führen. Ein Redoxpendler X kann beispielsweise durch Flavoenzyme zum Radikalanion $X^{\cdot-}$ umgesetzt werden [Gl. (a)], das dann mit Sauerstoff reagiert [Gl. (b)].

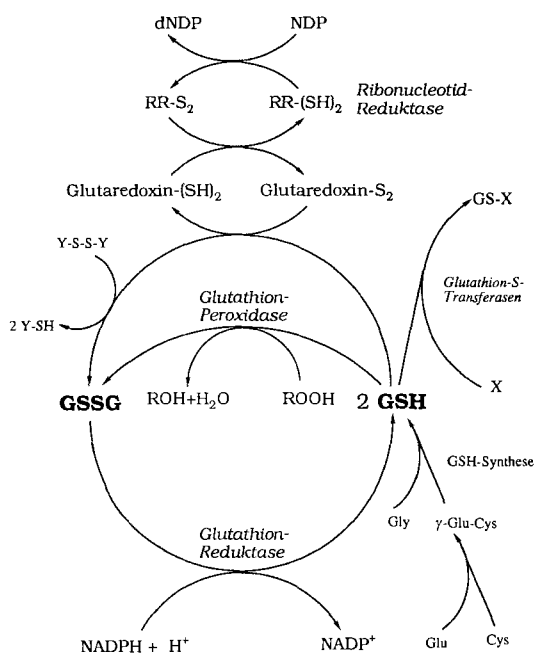


Bilanzmäßig katalysiert der Redoxpendler X also die gleiche Reaktion wie die Oxidase der Leukocyten. Bekannte Redoxpendler sind das in der Therapie der Chagas-Krankheit eingesetzte Nifurtimox^[9a], die Cytostatica Mitomycin C und Doxorubicin sowie die Herbizide Paraquat^[13a] und Diquat. Bemerkenswert ist hierbei, daß das Antimalariamittel Qinghaosu I eine für die Wirkung essentielle *endo*-ständige Peroxidgruppe enthält^[9b].

Klinische und experimentelle Befunde sprechen dafür, daß oxidativer Streß ein wichtiger Mechanismus bei der Zerstörung von Parasiten und Tumorzellen ist^[12c]. Angeborene wie erworbene Faktoren, die in Erythrocyten einen erhöhten oxidativen Streß bewirken, bieten beispielsweise einen partiellen Schutz gegen *Plasmodium falciparum*, den Erreger der *Malaria tropica*^[10]. Das bekannteste Beispiel hierfür ist der Mangel an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ($G6PDH^-$; das hochgestellte Minuszeichen bezeichnet den Mangel). Dieser häufigste angeborene Enzymdefekt betrifft weltweit 400 Millionen Menschen und tritt in mehr als 300 genetischen Varianten auf^[14a]. Seine Verbreitung fällt mit der der *Malaria tropica* zusammen. Der funktionelle Defekt besteht unter anderem in der eingeschränkten Bereitstellung von NADPH über den Hexosemonophosphatweg. Dies führt in Erythrocyten zu einer Beeinträchtigung des Glutathion-Redoxsystems (Schema 1) und so zu stark erhöhtem oxidativem Streß. Die zusätzliche oxidative Belastung durch den Parasiten^[15a] bewirkt möglicherweise eine vorzeitige Freisetzung unreifer, nicht fortpflanzungsfähiger Erreger.

Als besondere Form des Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangels findet sich in malariaendemischen Gebieten das Krankheitsbild des Favismus. Dabei handelt es sich um eine hämolytische Anämie, die bei $G6PDH^-$ -Trägern nach dem Verzehr von Favabohnen auftreten kann. Da die Favabohne (*Vicia faba*) in den Ländern des Mittelmeerraumes von alters her eine Haupteisweißquelle ist, würde man erwarten, daß dieses Nahrungsmittel dort gegen einen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel selektioniert hätte. Tatsächlich aber ist die Häufigkeit mutierter $G6PDH$ -Gene gerade in diesen Ländern am höchsten. Der Enzymdefekt und die Favabohne wirken in der Abwehr von *P. falciparum* synergistisch. Aus *Vicia faba* wurden die β -Glucoside der Pyrimidine Isouramil und Divicin isoliert, die als Redoxpendler zur Bildung von H_2O_2 führen und damit den oxidativen Streß für die Zellen erhöhen^[14b]. Die Favabohne dient also auch der Malariaphylaxe!^[*]

[*] Bei Schimpansen wird vermutet, daß sie bestimmte Pflanzen nicht zur Ernährung, sondern als Chemoprophylaxe gegen Malaria aufnehmen. Zur Zeit werden die aktiven Inhaltsstoffe dieser Pflanzen charakterisiert [15b]. Besonders vielversprechend ist Vernodalin, ein Sesquiterpen aus *Veronica amygdalina*.

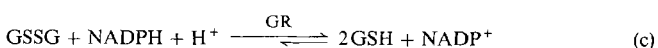


Schema 1. Der Glutathion-Redoxcyclus. Im Mittelpunkt des Cyclus steht das Tripeptid Glutathion (GSH, γ -Glutamylcysteinylglycin), das ATP-abhängig aus den Aminosäuren gebildet wird. GSH ist an der Entgiftung organischer Hydroperoxide (ROOH), an der Produktion von Desoxyribonucleotiden (Desoxynucleosiddiphosphaten, dNDP) für die DNA-Synthese [18] sowie an Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen in Proteinen beteiligt. Bei diesen Reaktionen werden zwei GSH-Moleküle zum Disulfid GSSG oxidiert. GSH wird durch Reduktion mit NADPH Glutathion-Reduktase-katalysiert regeneriert. In Erythrocyten wird NADPH als Reduktionsmittel durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) bereitgestellt. GSH dient nicht nur der Entgiftung von Peroxiden. Sogenannte Glutathion-S-Transferasen ermöglichen durch Konjugation mit Glutathion die Entsorgung zahlreicher cytotoxischer Substanzen und sind außerdem an der Synthese bestimmter Leukotriene und damit an der Kontrolle (patho)physiologischer Prozesse beteiligt [19 b].

Da der G6PDH⁻-Phänotyp zu einem Mangel an NADPH, dem Substrat der Glutathion-Reduktase, führt, entspricht der Favismus aus klinischer Sicht einer Glutathion-Reduktase-Insuffizienz in den Erythrocyten. Dies wird auch dadurch bestätigt, daß der seltene angeborene Glutathion-Reduktase-Mangel zu einem vergleichbaren Krankheitsbild führt^[12e, 16]. Auf dieser Grundlage ist die Hemmung der Glutathion-Reduktase, als Simulation eines natürlichen G6PDH-Mangels, ein erfolgversprechendes Prinzip für die Chemotherapie der Malaria^[10, 13b, 17].

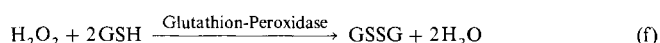
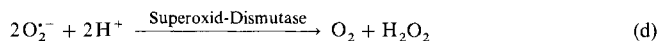
4.1. Entgiftung von H₂O₂ und organischen Hydroperoxiden durch den Glutathion-Redoxcyclus

Das Hauptabwehrsystem gegen reaktive Sauerstoffderivate ist der Glutathion-Redoxcyclus mit den Enzymen Glutathion-Reduktase (GR) und Glutathion-Peroxidase (Schema 1). Das Flavoenzym Glutathion-Reduktase [EC 1.6.4.2.] katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Glutathiondisulfid (GSSG, oxidiertes Glutathion) zu Glutathion (GSH) [Gl. (c)].



GR ist somit das Bindeglied zwischen dem Pyrimidinnucleotid-Redoxsystem und dem Thiol/Disulfid-Redoxsystem der Zelle^[16, 19a, 20]. Durch die GR-katalysierte Reaktion wird ein Verhältnis der intrazellulären Konzentration von GSH zu der

von GSSG zwischen 20 und 1000 eingestellt^[12a], wobei die GSH-Konzentration in tierischen Zellen etwa 5 mM ist. GSH ist an vielen zellulären Funktionen beteiligt. Eine der wichtigsten ist, Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide durch die selenabhängige Glutathion-Peroxidase unschädlich zu machen (Schema 1). Zusammen mit den antioxidativen Enzymen Superoxid-Dismutase [EC 1.15.1.1.] und Katalase [EC 1.11.1.6.] werden Sauerstoffradikale und Hydroperoxide metabolisiert^[12a] [Gl. (d)–(f)].



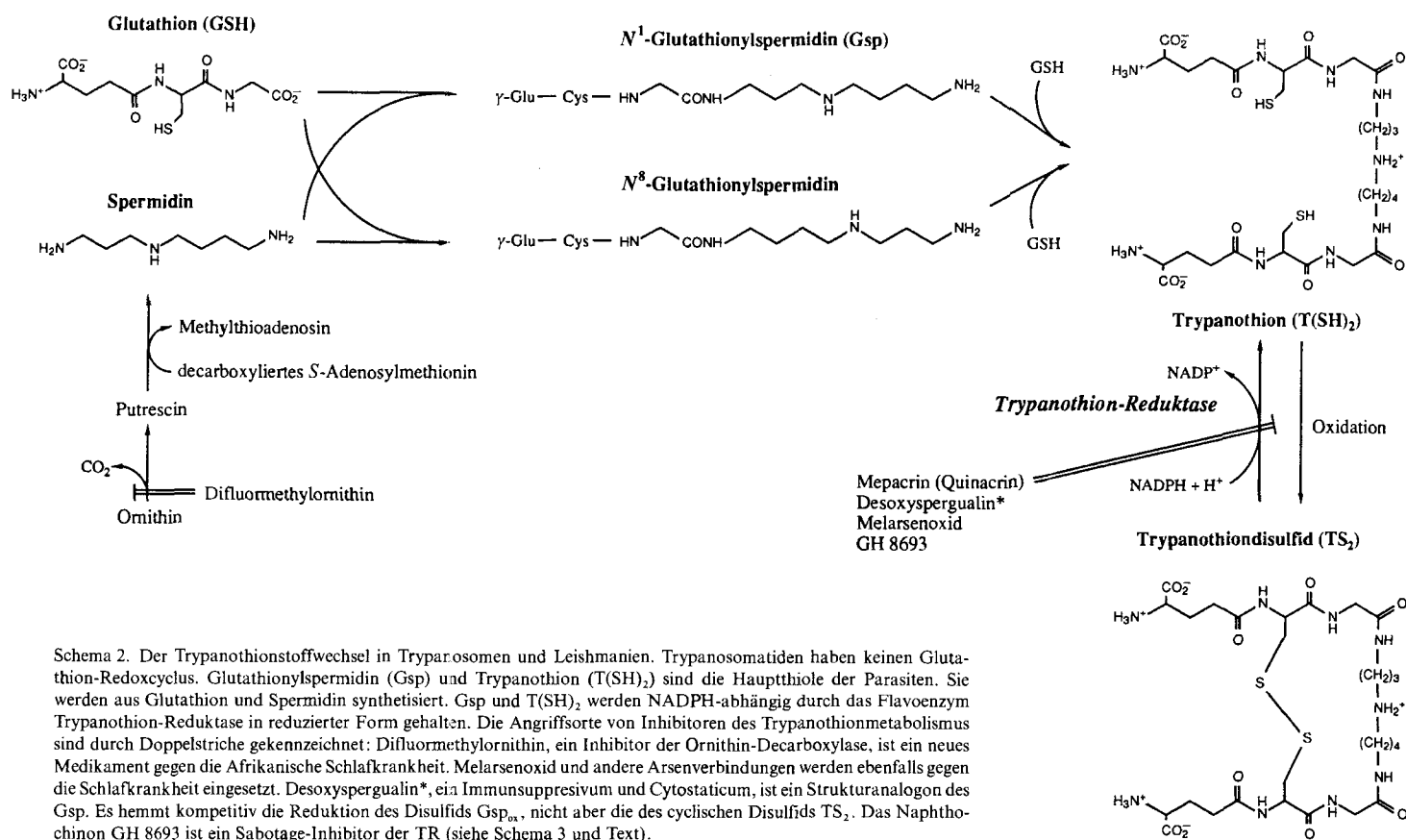
4.2. Trypanothion und andere Glutathionylspermidine bei Trypanosomen und Leishmanien

Trypanosomen und ihre Verwandten weisen zahlreiche Stoffwechselreaktionen auf, die bei anderen Mikroorganismen und bei höheren Organismen nicht vorkommen^[21]. Eine mögliche Erklärung dafür ist die lange eigenständige Entwicklung der Kinetoplastiden, die bereits vor 300 Millionen Jahren vom gemeinsamen Stamm der Eukaryonten abzweigten. Auf jeden Fall bieten die parasitenspezifischen Stoffwechselwege, z.B. der Trypanothionmetabolismus^[22, 23], vielversprechende Angriffspunkte für eine gezielte Wirkstoffentwicklung.

Anders als nahezu alle anderen Organismen, deren intrazelluläres Redoxgleichgewicht auf dem Glutathion/Glutathion-Reduktase-System beruht (Schema 1), haben Trypanosomatiden keine Glutathion-Reduktase. Ihre wichtigsten Thiole sind Verbindungen, in denen das Tripeptid Glutathion durch eine Amidbindung mit dem Triamin Spermidin verknüpft ist^[24] (Schema 2). Trypanothion T(SH)₂ und Monogluthathionylspermidin Gsp werden NADPH-abhängig durch das Enzym Trypanothion-Reduktase (TR) in reduzierter Form gehalten^[25, 26]. Den Trypanosomen fehlen außerdem die Enzyme Katalase und Glutathion-Peroxidase, die in anderen Organismen H₂O₂ und organische Hydroperoxide abbauen. Möglicherweise wird H₂O₂ in nichtkatalysierten Reaktionen entgiftet ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{T(SH)}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{TS}_2$)^[27a]. Ein besonders qualifiziertes Antioxidans ist das kürzlich in Leishmanien nachgewiesene Ovothiol A (4-Sulfanylhistidin)^[27b].

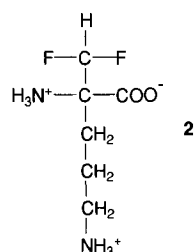
Allgemein sind Trypanosomen wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativer Belastung als ihre biologischen Wirte, beispielsweise der Mensch. Nifurtimox (Lampit) und Benznidazol (Radanil), die einzigen gegen *Trypanosoma cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, zur Verfügung stehenden Medikamente, sind Redoxpendler. Als Nitroarene führen sie zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies^[9a]. Beide Substanzen sind allerdings nur im akuten Stadium der Chagas-Krankheit wirksam und haben zudem erhebliche Nebenwirkungen. Auch für andere Formen der Trypanosomiasis ist die Entwicklung neuer Medikamente eine Notwendigkeit.

Erstaunlicherweise greifen die meisten der bekannten Antitrypanosomenmittel in den vor kurzem entdeckten Trypanothionmetabolismus ein (Schema 2). Dies gilt beispielsweise



Schema 2. Der Trypanothionstoffwechsel in Trypanosomen und Leishmanien. Trypanosomatiden haben keinen Glutathion-Redoxzyklus. Glutathionylspermidin (Gsp) und Trypanothion ($T(SH)_2$) sind die Hauptthiole der Parasiten. Sie werden aus Glutathion und Spermidin synthetisiert. Gsp und $T(SH)_2$ werden NADPH-abhängig durch das Flavoenzym Trypanothion-Reduktase in reduzierter Form gehalten. Die Angriffsorte von Inhibitoren des Trypanothionmetabolismus sind durch Doppelstriche gekennzeichnet: Difluormethylornithin, ein Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase, ist ein neues Medikament gegen die Afrikanische Schlafkrankheit. Melarsenoxid und andere Arsenverbindungen werden ebenfalls gegen die Schlafkrankheit eingesetzt. Desoxyspergualin*, ein Immunsuppressivum und Cytostaticum, ist ein Strukturanalagon des Gsp. Es hemmt kompetitiv die Reduktion des Disulfids Gsp_{ox} , nicht aber die des cyclischen Disulfids TS_2 . Das Naphthochinon GH 8693 ist ein Sabotage-Inhibitor der TR (siehe Schema 3 und Text).

für die von Paul Ehrlich gegen die Schlafkrankheit entwickelten Arsenverbindungen. Fairlamb et al.^[28] konnten zeigen, daß Melarsenoxid und das Dithiol Trypanothion ein stöchiometrisches 1:1-Addukt bilden. Außerdem werden Enzyme mit räumlich benachbarten Thiolgruppen, beispielsweise die TR und die GR durch aromatische Verbindungen des dreiwertigen Arsens gehemmt. Das von Graeme Henderson am Rockefeller-Institut synthetisierte Naphthochinon GH 8693, das in vitro gegen *T. cruzi* trypanozid ist^[28], erwies sich als ein Sabotage-Inhibitor der TR (siehe Schema 3)^[29]. Einen besonderen Erfolg brachte 1990 die Einführung von Difluormethylornithin (Eflornithin) **2**



als Medikament gegen die namensgebende chronische Form der Schlafkrankheit. Am Beispiel Eflornithin werden aber auch die Schwierigkeiten deutlich, die Herstellung einer ausschließlich in der sogenannten Dritten Welt gebrauchten Substanz zu finanzieren^[30]. Difluormethylornithin hemmt die parasitäre Spermidinsynthese (Schema 2); wegen der kurzen In-vivo-Halbwertszeit menschlicher Ornithin-Decarboxylase wird der Polyaminstoffwechsel des Wirts nicht beeinflusst^[21]. Gegenüber den Erregern der südamerikanischen Trypanosomiasis ist Eflornithin völlig unwirksam, da *T. cruzi* das Spermidin in einem anderen Stoffwechsel synthetisiert^[21, 22] oder aus dem Blut des Patienten aufnimmt.

5. Die dreidimensionalen Strukturen von Glutathion- und Trypanothion-Reduktase als Grundlage des Drug-Designs

Die Trypanothion-Reduktase erscheint wie geschaffen für das Drug-Design, da sie erregerspezifisch ist und beim Menschen nicht vorkommt. Dagegen bedarf die Wahl der Erythrocyten-Glutathion-Reduktase des Menschen als Zielmolekül für Antimalariamittel einer Erklärung. Vier Kriterien waren für uns maßgebend: Erstens folgen wir einem von der Natur vorgegebenen Prinzip (siehe Abschnitt 4). Zweitens zeigte sich bei Patienten, die mit 1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (BCNU, Carmustin) behandelt wurden (siehe Abschnitt 6.1), daß die GR für die Funktion normaler Erythrocyten nicht essentiell ist; die GR-Defizienz führt allerdings zu einer Verkürzung der Lebensspanne der Erythrocyten von 100 auf 30 Tage^[16]. Drittens ist zu bedenken, daß Medikamente, die gegen Parasiten gerichtet sind, zugleich einen Selektionsdruck zugunsten medikamentenresistenter Parasiten bedeuten^[31]. Dies ist für Pharmaka, deren Zielmolekül ein Wirtprotein ist, in weit geringerem Maß der Fall. Ein vierter Aspekt ist, daß die Membranen parasitierter Erythrocyten für größere Anionen ($M_r < 600$) permeabel sind^[32]; in diese Substanzgruppe gehören mehrere bekannte Inhibitoren der Glutathion-Reduktase^[*].

[*] Die Glutathion-Reduktase aus *Plasmodium falciparum* ist von uns in reiner Form isoliert und charakterisiert, aber noch nicht kristallisiert worden. Möglicherweise lassen sich Unterschiede zwischen Wirt- und Parasiten-Glutathion-Reduktase für das Drug-Design gegen das Enzym des Malariaerregers nutzen.

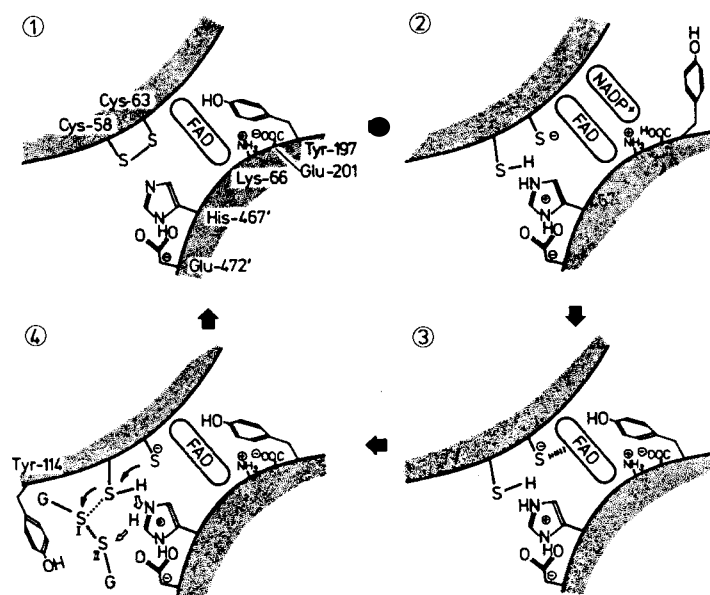


Abb. 2. Katalysezyklus der Glutathion-Reduktase [19 a, 34, 37]. Das Enzym Glutathion-Reduktase (GR) wechselt während der Katalyse zwischen der oxidierten Form E_{ox} und der Zwei-Elektronen-reduzierten Form EH_2 . ① Die oxidierte Form E_{ox} der GR ist charakterisiert durch die Disulfidbrücke zwischen Cys58 und Cys63. ② Reduktion des Disulfids mit dem Coenzym NADPH. Gezeigt ist der Komplex zwischen dem reduzierten Enzym EH_2 und dem Produkt $NADP^+$. ③ Die Freisetzung von $NADP^+$ führt zur Bildung von EH_2 . Dieser Zustand ist charakterisiert durch die Charge-Transfer-Wechselwirkung zwischen der Thiolatform des Cys63 und dem Flavining ($|||$). ④ Darstellung von drei katalytischen Teilschritten, die zur Bildung von zwei Molekülen GSH aus GSSG führen. Die hellen Pfeile beschreiben mutmaßliche Protonenbewegungen während der Bildung des gemischten Disulfids zwischen Cys58 und Glutathion I; die Reaktion führt zur Freisetzung eines Glutathionmoleküls (GSH II). Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Elektronenwanderungen bei der anschließenden Spaltung des gemischten Disulfids, durch die GSH I freigesetzt und das Enzym in den oxidierten Zustand E_{ox} ① überführt wird.

Austauschreaktionen zu zwei Molekülen GSH reduziert und das proteinständige Dithiol wieder zum Disulfid oxidiert, womit der katalytische Zyklus geschlossen wird.

Die dreidimensionale Struktur der Trypanothion-Reduktase aus *Crithidia fasciculata* [39, 40] sowie die Struktur der TR aus *T. cruzi* in oxidiertem und NADPH-reduziertem

Angemerkt sei noch, daß maßgeschneiderte Inhibitoren von Glutathion-Reduktasen nicht nur als Antimalariamittel, sondern auch als Cytostatica, als Sonden im Detoxikationsmetabolismus sowie als Herbizide von Interesse sind [23].

Menschliche Glutathion-Reduktase ist strukturell eines der bestuntersuchten Flavoenzyme. Die Primärstruktur sowie die räumliche Struktur mit 1.5 Å Auflösung sind bekannt [33]. Die Bindung der Substrate [34], mehrerer Substratanaloga und Inhibitoren [16, 35, 36] sowie die Stereochemie der Katalyse [37] sind auf atomarer Ebene aufgeklärt. Die cDNA der Glutathion-Reduktase wurde kloniert und sequenziert, so daß mit der Methode der gezielten Mutation eine noch detailliertere Struktur-Mechanismus-Analyse des Enzyms möglich geworden ist [38].

Die GR ist ein Homodimer aus Untereinheiten mit $M_r = 52000$. Das Enzym hat zwei identische aktive Zentren, an denen jeweils Aminosäuren beider Protein-Untereinheiten beteiligt sind. Wie Abbildung 2 zeigt, bildet in jedem aktiven Zentrum die Isoalloxazineinheit der prosthetischen Gruppe FAD eine Barriere zwischen den Substraten: NADPH bindet auf der *re*-Seite und Glutathiondisulfid (GSSG) auf der *si*-Seite des Flavins. Hier befindet sich auch das redoxaktive Dithiol/Disulfid des Proteins. Bei der Katalyse werden die Reduktionsäquivalente des NADPH über den Flavinring auf die Disulfidbrücke des Proteins übertragen, so daß das Dithiol Cys58-Cys63 entsteht. Nach Bindung von Glutathiondisulfid wird dieses durch mehrere Thiol-Disulfid-

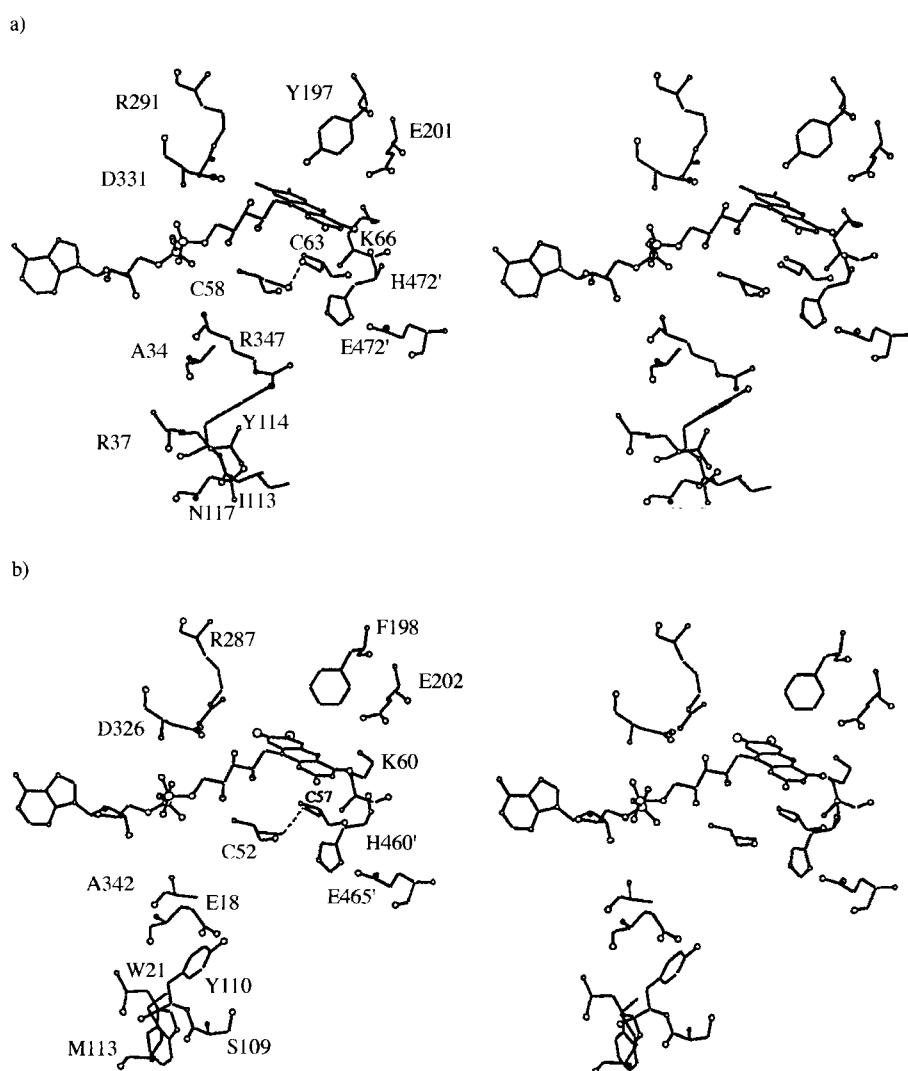


Abb. 3. Die aktiven Zentren der Glutathion-Reduktase (a) und der Trypanothion-Reduktase (b) [42, 43] (Stereo-darstellungen). Der Isoalloxazining des FAD befindet sich in der Mitte des aktiven Zentrums. Die an der Katalyse beteiligte Disulfidbrücke des Proteins ist gestrichelt dargestellt. An einigen Positionen enthalten die TR aus *Trypanosoma cruzi* und Human-GR unterschiedliche Aminosäurereste: Glu18 (Ala34 in GR), Trp21 (Arg37), Ser109 (Ile113), Met113 (Asn117) und Ala342 (Arg347). In den Darstellungen wurden die Einbuchstaben-Symbole für Aminosäuren verwendet.

Form^[42] wurden in den letzten drei Jahren aufgeklärt. Die TR ist eine FAD- und NADPH-abhängige Disulfid-Reduktase^[19a] und ähnelt somit in vielen physikalischen und chemischen Eigenschaften der GR, dem am nächsten verwandten Wirtenzym^[26]. Der wichtigste Unterschied zwischen beiden Reduktasen ist die sich gegenseitig ausschließende Spezifität gegenüber dem Disulfidsubstrat: Die TR reduziert nur Glutathionylspermidin-Konjugate, die GR nur Glutathiondisulfid. Das aktive Zentrum der TR ist mit der redoxaktiven Disulfid/Dithiol-Gruppe und dem Flavinring im Zentrum dem der GR sehr ähnlich (Abb. 3). Alle Aminosäurenreste, die in der GR direkt an der Katalyse beteiligt sind, sind in der TR konserviert^[41, 42]. Der Bereich des aktiven Zentrums, der an der Bindung des Disulfidsubstrates mitwirkt, ist – bedingt durch die geänderte Anordnung zweier α -Helices – in der TR geräumiger als in der GR. Von 19 Resten, die in der GR direkt oder über Wassermoleküle^[54a] an der Bindung des GSSG beteiligt sind, sind nur fünf in der TR nicht konserviert (Legende zur Abb. 3). Insgesamt sind drei Argininreste im aktiven Zentrum der GR durch neutrale oder saure Reste in der TR ersetzt^[42, 43]. Dadurch wird den unterschiedlichen Ladungsverhältnissen der Substrate Rechnung getragen. Den beiden anionischen Carboxylatgruppen der Glycinreste im GSSG-Molekül entsprechen in den TR-Substraten TS₂ und Gsp eine bzw. vier positive Ladungen (Schema 2). Gezielte Mutagenesen an TR und GR^[41, 44, 45] sowie die kürzlich aufgeklärte Struktur des Komplexes aus TR und Gsp_{ox}^[40b] bestätigen die Bedeutung der genannten Reste für die Substratspezifität. Es genügt die Substitution von jeweils zwei Aminosäureresten, um eine TR in eine GR umzuwandeln und umgekehrt. Das nächste Ziel ist die kristallographische Untersuchung von Enzym-Inhibitor-Komplexen. Die Kenntnis der spezifischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Liganden ist grundlegend für die Synthese eines hochaffinen, spezifischen Inhibitors.

5.1. Derivate tricyclischer Antidepressiva passen in die Spermidin-Nische der Trypanothion-Reduktase

Beim Vergleich der Substratbindungszentren der Trypanothion-Reduktase und der Glutathion-Reduktase entdeckten Benson et al.^[46a] eine hydrophobe Nische in der TR. Bei der GR befinden sich an den entsprechenden Aminosäurepositionen polare Reste. Mit dem computergestützten Programm von Goodford^[2] sondierten die Autoren diese Nische mit Molekülfragmenten und ordneten diesen energetisch und geometrisch günstige Positionen in der TR zu. Die anschließende Molekülmodellierung ergab, daß tricyclische Substanzen vom Phenothiazintyp – also bereits bekannte Pharmaca – diese Molekülfragmente enthalten. Enzymkinetische Tests bestätigten dann, daß Substanzen wie Clomipramin **3** kompetitive Inhibitoren der Trypanothion-Reduktase sind und sich daher als Leitsubstanzen für die Synthese neuer Trypanothion-Reduktase-Inhibitoren anbieten. Daß diese Substanzen die Glutathion-Reduktase nicht hemmen, war schon länger bekannt^[46b].

Nach ersten Versuchen sind die Phenothiazine vielversprechend zur Abtötung von Trypanosomen in Blutkonserven, womit ein

besonders dringliches Problem gelöst ist. Der Vorteil dieser Moleküle als Leitsubstanzen beim Drug-Design liegt auf der Hand: Toxikologie und Pharmakologie sind gut untersucht, und einige dieser Substanzen sind bereits – allerdings mit sehr geringer Dosierung – für die Chemotherapie (bei depressiven Patienten) zugelassen. Eine Möglichkeit der Verbesserung der Leitsubstanz Clomipramin ist bereits erkennbar: Bei der Bindung wird der Tricyclus offenbar in einer um die Mittelachse verdrehten Form gebunden^[46a]. Ein zu synthetisierendes Derivat, das ohne Energieaufwand die rezeptorgerechte Konformation erreichen kann, würde mit höherer Affinität an die TR gebunden. Die vorhergesagte Bindungsweise dieser Pharmaca muß dann allerdings durch die Röntgenstrukturanalyse kristalliner Enzym-Inhibitor-Komplexe bestätigt werden.

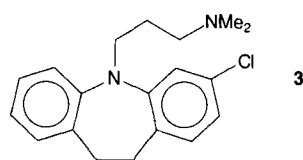
Eine andere tricyclische Verbindung mit trypanoziden Eigenschaften ist das Acridinderivat Mepacrin (Primaquin, Atebrin)

4. Es ist ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor der TR, nicht aber der GR^[31]. Kürzlich ist es uns gelungen, Mepacrin in TR-Kristallen zu binden und die Struktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes aufzuklären. Der Tricyclus wird erwartungsgemäß an der hydrophoben Wand im aktiven Zentrum gebunden, wobei die Substituenten am Acridin spezifische Wechselwirkungen mit Proteinseitenketten eingehen^[46c].

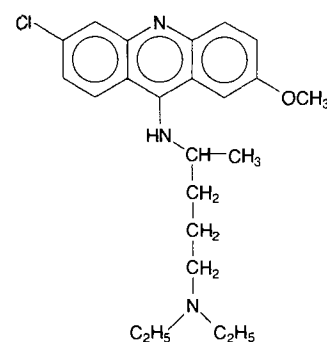
Daß die Selektivität dieser Inhibitoren für die TR nicht einfach auf dem Vorhandensein eines Tricyclus beruht, zeigen Untersuchungen mit Riboflavinanaloga, die die GR^[47a] wirksamer hemmen als die TR. Diese Riboflavinanaloga werden zwischen den Untereinheiten der GR in einer Höhlung gebunden, deren Ausdehnung in der TR wesentlich geringer ist^[47b].

5.2. Informationspolitik der Organismen: flexible Substanzen im Innern – starre Ringsysteme für die Umwelt

Am Beispiel der Phenothiazine und Acridine möchten wir das Phänomen diskutieren, daß ein starres Ringsystem in eine Nische des Proteins paßt, die physiologisch für die Bindung eines *flexiblen* Molekülteils, der Spermidinkette des Trypanothions, vorgesehen ist. Dies entspricht der Regel, daß jeder Organismus für seine eigenen Funktionen Verbindungen bevorzugt, die an ihre physiologischen Partner schon deshalb nicht zu fest binden, weil sie sehr viele freie Rotoren^[48, 49], also zu viele Freiheitsgrade, haben. Die Reversibilität der Komplexbildung gehört zum Wesen der Biochemie. Ebenso wesentlich ist, daß die Oberflächen von Proteinen – abgesehen von einigen wichtigen Zentren – wenig kontaktfreudig sind; auch diese Kontaktscheu beruht darauf, daß polare oder geladene Aminosäurenreste mit langen *flexiblen* Seitenketten die Löslichkeit vermitteln und bei einer Komplexbildung fixiert würden^[49–51]. (Diesen Aspekt, daß Nichtbindung eine wesentliche Eigenschaft der Oberfläche biologischer Makromoleküle ist, stellen wir so deutlich heraus, weil immer wieder Berichte Publizität gewinnen, in denen künstliche



3



4

Polypeptide als Enzyme mit vielseitigen katalytischen Möglichkeiten vorgestellt werden. Unspezifische Bindung und unspezifische Katalyse sind Eigenschaften fast jeden Polypeptids mit zufälliger Aminosäuresequenz; solche „Chaoten“ sind für die präzise Chemie lebender Systeme aber völlig ungeeignet.)

Durch die Einschränkung von Freiheitsgraden während der Assoziation wird die Bildung eines Liganden-Rezeptor-Komplexes stark behindert. Dies könnte das häufige Vorkommen polycyclischer Naturstoffe erklären. Cyclisierung führt zu Ordnung in einer chemischen Struktur; der Entropieaufwand bei der Bindung eines solchen Moleküls an einen Rezeptor sind entsprechend gering und die Gibbs-Energie der Bindung wird dadurch negativer. Antibiotica, Pheromone und andere aromatische Lockstoffe, Pflanzenalkaloide, aber auch Gifte auf der Basis cyclischer Peptide seien als Beispiele genannt. Auch viele Medikamente sind polycyclische Verbindungen mit stark eingeschränktem Konformationsraum. Am Rande sei vermerkt, daß solche Substanzen nicht nur an ihren Rezeptor fest binden, sondern auch resistent gegen hydrolytisch abbauende Enzyme sind. Besonders deutlich ist dies bei starren Peptidmimetica; die analogen, nicht intern verbrückten Peptide werden im Zielorganismus sekundenschnell durch Peptidasen abgebaut. Peptidasen

und andere Hydrolasen zerstören vor allem Moleküle mit großem Konformationsraum.

Das Ausmaß von Ringbildungen und Verbrückungen in ansonsten ähnlichen Molekülen ermöglicht somit eine subtile Kontrolle der Bindung an ein Protein und dadurch die einer physiologischen Funktion. Auch die Einführung einer Doppelbindung in den Alkylrest eines Liganden an der richtigen – am Rezeptor abgemessenen – Stelle kann aus entropischen Gründen die Affinitätskonstante um eine Größenordnung erhöhen (siehe Anhang). Viele dieser Erkenntnisse wurden an einem Modellsystem gewonnen, in dem die Wechselwirkungen des Antibiotikums Ristocetin A mit *N*-Acetyl-D-Alanyl-D-Alanin, einem Stück Bakterienzellwand, analysiert und quantifiziert wurden^[48, 49].

6. Design von Inhibitoren mit hoher Affinität und Selektivität

Welche Möglichkeiten gibt es, Wirkstoffe mit hoher Affinität und Selektivität zu entwickeln, also solche, die in stöchiometrischer oder substöchiometrischer Menge dosiert werden können? Beispiele für Substanzgruppen, bei denen das Verhältnis

Tabelle 1. Für die Chemotherapie interessante Prinzipien der Enzymhemmung.

Inhibitortyp	Prinzip	Beispiele
Polycyclische Verbindungen mit aromatischen fünf- und sechsgliedrigen Ringen (siehe Abschnitt 5.1 und 5.2 sowie Anhang)	Wegen der geringen Zahl an Einfachbindungen mit freier Drehbarkeit beim Liganden ist der Entropieaufwand bei der Komplexbildung niedriger. Zudem sind starre Verbindungen stabil gegenüber dem Abbau durch hydrolytische Enzyme [48, 49].	– Prinzip vieler Naturstoffe (Antibiotica, Alkaloide, Pheromone) – Kompetitive Hemmung der TR durch Mepacrin [31] und tricyclische Antidepressiva [46a] – Hemmung der GR durch Flavinanaloge [47]
Langsam dissozzierende Liganden (siehe Abschnitt 6.1)	K_{diss} (als Quotient der Halbwertszeiten der Komplexbildung und der des Komplexzerfalls) sollte $< 10^{-8}$ s sein. Bei $t_{1/2} > 100$ ms für die Komplexbildung ist der Komplex, in biologischen Zeiträumen gesehen, unendlich lange stabil [52].	– Halbwertszeit des physiologischen GR-FAD-Komplexes > 1 Monat – Kinetische Stabilisierung durch langsame Konformationsänderung [4] des Guanidinoglykal-Sialidase-Komplexes (Therapie der Grippe)
Substratanaloga (siehe Abschnitt 6.1)	Computergestützte Sondierung des aktiven Zentrums mit funktionellen Gruppen führt zu Vorschlägen für spezifische chemische Substituenten am Substrat [2, 4].	– Inaktivierung der Sialidase der Influenzaviren durch Guanidinoglykal [4, 5] – Hemmung der GR durch Dinitrophenylglutathion (Abb. 4)
Suizidinhibitoren (siehe Abschnitt 6.1)	Ein Substratanalogon wird vom Enzym zu einem reaktiven Intermediat umgesetzt, das das Enzym irreversibel hemmt [52].	– Difluormethylornithin 2 als Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase (Chemotherapie der Afrikanischen Schlafkrankheit) – Allopurinol als Inhibitor der Xanthinoxidase (Chemoprävention der Gicht)
Synkatalytische Inhibitoren (siehe Abschnitt 6.1)	Eine erst im Laufe des katalytischen Zyklus exponierte reaktive Gruppe des Enzyms wird durch den Inhibitor modifiziert.	– Kovalente Modifikation des Cys58 der GR durch BCNU (Chemotherapie von Tumoren und der Malaria) und des Cys52 der TR [29, 35]
Sabotageinhibitoren (siehe Abschnitt 6.1)	Der Ligand hemmt die physiologische Reaktion des Enzyms und fördert eine unerwünschte Nebenreaktion.	– Induktion einer Oxidaseaktivität der GR durch das Herbizid Paraquat (Methylviologen; 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid) [13a] – Induktion einer Oxidaseaktivität der TR durch GH 8693, eine trypanozide Substanz [29, 55b] (siehe Schema 3)
Ligandenchimären (siehe Abschnitt 6.2)	Zwei Liganden des Enzyms werden durch ein geeignetes Verbindungsstück verbrückt, das anhand der bekannten Proteinstruktur maßgeschneidert wird. K_{diss} der Ligandenchimäre entspricht dem Produkt der einzelnen Dissoziationskonstanten.	– Spezifische Hemmung der Adenylatkinase durch Diadenosinpentaphosphat 5, eine Substanz, bei der die Substrate ATP und AMP durch ein zusätzliches Phosphat verbrückt sind [55a] – Affinitätsmarkierung der Glutathion-Synthetase durch Adenosin-5'-polyphospho-5'-pyridoxale [56] [a]
Peptidmimetica (siehe Abschnitt 6.3)	In der Paßform fixierte Peptidanaloga hemmen die physiologische Enzym-Peptid-Wechselwirkung. Peptide und Peptidanaloga verhindern intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen eines Proteins. Dies kann zur Destabilisierung und zum intrazellulären Abbau des Proteins führen [59].	– Inaktivierung der Angiotensin-Convertase (ACE) durch Captopril (Chemotherapie des Bluthochdrucks, Behandlung der Herzinsuffizienz bei der Chagas-Krankheit) [3] – Hemmung der Plasmodien-Hämoglobinase durch ein Peptidmimetikum mit Antimalariawirkung [57a] – Dimerisierungsinhibitoren der Ribonucleotid-Reduktase des Herpes-simplex-Virus [58] und der Human-GR [59] – Assoziationsinhibitoren eines Proteinensembles, das zellbiologische Signale amplifiziert [60]

[a] Das Prinzip der Verbindung zweier Molekülgruppen durch eine an der Proteinstruktur modellierte Brücke wurde auch bei der Stabilisierung der Quartärstruktur des Hämoglobins angewendet [57b]. Dies war ein entscheidender Schritt auf dem Wege zur Entwicklung von Blutersatzmitteln.

von Wirkstoff zu Zielmolekül nahe 1 oder sogar < 1 sein kann, sind in Tabelle 1 aufgeführt und sollen im folgenden diskutiert werden.

6.1. Substrate als Leitsubstanzen

6.1.1. Reversibel bindende Inhibitoren

Typische Beispiele für Inhibitoren, die Substratanaloga sind, sind das Antimalariamittel Pyrimethamin, das mit $K_{\text{diss}} = 10^{-10}$ M an Dihydrofolat-Reduktase aus *P. falciparum*^[52] bindet, oder das Guanidinoglycal, der durch Drug-Design entwickelte Inhibitor der Influenzavirus-Sialidase^[4, 5]. Bei der Entwicklung solcher reversibel bindender Inhibitoren ist das Massenwirkungsgesetz für die Bindung des Liganden L an den Rezeptor R von Bedeutung. Aus Gleichung (g) folgt, daß K_{diss} die Konzentration an freiem Liganden ist, bei der RL und R in gleicher Konzentration vorliegen.

$$K_{\text{diss}} = [R][L]/[RL] = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}} \quad (\text{g})$$

Bei $[L] = 100 \cdot K_{\text{diss}}$ ist das Enzym also zu $> 99\%$ gehemmt^[*]. Beim Drug-Design sind Inhibitoren mit $K_{\text{diss}} < 10^{-8}$ M zu modellieren; andernfalls müßte $[L]$ zur Aufrechterhaltung des inaktiven Komplexes sehr hoch sein, was zu ungünstiger Dosierung, rascher Ausscheidung oder unerwünschten Nebenwirkungen von L führen könnte. Für die Behandlung von Infektionskrankheiten sind darüber hinaus langsam dissoziierende Liganden erwünscht, um ein einmal komplexiertes Enzymmolekül für „immer“ auszuschalten.

Kinetisch stabil ist ein RL-Komplex, wenn die Dissoziationskonstante k_{diss} klein ist; k_{diss} -Werte von $< 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ entsprechen einer Halbwertszeit des RL-Komplexes von > 18 Stunden. Sowohl bei synthetischen Liganden^[4] als auch bei physiologisch bedeutsamen Liganden (FAD als prosthetische Gruppe der GR; spezifische Peptidanaloga als Inhibitoren von Proteasen) ist oft der Komplexbildung eine langsame Konformationsänderung $RL \rightarrow R^*L^*$ nachgeschaltet. Dadurch wird die Halbwertszeit des Komplexes extrem lang (Tage bis Monate), und der Komplex kann somit in biologisch sinnvoller Zeit nicht mehr zerfallen. Zu beachten ist natürlich, daß von überlebenden Zellen das Zielenzym R nachproduziert wird.

6.1.2. Suizidinhibitoren

Eine Variation dieses Themas ist die Möglichkeit, daß ein Substratanalog im aktiven Zentrum des Enzyms zu einem Produkt umgesetzt wird, das einen extrem langlebigen Komplex mit dem Enzym bildet oder das aktive Zentrum kovalent blockiert. Bekannte Beispiele für Suizidinhibitoren, deren Produkt eine essentielle Gruppe des Zielenzyms kovalent modifiziert, sind das gegen die Schlafkrankheit eingesetzte Difluormethylornithin 2

als Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase von *Trypanosoma brucei gambiense* (siehe Schema 2) und die antivirale Substanz Fluoruracil, ein kovalent bindender Suizidinhibitor der Thymidylat-Synthase^[52].

6.1.3. Synkatalytische Hemmung

Das Prinzip dieser Hemmung ähnelt dem der Suizidinhibitoren, da nur das tatsächlich aktive, nicht aber das ruhende Enzym gehemmt wird. Die GR, aber auch die TR werden durch das Cytostaticum 1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (BCNU, Carmustin) gehemmt. Dies gilt aber nicht für die normalerweise in vitro vorliegende oxidierte Form des Enzyms E_{ox} , sondern nur für die reduzierte, EH_2 (Abb. 2): In statu nascendi reagiert die Thiolatgruppe von Cys58 mit Chlorethylisocyanat, einem Zerfallsprodukt des BCNU, zum Chlorethylcarbamoyl-ester. Die Röntgenstrukturanalyse des kovalent gehemmten Enzyms ergab, daß die Carbamoylgruppe – fixiert durch Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen perfekt in das Bindungszentrum eingepaßt ist^[53]. Es wäre interessant zu prüfen, wie stark der Carbamoyl-ester durch die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor stabilisiert wird. Für eine solche Stabilisierung spricht, daß bei niedermolekularen Thiolverbindungen die Carbamoylierung teilweise reversibel ist^[53].

BCNU und der besser verträgliche 1-(2-Chlorethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosoharnstoff (HeCNU) sind in Zellkulturen und im Tierversuch wirksame Antimalariamittel. HeCNU führt dabei nicht zur Carbamoylierung, sondern zur Alkylierung von Cys58 der GR^[11]. Auffällig ist, daß mit BCNU behandelte Patienten gegen zahlreiche andere Infektionskrankheiten, nicht aber gegen Malaria, anfällig sind.

Unsere Bemühungen richten sich auf die Modellierung von carbamoylierenden Substanzen, die die aktiven Zentren der Human-GR, der TR sowie der Liponamid-Dehydrogenase von *T. cruzi*, einem der TR und der GR mechanistisch verwandten Enzym, unterscheiden können^[31].

6.1.4. Paradox bindende Substratanaloga

Nimmt man Substrate als Leitsubstanzen für das Inhibitor-Design, so ist zu beachten, daß nicht alle Atomgruppen des Substrats dieselbe Bedeutung für die molekulare Erkennung haben^[51]. Gerade bei Substanzen mit großem Konformationsraum kommt es vor, daß nur wenige markante Gruppierungen mit hoher Affinität an das Enzym gebunden werden, im übrigen aber nicht alle Rotoren bei der Komplexbildung fixiert werden. Unter diesem Aspekt ist der Ansatz von Goodford^[2], Bindungszentren eines Rezeptors beispielsweise mit NH_3^+ -Gruppen oder mit Carboxylatgruppen statt mit vollständigen Liganden zu sondieren, besonders erfolgreich.

Als Beispiel für die unerwartete Bindung eines Substratanalogons an ein Enzym soll das 2,4-Dinitrophenylglutathion (DNPG) als Inhibitor der GR beschrieben werden^[36] (Abb. 4). DNPG entsteht in der Leber aus 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol durch Konjugatbildung mit Glutathion. Es wird an der Glutathion-Bindungsstelle im aktiven Zentrum der GR fixiert, wobei der Glutathionteil des Konjugates nicht wie eines der beiden Glutathionreste des GSSG bindet, sondern nur der γ -Glutamylrest des DNPG die erwartete Position einnimmt (Abb. 4b). Dies

[*] In diesem Zusammenhang ist das Volumen von Zellen interessant: Das Bakterium *Escherichia coli* hat ein Volumen von 10^{-15} L, der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* von etwa 10^{-14} L und ein menschlicher Erythrocyt von 10^{-13} L. Ist $K_{\text{diss}} = 10^{-11}$ M, so wären nach dem Massenwirkungsgesetz in der Bakterienzelle nur 0.6 freie Ligandenmoleküle, im Plasmodium 6 und im Erythrocyten 60 Ligandenmoleküle notwendig, um ein Enzym zu 99% zu hemmen. Zu bedenken ist weiterhin, daß viele Enzyme nur in wenigen Exemplaren pro Zelle vorliegen. Deshalb wird diskutiert, ob bei so kleinen Zahlen das Massenwirkungsgesetz anwendbar ist. Von dem hier interessierenden Enzym Glutathion-Reduktase kommen allerdings etwa 10000 Exemplare in jedem Erythrocyten vor. Die TR in Trypanosomen ist sogar 10mal höher konzentriert.

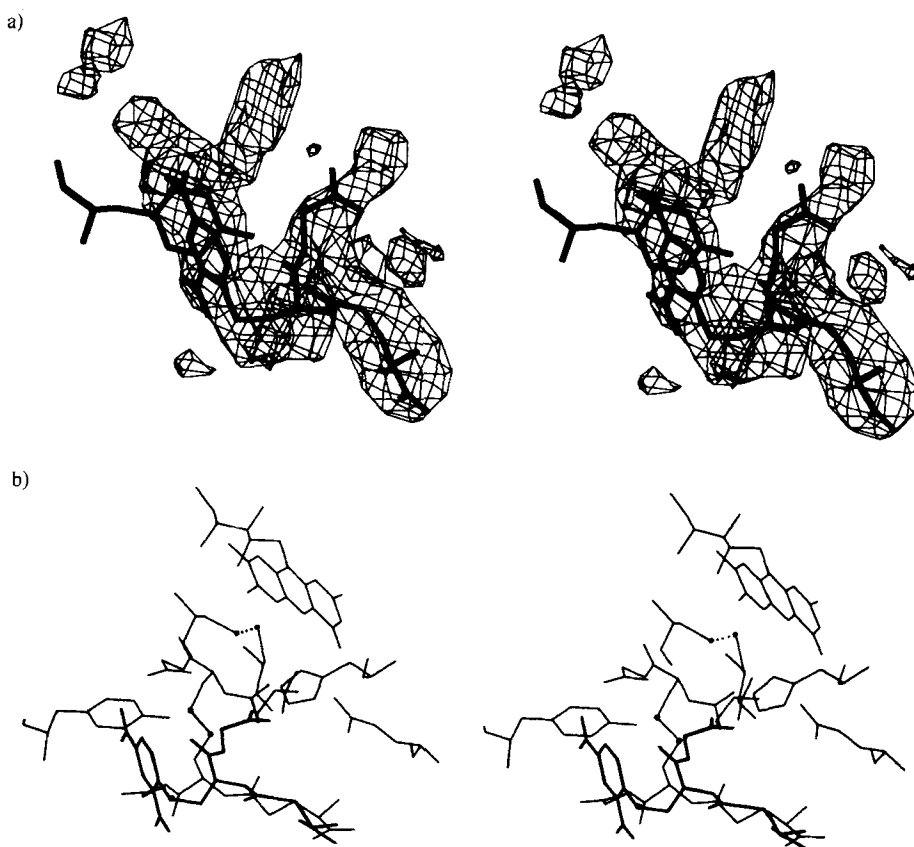


Abb. 4. a) Stereobild der Bindung von 2,4-Dinitrophenylglutathion (DNPG) an der GSSG-Bindungsstelle der Glutathion-Reduktase [36]. Die Differenzelektronendichten sind in Vogelkfig-Darstellung gegeben. Tyr114 ist in seiner ursprünglichen Position eingezeichnet. Bei Bindung des DNPG rotiert die Seitenkette des Tyr114 um die C α -C β -Bindung. Die positive Elektronendichte, die durch diese Bewegung entsteht, erscheint oberhalb von und hinter dem Tyrosinring. Der γ -Glutamylteil des DNP-Glutathions mit der für ein Peptid ungewöhnlichen freien α -L-Aminosuregruppe befindet sich rechts unten. b) Vergleich der GSSG- und der DNPG-Bindung (Stereodarstellung). Das DNPG (mit dem γ -Glutamylteil rechts unten) ist fett markiert. Die restlichen, dünner gezeichneten Strukturen repräsentieren Ausschnitte der Glutathion-Reduktase mit gebundenem GSSG. Man kann sich am besten anhand Abb. 2 sowie der Schwefelatome (kleine schwarze Kreise) orientieren. Dargestellt sind Tyr114 (links außen), das redoxaktive Dithiol Cys58-Cys63, His467, Glu472 und der Riboflavinrest des FAD. Beim Vergleich der Bindung von GSSG mit der von DNPG fällt auf, daß nur die γ -Glutamylgruppen – gehalten durch Lys67 und Glu473 – berlappen. Die Position des Schwefelatoms im DNPG macht den Unterschied zur Bindung von GSSG besonders deutlich. Wäre die Struktur des GR-Inhibitor-Komplexes vor der des Enzym-Substrat-Komplexes aufgeklärt worden, hätten wir wahrscheinlich eine falsche Vorhersage für die Bindung des Substrats gemacht.

ist im nachhinein nicht uberraschend, da der γ -Glutamylrest jenen charakteristischen Teil des Glutathionmolekls enthält, der bei anderen Peptiden nicht vorkommt: eine negativ geladene Carboxylat- und eine positiv geladene Ammoniumgruppe in einer starren sterischen Anordnung.

Die Groblokalisierung der Glutathioneinheit des DNPG wird also vom Nichtglutathionteil des Moleküls bestimmt. Es ist deshalb zu erwarten, daß die Bindungsweisen und Affinitäten bei Glutathion-Derivaten stark variieren. In einer kristallographischen Studie haben Janes und Schulz^[54b] gezeigt, daß die wenig präzise Bindung von Substratanaloga an GR ein biologisch sinnvoller molekularer Mechanismus ist, der die chemische Umsetzung nichtphysiologischer Substrate verhindert. Die γ -Glutamylgruppe ist mit ihrer α -Aminosuregruppierung also das Charakteristicum des Glutathions und ein vielversprechendes Leitmotiv für die Modellierung von Inhibitoren glutathionabhngiger Enzyme.

6.1.5. Sabotageinhibitoren

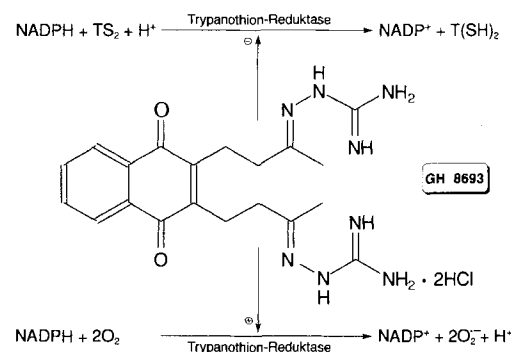
Besonders starke Wirkungen auf den Redoxmetabolismus der Zelle sind von GH 8693 und anderen „Sabotageinhibitoren“ der Disulfid-Reduktasen zu erwarten. Der Begriff^[11, 29] ist in Tabelle 1 und Schema 3 erläutert. GH 8693 bindet wahrscheinlich an NADPH-reduzierte Trypanothion-Reduktase und überträgt anschließend die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, so daß zwei Superoxidradikale entstehen. Bilanzmäßig wird also ein antioxidatives zu einem prooxidativen Enzym umfunktioniert.

Die Wirkungen eines Sabotageinhibitors auf den intrazellulären Metabolismus sind vielfältig: NADPH und O $_2$ werden ver-

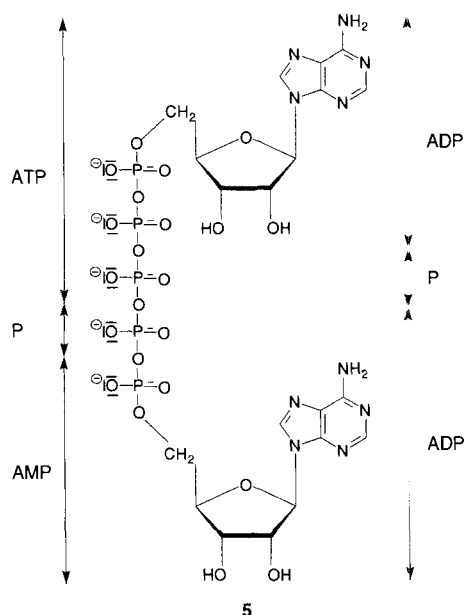
geudet, der Thiol/Disulfid-Quotient wird vermindert und die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies können Lipidperoxidation und andere Kettenreaktionen auslösen. Demnach ist verständlich, daß Sabotageinhibitoren als potentielle Chemotherapeutica gegen parasitäre Erkrankungen besonders aktuell sind^[31].

6.2. Ligandenchimären

Fast jedes Protein bindet an räumlich getrennten Zentren sehr unterschiedliche Substanzen. Diese Liganden lassen sich durch Verbindungsstücke verbrücken, die anhand der Struktur des



Schema 3. Die trypanozide Substanz GH 8693 als Sabotageinhibitor der Trypanothion-Reduktase. GH 8693 [55 b] wirkt in mikromolaren Konzentrationen als Inhibitor der Trypanothion-Reduktase [29] (obere Gleichung, Inhibierungskonstante $K_i = 1 \mu\text{M}$). Bei höheren Konzentrationen an GH 8693 katalysiert die Trypanothion-Reduktase die Reduktion von O $_2$ zum Superoxidradikal (untere Gleichung, Michaelis-Konstante $K_m = 15 \mu\text{M}$). Die Bindung von GH 8693 verkehrt also die antioxidative Funktion des Enzyms in eine prooxidative Aktivität – daher die Bezeichnungen Sabotageinhibitor [11, 29] oder subversives Substrat [55 b].



Rezeptors hinsichtlich ihrer Länge und nach chemischen Kriterien maßgeschneidert sein müssen. Diese Molekülmodellierung am Rezeptor führt zu Ligandenchimären mit hoher Affinität zum Rezeptor^[55a, 56]. In Tabelle 1 ist als Beispiel Diadenosinpentaphosphat **5**, ein Disubstratanalogon der Adenylat-Kinase ($\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2\text{ADP}$), aufgeführt. Bei der GR und der TR sind in Anbetracht der vielen bekannten Liganden – Substrate, Cofaktoren und Inhibitoren – zahlreiche Kombinationen möglich. Von Interesse ist beispielsweise eine Chimäre, die einen Tricyclus (siehe Abschnitt 5.1) und einen Sabotageinhibitor (siehe Abschnitt 6.1) im angemessenen Abstand enthält.

Zu beachten ist auch hier die kinetische Stabilität der Enzym-Liganden-Komplexe (Tabelle 1, 2. Absatz). Beim Diadenosinpentaphosphat-Adenylat-Kinase-Komplex beträgt die Halbwertszeit der Dissoziation nur etwa 1 s. Das Diadenosinpentaphosphat ist also für die diagnostische oder für die Notfallmedizin besser geeignet als für die längerfristige Chemotherapie von Infektionskrankheiten.

6.3. Blockierung der Proteinfaltung und -organisation durch katalytisch wirkende Peptidmimetica

Viele Proteine von Pathogenen – beispielsweise die Trypanotrypan-Reduktase aus *T. cruzi*^[42], die Enzyme der AIDS-Viren und die Ribonucleotid-Reduktase des Herpes-simplex-Virus^[58] – sind obligatorische Dimere; jede Untereinheit für sich ist nicht aktiv. Da Substanzen, die Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinträchtigen, hochspezifische Inhibitoren sind, sind gerade dimere Proteine von allgemeinem Interesse als Zielmoleküle für Pharmaka.

Die Ribonucleotid-Reduktase des Herpes-simplex-Virus^[58] besteht aus einer kleinen und einer großen Untereinheit. Ein Nonapeptid, dessen Sequenz dem C-terminalen Bereich der kleinen Untereinheit entspricht, verdrängt die kleine von der großen Untereinheit, so daß die Untereinheiten getrennt werden und die Ribonucleotid-Reduktase inaktiviert wird. Im Prinzip können solche inhibitorischen Peptide sogar in substöchiometrischen Mengen, also katalytisch, wirken, da die getrennten Untereinheiten oft instabil sind und von zelleigenen Proteasen abgebaut werden. Der stabilere Kontaktflächeninhibitor kann sich dann dem nächsten Dimer zuwenden.

Die Hemmung der Dimerisierung und ihre Folgen haben wir am Beispiel der Human-Glutathion-Reduktase näher untersucht^[59]. Jede der beiden identischen Untereinheiten steuert funktionelle Gruppen zu je einem aktiven Zentrum bei. Die Kristallstruktur ergab also, daß das Monomer nicht aktiv sein kann. Außerdem hemmen Peptide, die den komplementären Kontaktflächen oder Proteinuntereinheiten entsprechen, die Bildung des aktiven Enzyms. Anhand der dreidimensionalen Struktur wurde die Stelle des Enzyms ausgewählt, an der die beiden Untereinheiten den engsten Kontakt bilden (Abb. 5). Es

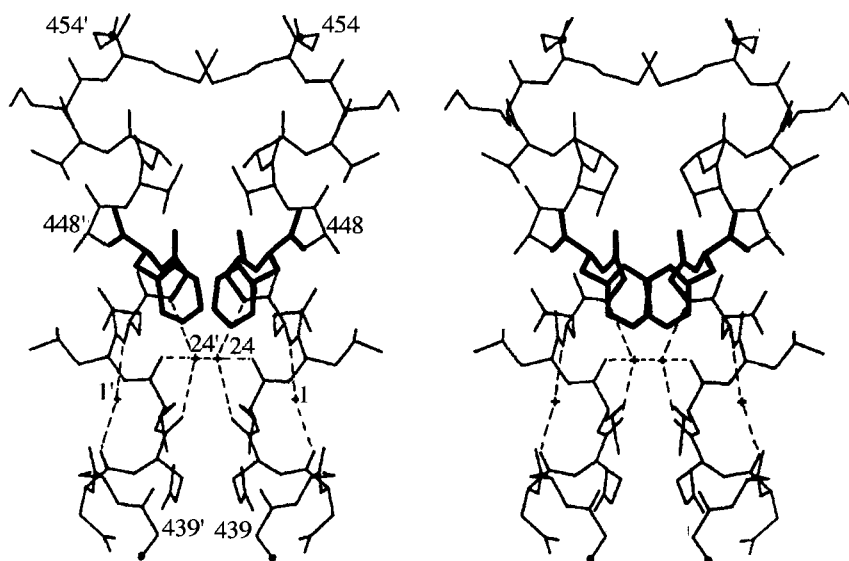


Abb. 5. Stereobild des Bereichs mit dem engsten Kontakt zwischen den Untereinheiten der Glutathion-Reduktase. Gezeigt sind die Helices 439–454 und 439'–454' mit den fett markierten Aminosäureresten Gly446 und Phe447 bzw. 446' und 447' in der Mitte. Bei Mutageneseexperimenten führte bereits der jeweilige Austausch von Gly446 und Gly446' gegen Glu zu einer ungeordneten inaktiven GR-Mutante, die intrazellulär rasch abgebaut wird [59]. Ein Peptidanalogen, das den Kontakt der Untereinheiten an dieser Stelle hindert, hätte wahrscheinlich denselben Effekt wie die Mutation und könnte in katalytischen Mengen als Inhibitor der intrazellulären Glutathion-Reduktase wirken.

handelt sich um die parallel laufenden Helices 439–454 und 439'–454'^[33]. Durch gezielte Mutagenese (Gly446, Gly446' → Glu, Glu) wurden an gegenüberliegenden Stellen der Kontaktfläche die kleinsten Seitenketten (jeweils H-Atome des Glycins) durch sperrige negativ geladene Reste ersetzt^[59]. Dadurch wurde aber nicht nur die Bildung von Dimeren verhindert, sondern jedes Monomer verhielt sich nach physikochemischen Kriterien wie eine ungeordnete Polypeptidkette; in keiner der vier Domänen waren Strukturelemente nachweisbar. Die biologische Stabilität des mutierten Proteins wurde in Bakterienzellen untersucht. Während normale Human-Glutathion-

Reduktase über viele Stunden stabil und aktiv bleibt, wird das mutierte Protein innerhalb von Minuten quantitativ abgebaut.

Als ersten Schritt zur Entwicklung von Dimerisierungsinhibitoren der GR planen wir, Analoga des Peptids 439–454 zu synthetisieren und in der nativen Konformation, einer leicht deformierten α -Helix, zu fixieren (Abb. 5). Prinzipien und Methoden der Synthese stabiler Peptidmimetica sind in einer Monographie von Wieland^[61] und in einer exemplarischen Arbeit von Struthers et al.^[62] sowie in neueren Übersichtsartikeln^[63–65] zusammengefaßt.

Die Dimerisierung von Proteinen kann einerseits als Sonderfall des Proteinfaltungsprozesses und andererseits als Beispiel für den Aufbau von oligomeren Proteinen betrachtet werden. Die Entwicklung von Peptidmimetica ist demnach ein besonders vielversprechender Ansatz des Drug-Designs; denn mit solchen Substanzen lassen sich sowohl Faltungsprozesse als auch Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen. Da Peptidmimetica in der Regel zur Destabilisierung des Zielproteins führen, können sie in kleinsten Dosen pathophysiologische Prozesse beeinflussen.

7. Ausblick

Das Drug-Design ist nicht nur eine Ergänzung des Repertoires der pharmazeutischen Chemie. Die Auseinandersetzung mit naturgegebenen Problemen führt in vielen Details auch zu neuen Erkenntnissen der Strukturchemie und der molekularen Strukturbiochemie. Nicht zuletzt wegen ihrer Bedeutung für die Medizin gehört die hier behandelte Glutathion-Reduktase zu den am besten verstandenen^[66] und für die industrielle Anwendung vielversprechenden Enzymen^[16, 67].

Die wissenschaftliche Arbeit auf dem Gebiet der Parasiten ist nicht nur eine humanitäre Selbstverständlichkeit, sondern kann auch zur treibenden Kraft des Fortschritts werden, da nur ein interdisziplinärer Ansatz zum Verständnis und zur Beherrschung dieser geheimnisvollen Erreger führen wird. In den Industrienationen sind die großen parasitären Erkrankungen zu Unrecht vergessen. Es geht nicht nur um die sekundären Infektionen durch intrazelluläre Parasiten als Komplikation bei AIDS. Auch andere Probleme unserer Gesellschaft – Allergien, Kreislauf- und Krebserkrankungen, Erbkrankheiten sowie die Frage nach einer menschengerechten Umwelt – sollten vor dem Hintergrund der uralten naturgegebenen Situation des Menschen, der Auseinandersetzung mit Parasiten und mit Entbehrungen aller Art, gesehen werden^[6, 7].

Anhang: Zur Stabilität eines Protein-Liganden-Komplexes

Für die Gibbs-Energie der Bindung des Liganden an ein Makromolekül gilt die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (h), wobei sich

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (h)$$

ΔG aus zahlreichen negativen (= günstigen) und positiven (= ungünstigen) Teilbeiträgen zusammensetzt. Nach dem heutigen Wissensstand ist es nicht möglich, die Gibbs-Energie für biologisch oder pharmakologisch interessante Wechselwirkun-

gen mit hinreichender Genauigkeit zu berechnen. Die folgenden Überlegungen^[48–51, 68–72] sind aber nützlich, wenn man ΔG_0 für eine Leitsubstanz kennt und jeweils nur eine chemische Gruppierung dieses Liganden ändern möchte. Nach der Gleichung (i) bedeutet eine ΔG_0 -Änderung von 5.7 kJ mol^{-1}

$$\Delta G_0 = 2.3 RT \lg K_{\text{diss}} \quad (i)$$

eine Änderung der Inhibitorkonstanten K_{diss} von 10. Die Fixierung eines Bindungsrotors des Liganden in der richtigen Konformation – z.B. durch Einführung einer Doppelbindung^[70] – kann zu einer Abnahme (= Verbesserung) der Inhibitorkonstanten um den Faktor 10 führen [siehe c)]. Im einzelnen muß man folgende Terme berücksichtigen; die Werte beziehen sich jeweils auf 300 K.

a) ΔG_{R+T} , der globale Entropieverlust bei der bimolekularen Assoziation: Ligand und Makromolekül, jeweils als starre Körper betrachtet, verlieren bei der Komplexbildung Entropie der Translation und der Rotation. ΔG_{R+T} ist ungünstig und läßt sich nach Gleichung (j) abschätzen^[70]; wobei M die relative Molekülmasse des Liganden ist.

$$\Delta G_{R+T} = (20 \lg M_r + 10) \text{ kJ mol}^{-1} \quad (j)$$

b) ΔG_h , bestimmt durch Entropiegewinn des Wassers (hydrophober Effekt): Kohlenwasserstoffgruppierungen werden häufig bei der Komplexbildung dem Kontakt mit Wasser entzogen. ΔG_h ist negativ (günstig) und beträgt etwa -20 kJ mol^{-1} pro nm^2 hydrophober Fläche^[49, 71]. Schwer bestimmbar ist der Entropiegewinn von Wassermolekülen, die bei der Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ligand und Protein an den Brückenköpfen freigesetzt werden und jetzt freizügig mit dem umgebenden Wasser in Wechselwirkung treten können (vgl. dazu zwei kontroverse Arbeiten^[49, 70] von Williams).

c) ΔG_r , der Entropieverlust bei Arretierung von Bindungsrotoren: Bei der Komplexbildung werden Bindungsrotoren arretiert, d. h. die Drehbarkeit um Einfachbindungen wird eingeschränkt. Pro Rotor beträgt der Aufwand an freier Energie ΔG_r zwischen 3.5 und 6 kJ mol^{-1} ^[49, 70]. Eine für die Pharmakologie und Toxikologie bedeutsame Tatsache ist, daß bei der Bindung aromatischer Liganden keine Bindungsrotoren des Liganden fixiert werden müssen.

d) ΔG_i , die freie Energie der Wechselwirkung zwischen komplementären Gruppen: ΔG_i bezieht sich auf die Situation, daß Ligand und Protein bereits in die richtige Position für die Bildung nichtkovalenter Bindungen gebracht sind. ΔG_i ist also eine Art intrinsische Bindungsenergie, nachdem andere Parameter herausfaktoriert sind. Bei der Erkennung sind die Moleküloberflächen komplementär, das heißt es treten günstige nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen ihnen auf. Bei Komplementarität und damit selektiver Bindung sind je zwei Partner auf den beiden Seiten der Kontaktflächen entweder zwei Dipole, zwei elektrisch entgegengesetzt geladene Gruppen oder zwei apolare Gruppen. Die Dipole bilden dann meist Wasserstoffbrückenbindungen, die elektrischen Ladungen Salzbrücken, und apolare Partner werden durch Dispersionskräfte zusammengehalten. Die ΔG_i -Werte (-2 bis -20 kJ mol^{-1} für H-Brückenbindungen, bis zu -30 kJ mol^{-1} für Salzbrücken

und -0.1 kJ mol^{-1} für ein Paar apolarer Partneratome^[50, 70, 71] sind durch das Coulomb-Gesetz bestimmt. Sie hängen somit auch von der relativen Orientierung der Partner sowie der mikroskopischen Dielektrizitätskonstanten ϵ ab, die in der Regel nicht bekannt ist. Für das Protein-Innere ist ϵ beispielsweise 10- bis 20mal kleiner als für Wasser. Zur Verbesserung der Polarisierung einer chemischen Gruppierung ist es oft günstig, Metall-Ionen als Partner auf der komplementären Oberfläche anzubieten. Dieses Prinzip ist in der Natur bei der Bindung von O_2 durch Hämoglobin-Eisen oder bei der Fixierung der Methylgruppe des Ethanols durch das Zink-Ion der Alkoholdehydrogenase verwirklicht^[70].

e) ΔG_{vaw} , die Änderung der van-der-Waals-Energien: Berücksichtigen muß man auch die Änderung der van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie^[50] bei der Komplexbildung. Dabei ist zu beachten, daß anziehende Kräfte schwach und abstoßende Kräfte sehr stark sind, so daß schon durch einen ungünstigen van-der-Waals-Kontakt eine im übrigen günstige Komplexbildung verhindert werden kann.

f) ΔG_{conf} , die Konformationsenergie: Schließlich ist zu beachten, daß der Rezeptor sich vor oder nach der Bindung des Liganden in einer ungünstigen Konformation befinden kann, in der Bindungswinkel oder Bindungsabstände unter Spannung stehen. Es sind auch biologisch wichtige Assoziationen bekannt, bei denen der molekularen Erkennung eine langsame Konformationsänderung des Komplexes nachgeschaltet ist^[4, 52]. Solche kinetisch stabilisierten Komplexe sind – in biologischen Zeiträumen betrachtet – irreversibel (siehe auch Abschnitt 6.1).

Die Faktorisierung der Bindungsenergie in die unter a) bis f) beschriebenen Beiträge hat sich bewährt, vor allem weil so erkennbar wird, wie groß die Fehlermöglichkeiten bei der Abschätzung bimolekularer oder intramolekularer Wechselwirkungen sind. Allerdings ändert sich beim Vergleich von zwei Liganden für einen Rezeptor oft nur einer der Parameter. Zu beachten ist, daß man bei der Buchführung Energieposten nicht doppelt zählt. Eine besondere Schwierigkeit sind auch Wassermoleküle, die spezifisch an das Protein gebunden sind. In der Glutathionreduktase gibt es mehr als 100 solcher Moleküle, von denen einige so stark fixiert sind, daß sie mit dem umgebenden Wasser nicht austauschen^[33]. Bei der Analyse des Glutathionreduktase-GSSG-Komplexes ergaben sich 10 unmittelbare und 14 durch Wassermoleküle vermittelte Kontakte zwischen dem Enzym und seinem Substrat^[54a]. Ohne Berücksichtigung dieser Wassermoleküle ist das Andocken des Liganden an den Rezeptor unberechenbar und ein ab-initio-Design substratanaloger Liganden nicht möglich. Auch bei der Genregulation durch Proteine sind Wassermoleküle funktionell beteiligt; H_2O -Addukte an DNA-Basen können sogar die entscheidenden stereospezifischen Erkennungsstrukturen sein^[75]. Die intrinsische Bindungsenergie zwischen zwei Partnern ist nur in wenigen Fällen bekannt. Salzbrücken haben eine hohe intrinsische, aber oft eine geringe tatsächliche Stabilisierungsenergie. Diese Diskrepanz beruht darauf, daß zahlreiche Rotoren arretiert und adjustiert werden müssen [vgl. c)], bevor die ionischen Gruppen in Salzbrückenabstand (= H-Brückenbindungsabstand) zueinander stehen^[72].

Molekulare Erkennung hat somit noch nicht den Status einer Wissenschaft erreicht, d. h. sie ist in der Regel nicht in der Lage, verlässliche Vorhersagen zu machen. Neue Ansätze, beispiels-

weise die problemgerechte Anwendung genetischer Algorithmen^[73, 74], sind daher dringend erforderlich.

Die Kolleginnen und Kollegen, denen wir herzlich danken möchten, sind als Autoren im Literaturverzeichnis aufgeführt. Stellvertretend für alle seien Herr Dr. K.-D. Hungerer, Behringwerke Marburg, Frau Irene König, Heidelberg, und Herr Prof. Dr. K. Lingelbach, Hamburg, namentlich genannt. Frau Helga Alt war maßgeblich an der Erstellung des Manuskripts beteiligt. Gefördert werden unsere Arbeiten von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, vom Fonds der Chemischen Industrie und vom Bundesministerium für Forschung und Technologie.

Eingegangen am 20. September 1993 [A 27]

- [1] W. G. J. Hol, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 765–777; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 767–778.
- [2] P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 849–857.
- [3] D. W. Cushman, H. S. Cheung, E. F. Sabo, M. A. Ondetti, *Biochemistry* **1977**, 16, 5484–5491.
- [4] M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Nature (London)* **1993**, 363, 418–423.
- [5] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1762–1764; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1691–1693.
- [6] a) H. M. Gilles, D. A. Warrell, *Bruce-Chwatt's Essential Malariaology*, 3. Aufl., Edward Arnold, London, **1993**; b) D. J. Wyler, *N. Engl. J. Med.* **1992**, 327, 1519–1521.
- [7] R. H. Schirmer, K. Becker, *Futura* **1993**, 4, 15–21.
- [8] a) D. R. Brewster, D. Kwiatkowski, N. J. White, *Lancet* **1990**, 336, 1039–1043; b) M. V. Valero, L. R. Amador, C. Galindo, J. Figueroa, M. S. Bello, L. A. Murillo, A. L. Mora, G. Patarroyo, C. L. Rocha, M. Rojas, J. J. Aponte, L. E. Sarmiento, D. M. Lozada, C. G. Coronell, N. M. Ortega, J. E. Rosas, P. L. Alonso, M. E. Patarroyo, *ibid.* **1993**, 341, 705–710; c) A. F. G. Slater, A. Cerami, *Nature (London)* **1992**, 355, 167–169.
- [9] a) R. Docampo, S. N. J. Moreno, *Rev. Infect. Dis.* **1984**, 6, 223–238; b) X. D. Luo, C. C. Shen, *Med. Res. Rev.* **1987**, 7, 29–52. Qinghaosu wird ausgesprochen als würde es auf englisch ching-how-sue geschrieben. Dies entspricht dem seit 1975 offiziellen Pinyin-System der Transliteration.
- [10] N. H. Hunt, R. Stocker, *Blood Cells* **1990**, 16, 499–530.
- [11] R. H. Schirmer, T. Schöllhammer, G. Eisenbrand, R. L. Krauth-Siegel, *Free Rad. Res. Commun.* **1987**, 3, 3–12.
- [12] a) H. Sies, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 1061–1075; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 1058–1070; b) B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, C. E. Cross, *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, 119, 598–620; c) J. G. Müller, U. S. Bücheler, K. Kayser, R. H. Schirmer, D. Werner, R. L. Krauth-Siegel, *Cell. Mol. Biol.* **1993**, 39, 389–396; d) F. Haber, J. Weiss, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1934**, 147, 332; e) K. Becker, M. Gui, A. Traxler, C. Kirsten, R. H. Schirmer, *Histochem.* **1994**, 102, 389–396.
- [13] a) R. Richmond, B. Halliwell, *J. Inorg. Biochem.* **1982**, 17, 95–107; b) B. Bayer, A. Diekmann, K.-G. Fritsch, R. Kientsch, D. von Cunow, D. T. Spira, R. H. Schirmer, A. Wendel, A. Jung, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1984**, 365, 965.
- [14] a) T. Vulliamy, P. Mason, L. Luzzatto, *Trends Genet.* **1992**, 8, 138–143; b) M. Chevion, T. Novak, G. Glaser, J. Mager, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 127, 405–409.
- [15] a) H. Atamni, H. Ginsburg, *Molec. Biochem. Parasitol.* **1993**, 61, 231–242; b) C. W. Wright, I. D. Phillipsen, G. C. Kirby, D. C. Warhurst, M. A. Huffman, W. Ohigashi, *Proc. 5th Malaria Meeting (Oxford)* **1993**, 22.
- [16] R. H. Schirmer, R. L. Krauth-Siegel, G. E. Schulz in *Glutathione, Part A* (Hrsg.: D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic), Wiley, New York, **1989**, S. 553–596.
- [17] Y. Zhang, E. Hempelmann, R. H. Schirmer, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 855–860.
- [18] A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 3672–3678.
- [19] a) C. H. Williams, Jr. in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, Vol. III* (Hrsg.: F. Müller), CRC, Boca Raton, FL, **1992**, S. 121–211; b) T. Ishikawa, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 463–468.
- [20] R. H. Schirmer, G. E. Schulz in *Pyridine Nucleotide Coenzymes, Part B* (Hrsg.: D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic), Wiley, New York, **1987**, S. 333–379.
- [21] A. H. Fairlamb, *Parasitology* **1989**, 99, 93–112.
- [22] A. H. Fairlamb, A. Cerami, *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, 46, 695–729.
- [23] R. L. Krauth-Siegel, R. H. Schirmer, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1989**, 37, 1026–1034.
- [24] A. H. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B. T. Chait, A. Cerami, *Science* **1985**, 227, 1485–1487.

- [25] S. L. Shames, A. H. Fairlamb, A. Cerami, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1986**, *25*, 3519–3526.
- [26] R. L. Krauth-Siegel, B. Enders, G. B. Henderson, A. H. Fairlamb, R. H. Schirmer, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *164*, 123–128.
- [27] a) E. G. S. Carnieri, S. N. J. Moreno, R. Docampo, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *61*, 79–86; b) H. S. C. Spies, D. J. Steenkamp, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 203–213.
- [28] A. H. Fairlamb, G. B. Henderson, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2607–2611.
- [29] M. C. Jockers-Scherübl, R. H. Schirmer, R. L. Krauth-Siegel, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 267–272.
- [30] T. Godal, *TDR news* (Hrsg.: World Health Organization), **1992**, *38*, 1–2.
- [31] R. L. Krauth-Siegel, H. Lohrer, U. S. Bücheler, R. H. Schirmer in *Biochemical Protozoology* (Hrsg.: G. H. Coombs, M. North), Taylor and Francis, London, **1991**, S. 493–505.
- [32] S. Kutner, W. V. Breuer, H. Ginsburg, S. B. Aley, Z. I. Cabantchik, *J. Cell. Physiol.* **1985**, *125*, 521–527.
- [33] P. A. Karplus, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 701–729.
- [34] P. A. Karplus, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1989**, *210*, 163–180.
- [35] P. A. Karplus, R. L. Krauth-Siegel, R. H. Schirmer, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *171*, 193–198.
- [36] M. Bilzer, R. L. Krauth-Siegel, R. H. Schirmer, T. P. Akerboom, H. Sies, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 373–378.
- [37] E. F. Pai, G. E. Schulz, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1752–1757.
- [38] U. S. Bücheler, D. Werner, R. H. Schirmer, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3127–3133.
- [39] J. Kuriyan, X. P. Kong, T. S. R. Krishna, R. M. Sweet, N. J. Murgolo, H. Field, A. Cerami, G. B. Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8764–8768.
- [40] a) W. N. Hunter, S. Bailey, J. Habash, S. J. Harrop, J. R. Helliwell, T. Aboagye-Kwarteng, K. Smith, A. H. Fairlamb, *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 322–333; b) S. Bailey, K. Smith, A. H. Fairlamb, W. N. Hunter, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 67–75.
- [41] F. X. Sullivan, S. B. Sobolov, M. Bradley, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2761–2767.
- [42] C. B. Lantwin, I. Schlichting, W. Kabsch, E. F. Pai, R. L. Krauth-Siegel, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1994**, *18*, 161–173.
- [43] R. L. Krauth-Siegel, E. Jacoby, C. B. Lantwin in *Flavins and Flavoproteins, Vol. 11* (Hrsg.: K. Yagi), de Gruyter, Berlin, **1993**, S. 258–268.
- [44] M. Bradley, U. S. Bücheler, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6124–6127.
- [45] G. B. Henderson, N. J. Murgolo, J. Kuriyan, K. Osapay, D. Kominos, A. Berry, N. S. Scrutton, N. W. Hinchliffe, R. N. Perham, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8769–8773.
- [46] a) T. J. Benson, J. H. McKie, J. Garforth, A. Borges, A. H. Fairlamb, K. T. Douglas, *Biochem. J.* **1992**, *286*, 9–11; b) K.-G. E. Fritsch, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1982**, *363*, 1302; c) E. M. Jacoby, I. Schlichting, R. L. Krauth-Siegel, unveröffentlicht.
- [47] a) K. Becker, R. I. Christopherson, W. B. Cowden, N. H. Hunt, R. H. Schirmer, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 59–65; b) A. Schönleben-Janasp, P. Kirsch, P. Mittl, R. H. Schirmer, R. L. Krauth-Siegel, unveröffentlicht.
- [48] D. H. Williams, J. P. L. Cox, A. J. Doig, M. Gardner, U. Gerhard, P. T. Kaye, A. R. Lal, I. A. Nicholls, C. J. Salter, R. C. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7020–7030.
- [49] D. H. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1172–1178.
- [50] G. E. Schulz, R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer, New York, **1979**.
- [51] G. E. Schulz, *Biol. Unserer Zeit* **1984**, *4*, 121–124.
- [52] C. T. Walsh in *Modern Design of Antimalarial Drugs* (Hrsg.: World Health Organization), Genf, **1982**, S. 95–109.
- [53] a) M. R. Davis, K. Kassahun, C. M. Jochheim, K. M. Brandt, T. A. Baillie, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 376–383; b) K. Becker, R. H. Schirmer, *Methods Enzymol.* **1994**, im Druck.
- [54] a) P. A. Karplus, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1989**, *210*, 163–180; b) W. Janes, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4022–4030.
- [55] a) P. Feldhaus, T. Fröhlich, R. S. Goody, M. Isakov, R. H. Schirmer, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57*, 197–204; b) G. B. Henderson, P. Ulrich, A. H. Fairlamb, J. Rosenberg, M. Pereira, M. Sela, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5374–5378.
- [56] T. Hibi, H. Kato, T. Nishioka, J. Oda, H. Yamaguchi, Y. Katsube, K. Tanizawa, T. Fukui, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1548–1554.
- [57] a) S. E. Francis, I. Y. Gluzman, A. Oksman, A. Knickerbocker, R. Mueller, M. L. Bryant, D. R. Sherman, D. G. Russell, D. E. Goldberg, *EMBO J.* **1994**, *13*, 306–317; b) T.-H. Jessen, R. Hilgenfeld, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 862–863; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 848–849.
- [58] W. McClements, G. Yamanaka, V. Garsky, H. Perry, S. Bacchetti, R. Colonna, R. B. Stein, *Virology* **1988**, *162*, 270–273.
- [59] A. Nordhoff, U. S. Bücheler, D. Werner, R. H. Schirmer, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4060–4066.
- [60] N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, J. Schlessinger, *Nature (London)* **1993**, *363*, 85–88.
- [61] T. Wieland in *Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms* (Hrsg.: T. Wieland), Springer, New York, **1986**, S. 22–100.
- [62] R. S. Struthers, G. Tanaka, S. C. Koerber, T. Solmajer, E. L. Baniak, L. M. Gierasch, W. Vale, J. River, A. T. Hagler, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1990**, *8*, 295–304.
- [63] R. Hirschi, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1305–1330; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1278.
- [64] A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244–1267.
- [65] R. A. Wiley, D. H. Rich, *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327–348.
- [66] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, Wiley, New York, **1990**, S. 382–389; *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**, S. 376–382.
- [67] I. Willner, E. Katz, A. Riklin, R. Kasher, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10965–10966.
- [68] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4046–4050.
- [69] C. N. Pace, U. Heinemann, U. Hahn, W. Saenger, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 351–369; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 343–360.
- [70] D. H. Williams, *Aldrichim. Acta* **1991**, *24*, 71–80.
- [71] L. Serrano, J. L. Neira, J. Sancho, A. R. Fersht, *Nature (London)* **1992**, *356*, 453–455.
- [72] S. Dao-pin, U. Sauer, H. Nicholson, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7142–7153.
- [73] T. Dandekar, P. Argos, *Prot. Eng.* **1992**, *5*, 637–645.
- [74] T. Dandekar, P. Argos, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 844–861.
- [75] Z. Shakked, G. Guzikovich-Guerstein, F. Frolow, D. Rabinovich, A. Joachimiak, P. B. Sigler, *Nature (London)* **1994**, *368*, 469–473.