

***In silico* Identifizierung neuartiger
Redoxenzym-Inhibitoren zur
Entwicklung von Medikamenten gegen
Parasitosen und Krebs**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Andreas Krasky

Tag der mündlichen Prüfung:

16. November 2007

Dekan:

Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. M. Selzer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Duszenko

The test of our progress is not whether we add more to the abundance of those who have much, it is whether we provide enough for those who have little.

Franklin D. Roosevelt

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Paul M. Selzer bei der Firma Intervet Innovation GmbH in Schwabenheim in Zusammenarbeit mit dem Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko und Herrn Prof. Dr. Paul M. Selzer für ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und für die interessante Themenstellung. Sie zeigten immer reges Interesse am Fortgang der Arbeit und standen mir jederzeit mit fachlichem Rat zur Seite.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Schirmer und Frau Prof. Dr. L. Krauth-Siegel (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg) möchte ich mich an dieser Stelle herzlich für die fruchtbare Zusammenarbeit, die Bestimmung der *in vitro*-Aktivitäten der Substanzen und für die aufschlussreichen fachlichen Diskussionen bedanken. Herrn Prof. Dr. G. Klebe (Institut für pharmazeutische Chemie der Universität Marburg) danke ich für das Bereitstellen der Proteinstruktur der Liponamid-Dehydrogenase von *Trypanosoma cruzi*.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Firma Intervet Innovation GmbH Schwabenheim für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Ermöglichung der Kooperationen mit der Universität Tübingen und der Universität Heidelberg.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Jörg Schröder und Herrn Dr. Andreas Rohwer bedanken, die mich während meiner Arbeit vortrefflich betreut haben und stets zu Diskussionen bereit waren. Darüber hinaus danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Gruppe *BioChemInformatics* für die tolle Arbeitsatmosphäre. Namentlich sind dies: Mathias Beig, Carsten Beyer, Jörg Cramer, Kristin Engels, Maria L. Suarez-Fernandez, Anette Klinger, Richard J. Marhöfer, Frank Oelien, Andreas Rohwer, Jörg Schröder, Hon Q. Tran und Paul M. Selzer.

Frau Liane Walther aus der Gruppe *Compound Logistics* danke ich herzlich für die technische Unterstützung bei der Vorbereitung der Substanzen, sowie für die LC/MS-Messungen.

Darüber hinaus danke ich dem Boehringer Ingelheim Fonds, sowie den Firmen Intervet Innovation GmbH und Tripos *Inc.* für die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte, den „*Fifth European Workshop in Drug Design*“ in Siena zu besuchen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin, die mich auf meinem Weg stets vorbildlich unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tropische Infektionskrankheiten	1
1.1.1	Malaria	1
1.1.1.1	Therapie der Malaria	5
1.1.2	Trypanosomiasis	8
1.1.2.1	Afrikanische Schlafkrankheit	9
1.1.2.2	Chagas-Krankheit	11
1.1.3	Leishmaniose	12
1.1.3.1	Therapie der Leishmaniose	14
1.2	Oxidativer Stress als Therapiemöglichkeit zur Bekämpfung von protozoischen Infektionskrankheiten und Krebs	15
1.2.1	Glutathion-Reduktase	16
1.2.2	Trypanothion-Reduktase	21
1.2.3	Liponamid-Dehydrogenase	24
1.3	Arzneimittelforschung gestern und heute	26
1.4	Chemoinformatik und rationales Wirkstoffdesign	27
1.4.1	Homologie-Modellierung	30
1.4.2	Pharmakophor-Analysen	33
1.4.3	<i>Docking</i>	35
1.4.4	Virtuelles <i>Screening</i>	38
1.5	Zielsetzung	40
2	Material und Methoden	42
2.1	Material	42
2.1.1	Hardware	42
2.1.2	Software	42
2.1.3	Datenbanken	44
2.2	Methoden	45
2.2.1	Methoden zum Sequenzvergleich	45
2.2.2	Homologie-Modellierung der TR von <i>Leishmania donovani</i> ...	45
2.2.3	Erstellung von Pharmakophor-Modellen	46

2.2.4	Aufbereitung der virtuellen Substanzbibliothek	47
2.2.5	<i>Docking</i>	47
2.2.6	Ähnlichkeits- und Substruktursuchen	49
2.2.7	<i>In vitro</i> -Messungen.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Glutathion-Reduktase	50
3.1.1	Bioinformatische Tiefenanalyse.....	50
3.1.2	Analyse der Röntgenkristallstrukturen der GR.....	53
3.1.3	Pharmakophor-Modelle der humanen Glutathion-Reduktase....	59
3.1.4	Optimierung und Validierung des <i>Docking-Setups</i>	63
3.1.5	Virtuelles <i>Screening</i>	69
3.1.6	<i>In vitro</i> -Test der selektierten Substanzen	71
3.1.7	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen	71
3.1.8	Glutathion-Reduktase von <i>Plasmodium falciparum</i>	78
3.1.8.1	<i>In vitro</i> -Test von hGR-Inhibitoren auf pfGR.....	78
3.1.8.2	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei pfGR-Inhibitoren	79
3.2	Trypanothion-Reduktase	83
3.2.1	Suche nach subversiven Substraten.....	83
3.2.2	Homologie-Modell der TR von <i>Leishmania donovani</i>	86
3.3	Liponamid-Dehydrogenase	89
3.3.1	Analyse der Röntgenkristallstrukturen der LipDH	90
3.3.2	Virtuelles <i>Screening</i>	91
3.3.3	<i>In vitro</i> -Test der selektierten Substanzen.....	93
3.4	Identifizierte Substanzen	93
4	Diskussion	95
4.1	Glutathion-Reduktase	95
4.1.1	<i>In silico</i> -Analyse der GR.....	95
4.1.2	Pharmakophor-Modelle der GR	97
4.1.3	Validierung der <i>Docking</i> -Versuche und virtuelles <i>Screening</i> zur Identifizierung von hGR-Inhibitoren	98
4.1.4	<i>In vitro</i> -Test der identifizierten Substanzen.....	100
4.1.5	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen	100

4.1.6	Inhibierung der pfGR durch hGR-Inhibitoren	102
4.2	Trypanothion-Reduktase	105
4.2.1	Identifizierung von TR-Inhibitoren.....	105
4.3	Liponamid-Dehydrogenase	107
4.3.1	Virtuelles Hochdurchsatz- <i>Screening</i> zur Identifizierung von LipDH-Inhibitoren.....	108
4.4	Ausblick.....	109
5	Zusammenfassung.....	112
6	Literaturverzeichnis.....	114

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc.-Nr.	<i>Accession number</i>
BiCNU	1,3-Bis-[2-Chloroethyl]-2-Nitroso-Harnstoff
CS	ChemScore-Funktion
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DK	Dimer-Kavität
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
FAO	<i>Food And Agriculture Organization of the United Nations</i>
GR	Glutathion-Reduktase
GS	GOLDScore-Funktion
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
hGR	Humane Glutathion-Reduktase
HTS	<i>High-Throughput-Screening</i>
iOWH	<i>Institute for OneWorld Health</i>
LC/MS	<i>Liquid chromatography/mass spectrometry</i>
LipDH	Liponamid-Dehydrogenase
MW	Molekulargewicht
pfGR	Glutathion-Reduktase v. <i>P. falciparum</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
T(SH) ₂	Trypanothion
TR	Trypanothion-Reduktase
TS ₂	Trypanothion-Disulfid
VSGs	<i>Variant surface glycoproteins</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

1.1 Tropische Infektionskrankheiten

Tropische Infektionskrankheiten, die von Protozoen, Bakterien, Würmern oder Viren hervorgerufen werden können (z. B. Amöbenruhr, Cholera, Onchozerkose bzw. Dengue-Fieber), beeinflussen sowohl die Gesundheit von Individuen als auch den Wohlstand ganzer Nationen. Besonders schwerwiegende durch Protozoen verursachte Krankheiten sind dabei Malaria, Trypanosomiasis und Leishmaniose, welche pro Jahr mehrere Millionen Todesopfer fordern [FOURNET & MUNOZ, 2002]. Die starke Zunahme resistenter Erregerstämme während der letzten Jahre macht eine Behandlung dieser Krankheiten immer schwieriger. Ein weiteres Problem ist die Tatsache, dass die zur Verfügung stehenden Medikamente oft zu teuer und für die meisten Patienten nur schwer erreichbar sind. Darüber hinaus haben wirtschaftliche Studien gezeigt, dass die globale Verteilung des Bruttoinlandsproduktes pro Kopf eine auffällige Korrelation zwischen dem Auftreten von Malaria und der vorherrschenden Armut aufweist [SACHS & MALANEY, 2002]. Dies alles zeigt, dass die Entwicklung neuer resistenzbrechender und zugleich erschwinglicher Medikamente zur Behandlung dieser Infektionskrankheiten dringend notwendig ist. Aus wirtschaftlichen Gründen räumte die pharmazeutische Industrie in den vergangenen Jahren mehrheitlich der Forschung auf dem Gebiet tropischer Infektionskrankheiten keinen hohen Stellenwert ein. Die Aufklärungsprogramme der WHO (*World Health Organization*) sowie des iOWH (*Institute for OneWorld Health*) rücken jedoch die „neglected diseases“ wieder zunehmend in das Interesse von Öffentlichkeit und Forschung.

1.1.1 Malaria

Die Malaria - abgeleitet von dem italienischen „*mala aria*“ (schlechte Luft) - wird von Protozoen der Gattung *Plasmodium sp.* (Stamm: *Apicomplexa*, Synonym *Sporozoa*) hervorgerufen. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch blutsaugende weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles sp.*, u. a. durch *A. maculipennis*, *A. arabiensis*, *A. culicifacies*, besonders aber durch *A. gambiae*. Weltweit infizieren sich pro

Jahr zwischen 300 und 500 Millionen Menschen mit Malaria (ca. 2,7 Millionen Todesfälle) und 40% der Weltbevölkerung leben unter dem ständigen Risiko einer Ansteckung [MURPHY & BREMAN, 2001]. Speziell betroffen sind weite Teile Afrikas, Asiens und Südamerikas. In Afrika, wo sich 90% der Infektionsfälle ereignen, ist dabei das Risiko am größten. Besonders anfällig für Ansteckungen sind Menschen mit einem schwachen Immunsystem (z. B. Neugeborene, Kinder, ältere und unterernährte Menschen und immunsupprimierte Patienten). Die Malaria ist somit die bei weitem wichtigste tropische parasitäre Infektionskrankheit und tötet mehr Menschen als jede andere übertragbare Krankheit mit Ausnahme der Tuberkulose. In Europa ist die Malaria derzeit nicht endemisch, aber trotzdem nimmt die Zahl der Infektionen, nicht zuletzt aufgrund von Klimaänderungen und des fortwährend wachsenden Ferntourismus, stetig zu. Ein damit einhergehendes Problem ist die „Flughafenmalaria“ oder „*Baggage Malaria*“, bei der Infektionen durch importierte *Anopheles*-Mücken auf einem Flughafen oder in dessen unmittelbarer Umgebung erfolgen bzw. infektiöse Mücken im Gepäck von Flugreisenden importiert werden. In Deutschland ist die Zahl der Infektionen in den letzten Jahren tendenziell leicht rückläufig. Lagen die Meldezahlen 1998 bei 1008 Fällen, so waren 2004 noch 707 Fälle zu verzeichnen. Allerdings gab es 2001 erneut einen Höhepunkt mit 1045 Infektionen (darunter 8 Todesfälle) [SCHONEBERG *et al.*, 2005].

Bei einem Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke werden Sporozoiten-Stadien des Parasiten mit dem Speichel der Mücke in die menschliche Blutbahn übertragen. Mit dem Wirtswechsel von der Stechmücke zum Menschen beginnt die asexuelle Vermehrung (Schizogonie) des Parasiten. Diese verläuft über mehrere Schizonten- und Merozoiten-Stadien in Leberparenchymzellen und Erythrocyten (siehe Abb. 1.1). Während der erythrocytären Phase entwickelt sich ein geringer Teil der Merozoiten zu Gametocyten (Geschlechtsformen). Diese werden bei einem erneuten Stich wieder von einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen, in welcher nun die sexuelle Vermehrung (Sporogonie) beginnt. Aus den Gametocyten entstehen Gameten, die zu einer Zygote verschmelzen. Aus dieser wird ein Ookinet (bewegliche Form der Zygote) und schließlich eine Oocyste,

in welcher bis zu 1000 Sporozoiten heranreifen. Nach ihrer Freisetzung aus der Oocyste wandern diese zu den Speicheldrüsen der Mücke, wo sie

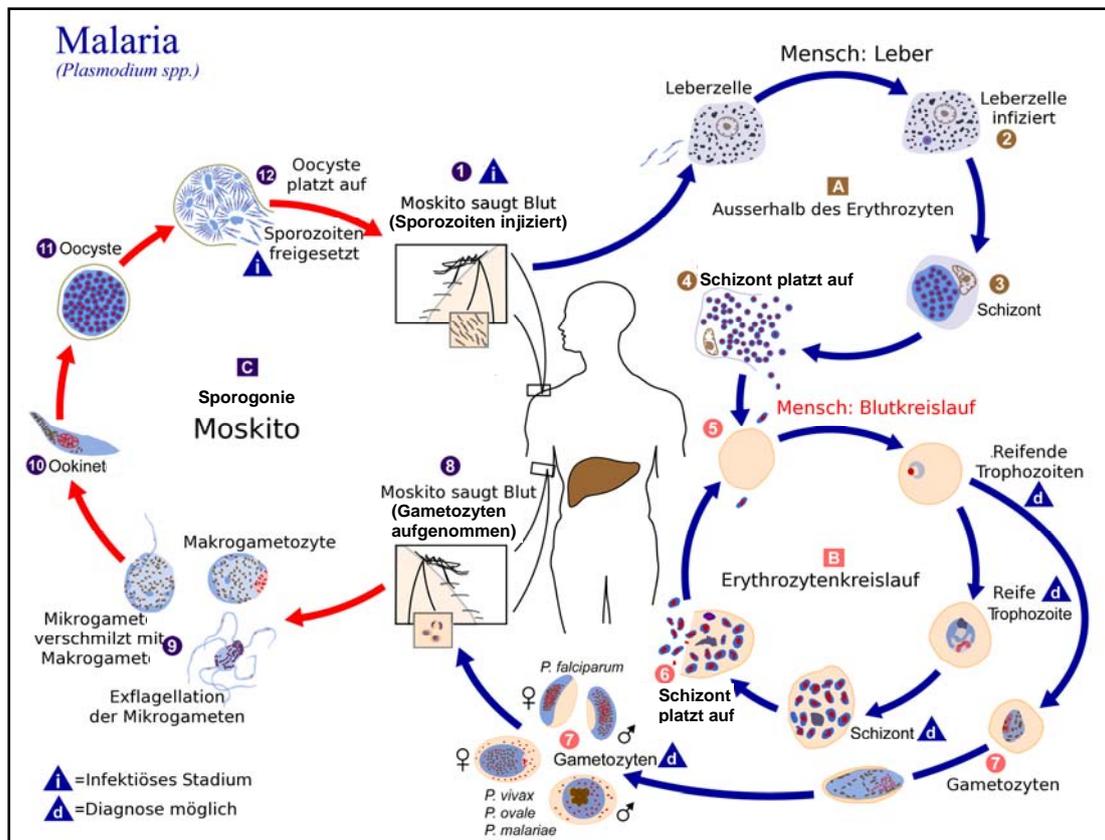


Abbildung 1.1 Lebenszyklus von *Plasmodium* sp. Der Lebenszyklus des Malariaerregers *Plasmodium* sp. findet in zwei verschiedenen Wirten statt. Während einer Blutmahlzeit überträgt ein infizierter weiblicher *Anopheles*-Moskito Sporozoiten in den menschlichen Wirt ①. Diese Sporozoiten infizieren dann Leberzellen ② und reifen zu Schizonten ③, welche dann aufplatzen und Merozoiten freisetzen ④. Nach dieser initialen Replikationsphase in der Leber (exo-erythrocytäre Schizogonie A) durchlaufen die Parasiten eine asexuelle Multiplikationsphase in den Erythrocyten (erythrocytäre Schizogonie B). Die Merozoiten befallen nun rote Blutkörperchen ⑤. Die anschließenden Trophozoiten-Stadien reifen zu Schizonten, welche aufplatzen und weitere Merozoiten freisetzen ⑥. Einige Parasiten differenzieren dabei zu sexuellen erythrocytären Stadien (Gametocyten) ⑦. Diese werden nun bei einer Blutmahlzeit von einem *Anopheles*-Moskito aufgenommen ⑧ und durchlaufen dort eine als Sporogonie bezeichnete Multiplikationsphase C. Im Magen des Moskitos verschmelzen Mikro- und Makrogameten und bilden Zygoten ⑨. Diese werden beweglich und nehmen eine längliche Form an (Ookineten) ⑩ welche in die Mitteldarmwand des Moskitos einwandern, wo sie sich zu Oocysten entwickeln ⑪. Diese Oocysten wachsen, platzen auf und setzen somit Sporozoiten frei ⑫, welche dann die Speicheldrüsen des Moskitos befallen. Bei einer weiteren Blutmahlzeit werden diese Sporozoiten auf den nächsten menschlichen Wirt übertragen und der Zyklus beginnt von neuem ①. [Quelle: http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm, verändert].



Abbildung 1.2 Aufgeplatzter Erythrocyt. Diese Abbildung zeigt einen durch die Merozoiten-Freisetzung aufgeplatzten Erythrocyten (REM-Aufnahme, eingefärbt) [SCHIRMER *et al.*, 1995].

Bei schweren Infektionen führt die mit der Freisetzung der Merozoiten verbundene Lyse der Erythrocyten (siehe Abb. 1.2) zusammen mit einer gedämpften Erythropoese durch $\text{TNF-}\alpha$ zu einer hämolytischen Anämie [CLARK & CHAUDHRI, 1988].

Die meisten Infektionen werden durch *Plasmodium falciparum* verursacht, dem Erreger der Malaria tropica. Diese ist gleichzeitig die schwerste Form der Krankheit und kann zu schweren Komplikationen (z. B. Nierenversagen und Kreislaufkollaps) und zum Tod führen. Charakteristisch für die Malaria tropica sind die hohe Parasitämie, sowie die teilweise sehr ausgeprägte Anämie. Gelegentlich kommt es auch zu einer cerebralen Malaria. Dabei bleiben mit *P. falciparum* infizierte Erythrocyten am Endothel von Blutgefäßen im Gehirn haften, was zu einer lokalen Sauerstoffunterversorgung und somit zu Krampfanfällen, Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma führen kann. Die Fieberschübe, welche mit der Lyse der Erythrocyten einhergehen, sind bei der Malaria tropica meistens unregelmäßig. Die zweithäufigste Form der Krankheit ist die Malaria tertiana. Sie wird durch *P. vivax* und *P. ovale* hervorgerufen. Hierbei handelt es sich um eine gutartige Verlaufsform, bei der nur selten Komplikationen oder Todesfälle auftreten. Die Fieberschübe treten bei der Malaria tertiana meist rhythmisch alle 48 Stunden auf. Da *P. vivax* und *P. ovale* Hypnozoiten (Ruheformen) ausbilden können, kommt es oft zu Rezidi-

für eine Neuinfektion bereitstehen. Das Krankheitsbild der Malaria wird also durch die Vorgänge bei der Schizogonie bestimmt. Durch die Freisetzung der Merozoiten kommt es zu einem massiven Anstieg von Fremdproteinen im Blutkreislauf des Wirtes. Die darauf folgende Immunantwort führt zu einer Abgabe von Cytokinen, welche Fieberschübe und Hypoglykämie verursacht. Bei

ven. Dies ist besonders problematisch, da es auch erst nach mehreren Jahren zu einem Ausbruch der Krankheit kommen kann, was ggf. zu Fehldiagnosen führt. Die seltenste Form stellt die Malaria quartana dar. Diese wird durch *P. malariae* verursacht. Ähnlich wie bei der Malaria tertiana, ist auch diese Verlaufsform eher gutartig. Allerdings kann es hier zu einem nephrotischen Syndrom kommen (Malarianephrose). Auch hier treten die Fieberschübe meist rhythmisiert auf (Intervall: 72 Stunden). Eine Besonderheit der Malaria quartana ist die Tatsache, dass Rezidive auch noch nach mehr als 50 Jahren auftreten können. Diese werden nicht durch Hypnozoiten verursacht, sondern durch eine ständige, wenn auch geringe, Parasitämie [MEHLHORN, 2001].

1.1.1.1 Therapie der Malaria

Neben der unbedingt zu empfehlenden Expositionsprophylaxe (Vermeidung des Kontaktes mit dem Vektor, z. B. durch Verwendung von Moskitonetzen, Tragen langer Kleidung und Anwendung von Repellents) ist die Chemoprophylaxe bzw. nach Ansteckung die Gabe von Chemotherapeutika derzeit das einzig probate Mittel zur Malariabekämpfung. Trotz einiger Erfolge (z. B. das Vakzin RTS.S/AS02A, welches momentan in Phase IIb ist [WHO (1)] gibt es derzeit keine Schutzimpfung. Zur Chemotherapie werden u. a. Chloroquin (Resochin®), Sulfadoxin-Pyrimethamin (Fansidar®), Mefloquin (Lariam®), Primaquin, sowie Kombinationstherapien aus Atovaquon und Proguanil (Malarone®), Artemether und Lumefantrin (Riamet®) und Doxycyclin (Vibramycin®) und Chinin verwendet (siehe Abb. 1.3). Dabei treten jedoch verstärkt Resistenzen vor allem gegen Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin auf [GREENWOOD *et al.*, 2005], was dazu geführt hat, dass diese Medikamente mittlerweile fast ohne jede Wirkung sind. Grundsätzlich sind Resistenzen jedoch bereits - nach Region und Ausmaß unterschiedlich - gegen jedes zur Verfügung stehende Malariamedikament möglich. Der Wirkmechanismus von Chloroquin beruht darauf, dass die Substanz mit dem toxischen Häm, das bei dem Abbau von Hämoglobin durch den Parasiten entsteht, einen Komplex bildet und somit die Polymerisation von Häm zu nicht-

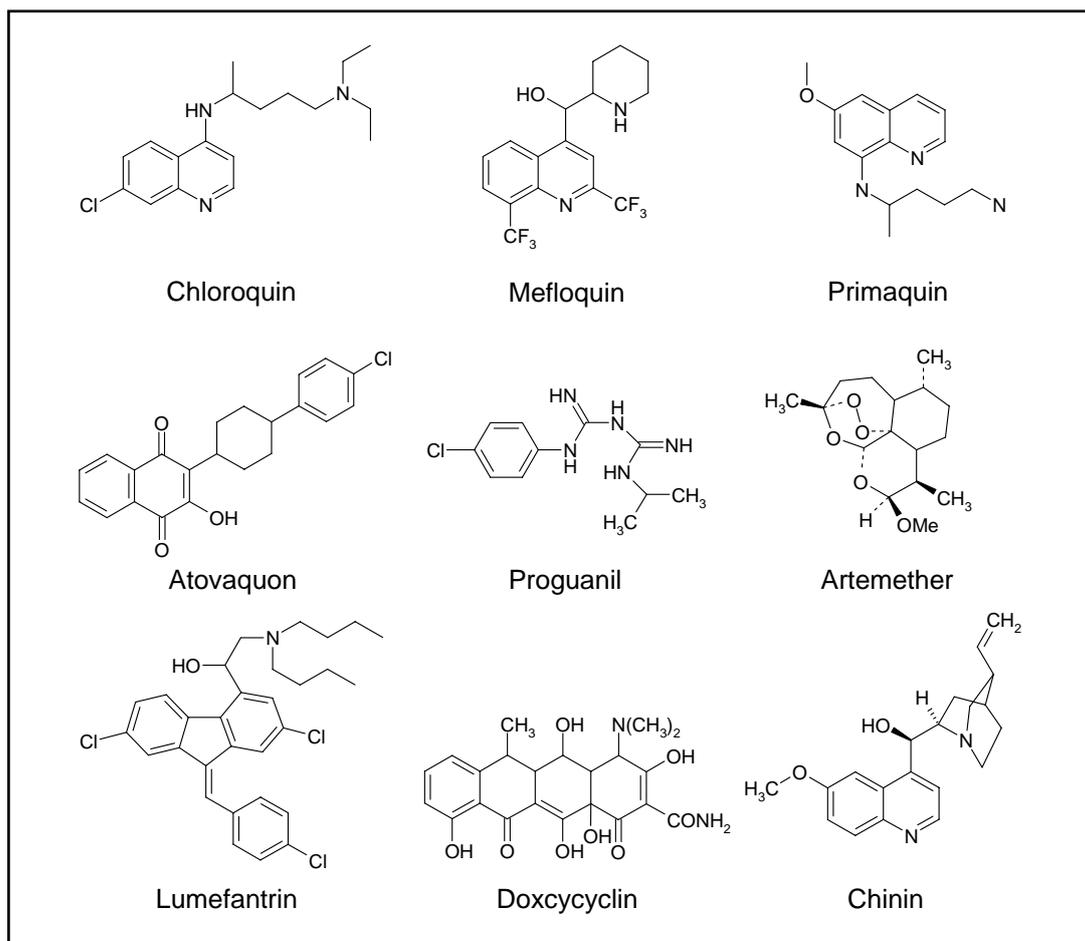


Abbildung 1.3 Zugelassene Medikamente zur Behandlung der Malaria. Chloroquin bildet z. B. einen Komplex mit dem toxischen Häm und verhindert so die Polymerisation zu nicht-toxischem Hämozoin [GINSBURG & KRUGLIAK., 1999]. Artemether, ein Artemisinin-Derivat und Bestandteil des Kombinationspräparates Riamet®, bildet ebenfalls einen Komplex mit Häm. Hier findet jedoch ein Elektronentransfer und die Bildung von Radikalen statt, aus welchen sich die parasitiziden Agentien ableiten [JEFFORD, 2001].

toxischem Hämozoin verhindert [GINSBURG & KRUGLIAK, 1999]. Die Resistenz gegen Chloroquin wird hauptsächlich durch Mutationen in den Genen *pfmdr1* (*Plasmodium falciparum multiple drug resistance analogue 1*) [MOCKENHAUPT *et al.*, 2005] und *pfcr1* (*Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*) hervorgerufen. Darüber hinaus scheint eine Entgiftung von Chloroquin über das Enzym Glutathion-S-Transferase stattzufinden [DUBOIS *et al.*, 1995]. Die Kombination von Sulfadoxin und Pyrimethamin dagegen inhibiert die Dihydrofolat-Reduktase und Dihydropteroat-Synthetase der Plasmodien, sodass Resistenzen gegen dieses Therapeutikum auf Mutationen in diesen beiden En-

zymen zurückgeführt werden können [KUBLIN *et al.*, 2002]. Die momentan wirksamsten Antimalaria-Medikamente sind die Artemisinin-Derivate (z. B. Dihydroartemisinin, Artesunat und Arteether). Artemisinin (auch Qinghaosu), ein Sesquiterpenlaktone mit einer Endoperoxidstruktur, wurde erstmals 1972 aus den Blättern von *Artemisia annua* isoliert. Diese Heilpflanze wurde schon im alten China zur Behandlung von Fieber verwendet [KAMCHONWONGPAISAN & MESHNICK, 1996]. Seit ihrer Entwicklung wurden die Artemisinin-Derivate u. a. in China, Vietnam, Burma, Thailand und verschiedenen Regionen Afrikas erfolgreich zur Behandlung von *P. falciparum*- und *P. vivax*-Infektionen eingesetzt. Trotz der hohen Wirksamkeit dieser Präparate beginnt auch hier sich ein Rückgang der Sensitivität der Plasmodien gegenüber diesen Substanzen abzuzeichnen. Dies ist derzeit noch auf China und Vietnam beschränkt [WHO (2)]. Ein Nachteil dieser Substanzklasse ist die relativ hohe Rekrudenzrate, weshalb die Wirkstoffe mit synergistisch wirkenden Antimalaria-Medikamenten kombiniert werden. Die Artemisinin-Derivate, zu denen auch Artemether - ein Bestandteil des Kombinationspräparates Riamet® - zählt, zeigen einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Chloroquin: auch sie bilden einen Komplex mit Häm. Aber anstatt nur die Polymerisation von Häm zu Hämozoin zu inhibieren, findet ein Elektronentransfer und die Bildung von Radikalen statt, aus welchen sich die eigentlichen parasitiziden Agentien ableiten [JEFFORD, 2001].

Ebenso wie die Plasmodien haben auch die *Anopheles*-Mücken Resistenzen gegen viele Insektizide wie z. B. DDT entwickelt, was die Vektorkontrolle und somit die Verhinderung der Ausbreitung der Malaria zusätzlich erschwert. Weitere Probleme stellen die Nebenwirkungen vieler Malariamedikamente dar. Diese haben dazu geführt, dass z. B. Halofantrin (Halfan®) und Amodiaquin in Europa mittlerweile vom Markt genommen wurden. Für die Einheimischen der Malaria-Epidemiegebiete kommt erschwerend hinzu, dass die meisten wirksamen Medikamente zu teuer sind. Ein Beispiel dafür, dass auch der Mensch Resistenzen gegen Malaria entwickeln kann, ist die Sichelzellenanämie. Diese ist eine auto-



Abbildung 1.4 Sichelzellenanämie. Diese Abbildung zeigt die für die Sichelzellenanämie charakteristische Verformung der Erythrocyten (lichtmikroskopische Aufnahme, eingefärbt) [[http:// www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1223.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1223.htm)].

somal-rezessiv vererbare Hämoglobinopathie, welche mit einer charakteristischen sichelförmigen Verformung der Erythrocyten einhergeht (siehe Abb. 1.4). Homozygote Träger dieser Krankheit erreichen nur unter intensiver Therapie das Erwachsenenalter, wohingegen heterozygote Träger eine normale Lebenserwartung besitzen und weitgehend resistent gegen Malaria sind [PSCHYREMBEL, 1998]. In

Malariagebieten unterliegen heterozygote Träger somit einem Selektionsvorteil, was dazu führt, dass in manchen Regionen Afrikas fast ein Drittel der Bevölkerung heterozygote Träger der Sichelzellenanämie sind. Der Resistenzmechanismus ist dabei noch nicht genau geklärt. Unter anderem wird die Theorie diskutiert, dass die sichelförmigen Erythrocyten größere Mengen an Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid produzieren, als normale Erythrocyten. Solche Oxidantien sind jedoch für die Malariaparasiten toxisch und führen zu einer stark herabgesetzten Lebensfähigkeit und zu vermindertem Parasitenwachstum [ANASTASI, 1984]. Diese Tatsache wird auch zur medikamentösen Bekämpfung der Parasiten genutzt (siehe 1.2).

1.1.2 Trypanosomiasis

Unter dem Begriff Trypanosomiasis werden mehrere Krankheiten zusammengefasst, welche von protozoischen Parasiten der Gattung *Trypanosoma sp.* (Ordnung: *Kinetoplastida*) verursacht werden. Hierzu zählen z. B. die afrikanische Schlafkrankheit, hervorgerufen durch *T. brucei gambiense* (westafrikanische Schlafkrankheit) und *T. b. rhodesiense* (ostafrikanische Schlafkrankheit), die Chagas-Krankheit (südamerikanische Trypanosomiasis, hervorgerufen durch *T. cruzi*), sowie die Nagana-Tierseuche, welche u. a. von *T. brucei brucei*, *T. congolense* und *T. vivax*

verursacht wird und z. B. Pferde, Schweine, Rinder und Nagetiere befällt [CHIMELLI & SCARAVILLI, 1997; CONNOR, 1994]. Vektoren der afrikanischen Schlafkrankheit und der Nagana-Tierseuche sind Fliegen der Gattung *Glossina sp.* (Tsetse-Fliegen), wohingegen die Chagas-Krankheit z. B. durch Wanzen der Gattung *Triatoma sp.*, *Panstrongylus sp.* und *Rhodnius sp.* übertragen wird. Derzeit sind nach Schätzungen der WHO ungefähr 500.000 Menschen von der afrikanischen Schlafkrankheit betroffen und ca. 70 Millionen leben im Risiko einer Ansteckung [WHO (3)]. Bei der Chagas-Krankheit liegen die Zahlen sogar noch höher: ca. 18 Millionen Infektionsfälle und ungefähr 120 Millionen Menschen, welche mit dem Risiko einer Ansteckung leben. Dies entspricht 25% der Bevölkerung Lateinamerikas [DNDi (*Drugs for Neglected Diseases Initiative*) (1)]. Die Nagana-Tierseuche, welche durch den Befall von Nutztieren die ohnehin geschwächte Entwicklungslage in den ländlichen Gegenden Afrikas beeinträchtigt, verursacht jährliche wirtschaftliche Schäden von mehr als einer Milliarde US-Dollar [FAO (*Food And Agriculture Organization of the United Nations*) (1)].

1.1.2.1 Afrikanische Schlafkrankheit

Die afrikanische Schlafkrankheit kann anhand ihrer Erreger, welche morphologisch nicht zu unterscheiden sind, in 2 Formen unterteilt werden: die westafrikanische und ostafrikanische Schlafkrankheit. Erstere wird durch *T. brucei gambiense* hervorgerufen und macht >90% der gemeldeten Fälle aus. Die Übertragung dieser Form erfolgt vor allem durch *Glossina palpalis*. Der Krankheitsverlauf ist chronisch und Symptome können manchmal erst Jahre nach der Infektion auftreten. Oft befindet sich der Patient dann bereits in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Die zweite Form wird durch *T. brucei rhodesiense* verursacht und stellt <10% der gemeldeten Fälle (Vektor: v. a. *Glossina morsitans*). Hierbei tritt eine akute Infektion ein und erste Symptome sind bereits nach Wochen oder Monaten zu beobachten. Darauf erfolgt ein sehr rascher Krankheitsverlauf. Der Krankheitsverlauf gliedert sich bei beiden Formen in 2 Phasen. Anfangs teilen sich die Trypanosomen im Blut und in der Lympheflüssigkeit (Phase 1). Nach einer gewissen Zeit durchqueren die Parasiten die Blut-Hirn-Schranke und befallen das Zentralnervensystem (Phase 2).

Symptomatisch ist die erste Phase, auch hämolymphatische Phase genannt, vor allem durch Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen, sowie Juckreiz gekennzeichnet. In der zweiten Phase (neurologische oder meningoenzephalitische Phase) treten Symptome wie Konfusion, Wahrnehmungsstörungen, verschlechterte Koordination und Störungen des Schlafzyklus auf [PSCHYREMBEL, 1998]. Um die Schlafkrankheit erfolgreich zu behandeln, ist es wichtig, dass die Diagnose so früh wie möglich gestellt wird. Ohne Behandlung endet die Krankheit tödlich. Zur Behandlung der ersten Phase werden Pentamidin (Pentacarinat®) und Suramin (Germanin®) verwendet, zur Behandlung der zweiten Phase Melarsoprol (Arsobal®) und Eflornithin (Ornidyl®). Letzteres ist ein Ornithin-Analogon, welches die Ornithindecaboxylase, ein sehr wichtiges Enzym im Polyamin-Biosyntheseweg, spezifisch hemmt [MCCANN & PEGG, 1992]. Leider wirkt es nicht gegen die ostafrikanische Schlafkrankheit. Pentamidin, welches früher als Prophylaxe eingesetzt wurde, ist ein Diamidin und bindet vermutlich an DNA, was zu einer Inhibierung der Replikation führen kann [NUNN & NEIDLE, 1995]. Auch eine Inhibierung der Topoisomerase II durch Pentamidin wird diskutiert. Für Suramin, ein Derivat des trypanoziden Azofarbstoffes Trypanblau und für Melarsoprol, eine Melaminophenyl-Arsen-Verbindung, sind die Wirkmechanismen noch nicht aufgeklärt [VOOGD *et al.*, 1993; CARTER & FAIRLAMB, 1993].

Die Medikamente zur Behandlung der zweiten Phase (Melarsoprol und Eflornithin), welche die Blut-Hirn-Schranke durchqueren müssen, weisen sehr starke Nebenwirkungen auf. Besonders Melarsoprol ist sehr toxisch und kann zu Enzephalopathien führen, welche in 3-10% der Fälle tödlich enden. Da zurzeit keine medikamentöse Prophylaxe zur Verfügung steht, ist die Expositionsprophylaxe die einzige Methode, das Risiko einer Ansteckung zu verringern. Zur Behandlung der Nagana-Tierseuche stehen Ethidium-Bromid, Isomethamidium-Chlorid (Samorin®) oder Diminazen (Berenil®) zur Verfügung. Diese können auch zur Prophylaxe eingesetzt werden. Da sie jedoch in die DNA interkalieren, sind sie mutagen und somit nicht für die Therapie der humanen Schlafkrankheit geeignet [BARCELO *et al.*, 2001].

Weder gegen die afrikanische Schlafkrankheit noch gegen die Chagas-Krankheit gibt es derzeit einen vorbeugenden Impfstoff. Während *T. cruzi* sich durch das Eindringen in Wirtszellen vor dem Immunsystem des Wirtes verbirgt, betreiben *T. brucei*, *T. congolense* und andere Arten Antigenvariation [FERGUSON *et al.*, 1986; CROSS, 1996]. Dabei werden die *variant surface glycoproteins* (VSGs), welche die Trypanosomen umgeben, während der Vermehrung durch das Rearrangement von Genen variiert [DUSZENKO *et al.*, 1988; NAVARRO & CROSS, 1996]. Dies führt dazu, dass das Immunsystem immer nur einen Teil der Parasiten angreifen kann, da bereits Formen mit neuer VSG-Ausstattung im Blutkreislauf zirkulieren, für welche noch keine spezifische Immunantwort zur Verfügung steht (siehe Abb. 1.5) [JANEWAY *et al.*, 2001].

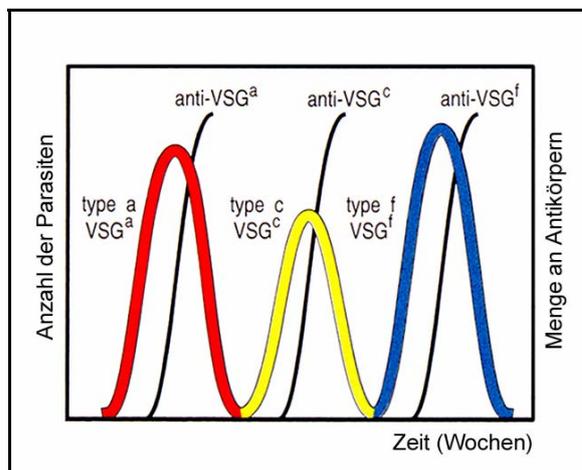


Abbildung 1.5 Antigenvariation bei afrikanischen Trypanosomen. Die farbigen Kurven zeigen die Anzahl der Parasiten, wobei jede Farbe einen anderen VSG-Typ repräsentiert. Die schwarzen Kurven zeigen die Menge an spezifischen Antikörpern. [JANEWAY *et al.*, 2001, verändert].

Ähnlich wie die Malaria konnte die afrikanische Schlafkrankheit Mitte der 60er Jahre beinahe ausgerottet werden [LABUSQUIERE & DUTERTRE, 1966; DOBSON, 2001]. Doch führte der anfängliche Erfolg in der Bekämpfung dazu, dass die Aufklärungs- und Behandlungsprogramme gekürzt wurden, mit der Folge, dass sich die Krankheit wieder ausbreitete.

1.1.2.2 Chagas-Krankheit

Analog zur afrikanischen Schlafkrankheit, lässt sich die südamerikanische Trypanosomiasis oder Chagas-Krankheit in zwei Phasen einteilen. Während der akuten Phase kurz nach der Infektion kommt es meistens zu einem entzündlichen Ödem um die Stichwunde, Fieber, Anämie und He-

patosplenomegalie. In der chronischen Phase, welche auch erst nach vielen Jahren auftreten kann, sind vor allem das Herz, der Gastrointestinaltrakt und das Nervensystem betroffen [PARADA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1983; PSCHYREMBEL, 1998]. Dabei kommt es zu verschiedenen neurologischen Störungen, zu einer Schädigung des Herzmuskels oder zu Dilatationen der Speiseröhre und des Darms. Diese Symptome sind darauf zurückzuführen, dass die Parasiten als trypomastigote Formen Herzmuskelzellen, Gliazellen, und Muskelzellen von Hohlorganen (z. B. Darm) befallen. In diesen Zellen gehen sie in das amastigote Stadium über und teilen sich. Wenn die Teilung beendet ist, schließt sich wieder ein trypomastigotes Stadium an. Die Wirtszellen platzen nun auf und entlassen die trypomastigoten Formen in den Blutkreislauf. Dieser Zyklus wiederholt sich mehrfach. Ohne Behandlung endet die Chagas-Krankheit in ca. 10% der Fälle tödlich. Zur Therapie während der akuten Phase werden Nifurtimox (Lampit®) und Benznidazol (Radanil®) verwendet, welche beide lebertoxisch sind. Nifurtimox führt dabei zur Bildung von freien radikalischen Intermediaten, wohingegen Benznidazol zu reaktiven Metaboliten umgesetzt wird, welche kovalent an DNA, Proteine und Lipide des Parasiten binden [DOCAMPO & STOPPANI, 1979; DIAZ DE TORANZO *et al.*, 1988]. Zur Therapie von chronisch kranken Patienten gibt es zurzeit keine Medikamente, so dass eine Behandlung nur palliativ erfolgen kann. Somit sind, neben den oben erwähnten Medikamenten zur Behandlung der akuten Phase, Expositionsprophylaxe und Vektorkontrolle derzeit die einzigen Mittel zur Bekämpfung der Chagas-Krankheit.

1.1.3 Leishmaniose

Der Überbegriff Leishmaniose umfasst mehrere Krankheitsformen, welche von obligat intrazellulären Protozoen der Gattung *Leishmania sp.* (Ordnung: *Kinetoplastida*) hervorgerufen werden [HIEPE *et al.*, 2005]. Man unterscheidet die kutane Leishmaniose (auch Bagdad-, Orient- oder Aleppobeule), welche von *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana* usw. verursacht wird, die mukokutane Leishmaniose (auch bekannt als Uta oder Espundia), hervorgerufen durch den *L. braziliensis*-Komplex sowie die viszerale Leishmaniose (auch Dum-Dum-Fieber oder Kalar-Azar), welche von *L. donovani* und *L. infantum* ausgelöst wird. Die ver-

schiedenen Spezies sind dabei morphologisch nicht zu unterscheiden. Die Leishmaniose kommt weltweit, besonders aber in den Tropen und auch im Mittelmeerraum vor. Als Vektor fungieren Sandfliegen der Gattung *Phlebotomus sp.* und *Lutzomyia sp.* Die Zahl der Leishmaniose-Neuinfektionen liegt bei ca. 2 Millionen pro Jahr. Weltweit sind ungefähr 12 Millionen Menschen betroffen und 350 Millionen leben mit dem Risiko einer Ansteckung [WHO (4)].

Alle Formen der Leishmaniose können verheerende Folgen für den befallenen Wirtsorganismus haben. Besonders schwerwiegend ist die viszerale Leishmaniose, welche ohne Behandlung eine Sterberate von annähernd 100% aufweist. Charakteristisch für diese Form der Erkrankung, bei der die inneren Organe befallen werden, sind unregelmäßiges Fieber, Gewichtsverlust, Hepato- und Splenomegalie, sowie Anämie [TANOLI *et al.*, 2005]. Co-Infektionen mit HIV und andere immunsupprimierende Bedingungen begünstigen die Symptome einer schweren viszeralen Leishmaniose. Diese kann in solchen Fällen auch durch *L. infantum* ausgelöst werden, während im Normalfall v. a. *L. donovani* für diesen Krankheitsverlauf verantwortlich ist. Bei der mukokutanen Leishmaniose werden besonders die Schleimhäute befallen. Es entstehen Läsionen, welche zur entstellenden Zerstörung mukoser Membranen der Nase, des Mundes und des Rachenraumes führen. Die kutane Leishmaniose dagegen, welche die am weitesten verbreitete Form darstellt, verursacht zahlreiche Hautgeschwüre im Gesicht und an den Armen und Beinen, die zu schwerer Invalidität führen können. Mit dem Stich einer infizierten Sandmücke werden promastigote Leishmanien in den Wirtsorganismus übertragen und dort von Makrophagen phagozytiert [HIEPE *et al.*, 2005]. In den Makrophagen findet die Umwandlung in das amastigote Stadium und eine Vermehrungsphase statt, nach deren Ende das Aufplatzen der Makrophagen und somit ein Freisetzen der Parasiten erfolgt. Diese befallen nun weitere Zellen des Immunsystems und, je nach *Leishmania*-Spezies,

verschiedene Gewebetypen, was zu den o. g. Symptomen führt. Neben der humanen Leishmaniose spielt auch die canine Form eine bedeutende Rolle (siehe Abb. 1.6) [AMUSATEGUI *et al.*, 2003]. Diese wird ebenfalls durch die Art *L. infantum* (s. o.) ausgelöst, welche auch viszerale Leishmaniose bei Kindern verursacht. So ist besonders im Mittelmeerraum die Infektionsrate bei Hunden sehr hoch. In Andalusien sind ca. 42% der Hunde betroffen und auf Sizilien sogar bis zu 80%.



Abbildung 1.6 Canine Leishmaniose. Ein sehr häufig anzutreffendes erstes Symptom der caninen Leishmaniose ist der Haarverlust, besonders um die Augen (Brillenbildung). [Intervet Deutschland GmbH].

1.1.3.1 Therapie der Leishmaniose

Zur Behandlung der Leishmaniose werden derzeit Natrium-Stibogluconat (Pentostam®), N-Methylglucamin-Antimonat (Glucantim®), Miltefosin (Miltex®, Impavido®), Pentamidin (Pentacarinat®), Allopurinol (Zyloprim®), Amphotericin B (AmBisome®) und Paromomycin (Humatin®), verwendet. Miltefosin (Hexadecylphosphocholin) nimmt dabei eine besondere Stellung ein, da diese Substanz das erste oral verfügbare Medikament darstellt, welches gegen verschiedene Formen der Leishmaniose wirksam ist. Ursprünglich wurde das Medikament zur Krebstherapie entwickelt. Der Wirkmechanismus in Leishmanien basiert vermutlich auf Wechselwirkungen mit der Synthese und dem Abbau von parasitären Membranlipiden [DORLO *et al.*, 2006]. Die Gabe von Interferon- γ kann eine unterstützende therapeutische Option sein, da somit die Immunant-

wort des Wirtes in Richtung einer T_H1 -Antwort (zell-vermittelte Immunantwort) beeinflusst wird. Dies führt zu einer Aktivierung der mit Leishmanien infizierten Makrophagen und somit zur Abtötung der Parasiten [JANEWAY *et al.*, 2001].

1.2 Oxidativer Stress als Therapiemöglichkeit zur Bekämpfung von protozoischen Infektionskrankheiten und Krebs

Neben der Beeinflussung der Transkription oder des Zellzyklus durch Inhibierung von Zielproteinen wie Histon-Deacetylasen oder Kinasen [MEINKE & LIBERATOR, 2001; GRANT *et al.*, 2007; HUSAIN *et al.*, 2001; GRANT *et al.*, 2004] stellt die Erzeugung von oxidativem Stress ein probates Mittel zur Bekämpfung von protozoischen Infektionskrankheiten sowie Krebs dar [SCHIRMER *et al.*, 1987; OZBEN, 2007]. Da Protozoen und Krebszellen zum einen durch die Immunabwehr des menschlichen Organismus mittels starker Oxidantien wie Peroxynitrit, Hypochlorit und Wasserstoffperoxid bekämpft werden und sie zum anderen aufgrund ihrer hohen Stoffwechselrate selbst viele Oxidantien produzieren, spielen die antioxidativen Mechanismen, die für die Entgiftung dieser Agentien sorgen, eine essentielle Rolle für die Lebensfähigkeit dieser Zellen. Dabei sind Plasmodien besonders anfällig für oxidativen Stress, da sie, ähnlich wie Trypanosomen, keine Katalase und Glutathion-Peroxidase besitzen. Ein Ansatz zur Therapie dieser Krankheiten basiert daher auf dem Einsatz von Enzyminhibitoren, welche die antioxidativen Netzwerke außer Funktion setzen. Die wichtigsten Enzyme dieser antioxidativen Netzwerke sind bei Plasmodien die Glutathion-Reduktase (GR) (EC 1.8.1.7) [BOHME *et al.*, 2000] und Thioredoxin-Reduktase (TrxR) (EC 1.8.1.9) [KRNAJSKI *et al.*, 2002]. Bei Trypanosomen und Leishmanien, welche kein Glutathion-System besitzen, spielt ersatzweise die Trypanothion-Reduktase (TR) (EC 1.8.1.12) eine äußerst wichtige Rolle [DUMAS *et al.*, 1997; KRAUTH-SIEGEL & INHOFF, 2003]. Diese Enzyme gehören alle zur Klasse 1 der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen. Ein weiteres Enzym, welches zu der gleichen Protein-Familie gehört, ist die Liponamid-Dehydrogenase (LipDH) (EC 1.8.1.4), welche die E3-Untereinheit der drei α -Ketosäuren-

Dehydrogenase-Komplexe (Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und *branched-chain* α -Ketosäuren-Dehydrogenase-Komplex) bildet [CAROTHERS *et al.*, 1989; LOHRER & KRAUTH-SIEGEL, 1990]. Die Klasse 1 der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen umfasst außerdem noch die Thioredoxin-Reduktasen höherer Eukaryoten, sowie die Quecksilber-Reduktase, welche für die Resistenz einiger Bakterien gegen Hg^{2+} verantwortlich zeichnet [SCHUE *et al.*, 2007]. Die Klasse 2 der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen umfasst dagegen u. a. die Thioredoxin-Reduktasen von Bakterien und Pilzen, sowie die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase von *Salmonella typhimurium* [TARTAGLIA *et al.*, 1990]. Die Einteilung dieser Oxidoreduktasen in zwei Klassen erfolgte anhand von Struktur- und Sequenzähnlichkeiten. Allen gemeinsam sind jedoch die redox-aktiven Cysteine in den jeweiligen aktiven Zentren und die Verwendung von FAD als Coenzym [Datenbankeinträge in PROSITE: PDOC00073 bzw. PDOC00496].

1.2.1 Glutathion-Reduktase

Das Enzym Glutathion-Reduktase katalysiert die Reduktion von Glutathiondisulfid (GSSG) zu Glutathion (GSH):



Glutathion (siehe Abb. 1.7), ein Tripeptid bestehend aus Glutamin, Cystein und Glycin, stellt ein äußerst wichtiges Antioxidans dar. Durch reversible Oxidation der SH-Gruppen zweier Glutathion-Moleküle entsteht das über eine Disulfidbrücke verbundene

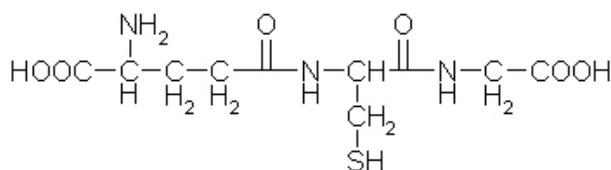


Abbildung 1.7 Glutathion. Diese Abbildung zeigt die Strukturformel von reduziertem Glutathion (GSH). GSH ist ein Tripeptid aus Glutamin, Cystein und Glycin. Es stellt ein äußerst wichtiges Antioxidans dar.

Doppelmolekül oxidierten Glutathions (GSSG). GSH ist in die Entgiftung von Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden, den schädli-

chen Nebenprodukten der aeroben Lebensweise, involviert [ALICIGUZEL & ASLAN, 2004]:



Diese Reaktion wird durch das Selenoenzym Glutathion-Peroxidase (EC 1.11.1.9) katalysiert. Darüber hinaus schützt GSH Erythrocyten vor Oxidationsschäden, indem es als Sulfhydrylpuffer wirkt und die Cysteinreste in Hämoglobin und anderen Erythrocytenproteinen im reduzierten Zustand hält [BERG *et al.*, 2003]. Weiterhin ist GSH beteiligt an der Synthese von Desoxynukleotiden [HOLMGREN, 1978] (siehe Abb. 1.8), an der Entgiftung von Xenobiotika via Glutathion-S-Transferase [FIANDER & SCHNEIDER, 2000], an der Regulation von Enzymen, sowie an der Detoxifikation von Oxoaldehyden [THORNALLEY, 2000]. Bei all diesen Prozessen wird GSH zu GSSG oxidiert und muss über eine Reduktion regeneriert werden. Die Glutathion-Reduktase ist ein sehr weit verbreitetes homodimeres Protein (MW_{Monomer} : 52500 Da). Sie kann in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Protozoen und Tieren nachgewiesen werden, nicht jedoch in einigen anaeroben Eubakterien und Archaeobakterien. Des Weiteren fehlt sie bei den Trypanosomatiden, wo sie durch die Trypanothion-Reduktase ersetzt wird (siehe 1.2.2) [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2003]. Auf subzellulärer Ebene findet sich die GR im Cytosol und in Cytosol-ähnlichen Räumen von Mitochondrien und Chloroplasten. Ein Monomer der GR besteht aus 4 Domänen (FAD-Domäne, NADPH-Domäne, *Interface*-Domäne und zentrale Domäne) und einer flexiblen N-terminalen Erweiterung.

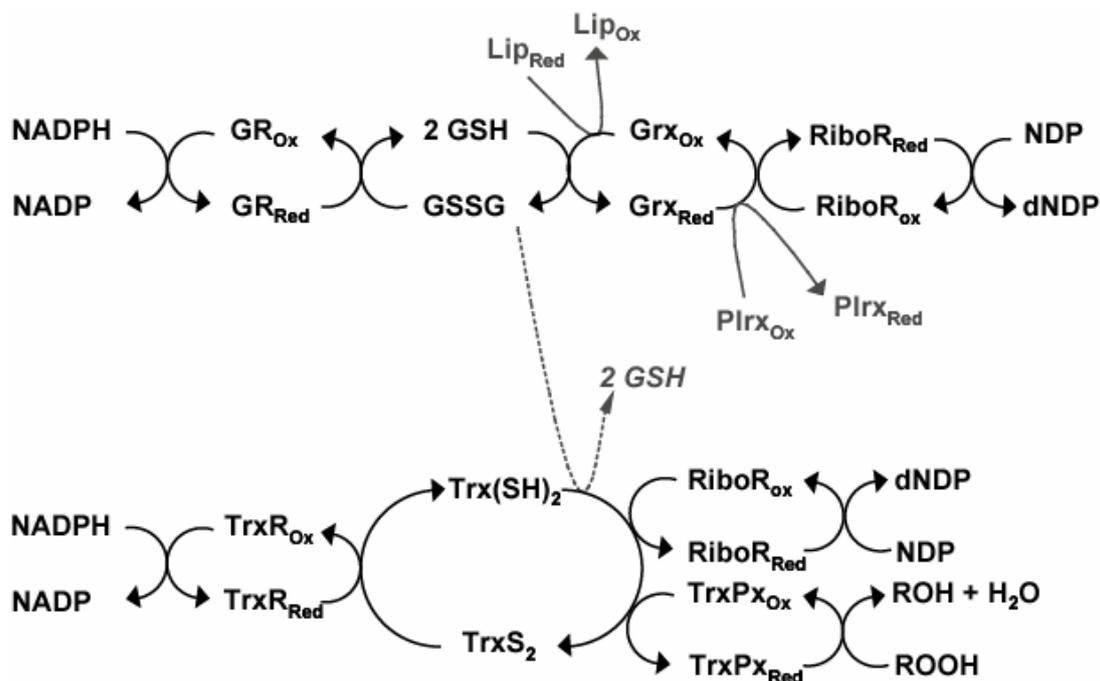


Abbildung 1.8 Dithiolgestützte Redoxsysteme in Plasmodien. In Plasmodien kommen zwei dithiolabhängige Redoxsysteme vor: Das Glutathion-System, bestehend aus GR, GSH und Glutaredoxin (Grx) überträgt Elektronen direkt oder mithilfe von Plasmoredoxin (Plrx) auf die Ribonukleotidreduktase (RiboR). Glutaredoxin kann auch durch Liponamid (Lip) reduziert werden. Die im Text erwähnte Entgiftung von Peroxiden mittels der Glutathion-Peroxidase kommt bei Plasmodien nicht vor. Das Thioredoxin-System besteht aus Thioredoxinreduktase (TrxR), und Thioredoxin ($\text{Trx}(\text{SH})_2$). Es liefert Reduktionsäquivalente für die Synthese von DNA-Bausteinen und ist Elektronendonator für Trx-abhängige Peroxidasen (TrxPx), welche ebenfalls Peroxide entgiften. Die beiden Systeme sind in Kontakt, da GSSG durch Thioredoxin reduziert werden kann (gestrichelte Linie). Das tiefgestellte „Ox“ kennzeichnet die Disulfidform, das tiefgestellte „Red“ die Dithiolform eines Proteins [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2005].

Das Enzym besitzt also insgesamt zwei Bindestellen für NADPH und FAD, sowie zwei Glutathiondisulfid-Bindestellen (aktive Zentren). Abbildung 1.9 zeigt die Anordnung der funktionellen Bereiche auf Sequenzebene.

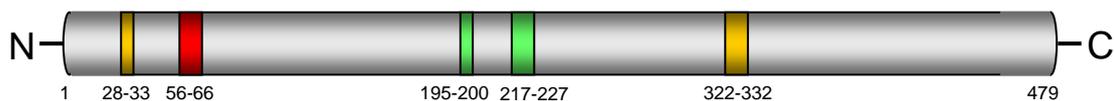
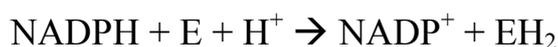


Abbildung 1.9 Funktionelle Elemente der humanen Glutathion-Reduktase (Monomer). Die Abbildung zeigt die Anordnung funktioneller Bereiche eines Monomers der humanen Glutathion-Reduktase auf Sequenzebene (orange: FAD-Bindestellen, grün: NADPH-Bindestellen, rot: aktives Zentrum).

Bei der Reduktion von GSSG werden Reduktionsäquivalente, welche aus dem Hexosemonophosphat-Weg stammen, von NADPH auf die prosthetische Gruppe FAD und von dort über die redox-aktive Disulfidbrücke (Cys58-Cys63 bei der humanen GR) auf GSSG übertragen [PAI & SCHULZ, 1983]. Die Reaktion verläuft also in zwei Halbreaktionen. Bei der ersten Halbreaktion wird das Enzym (E) reduziert:



und bei der zweiten Halbreaktion das Substrat:



Durch die Reduktion von GSSG wird ein hohes Verhältnis [GSH/GSSG] von 20 bis 1000:1 aufrechterhalten.

Sowohl die humane GR (hGR) als auch die GR von *Plasmodium falciparum* (pfGR) sind validierte Zielproteine für die Entwicklung von Medikamenten. So ist die hGR ein Angriffspunkt einiger Cytostatika wie z. B. Carmustine (BiCNU®, Gliadel®). Das Medikament BiCNU (1,3-Bis-[2-Chloroethyl]-2-Nitroso-Harnstoff) wird wegen seiner Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu durchqueren vor allem zur Therapie von Gehirntumoren (z. B. *Glioblastoma multiforme*) eingesetzt. Unter physiologischen Bedingungen wird es abgebaut, und das Abbauprodukt Chloroethylisocyanat führt dann zu einer Carbamoylierung an dem katalytisch aktiven Cys58 [KARPLUS *et al.*, 1988]. Dadurch wird die hGR gehemmt (IC_{50} : 55,5 μM) und GSSG nicht mehr zu GSH reduziert. Somit steigt zum einen der oxidative Stress für die Krebszellen und zum anderen wird die Desoxyribonukleotid-Synthese gehemmt, was schließlich zum Absterben

der Zellen führt [YANG *et al.*, 2005; SCHALLREUTER *et al.*, 1990]. Neben den eigentlichen aktiven Zentren (GSSG-Bindestellen), wo Inhibitoren wie z. B. Carmustine (s. o.) kovalent binden, besitzt die GR noch eine weitere Bindestellen für Inhibitoren: eine Kavität an der Dimer-Achse

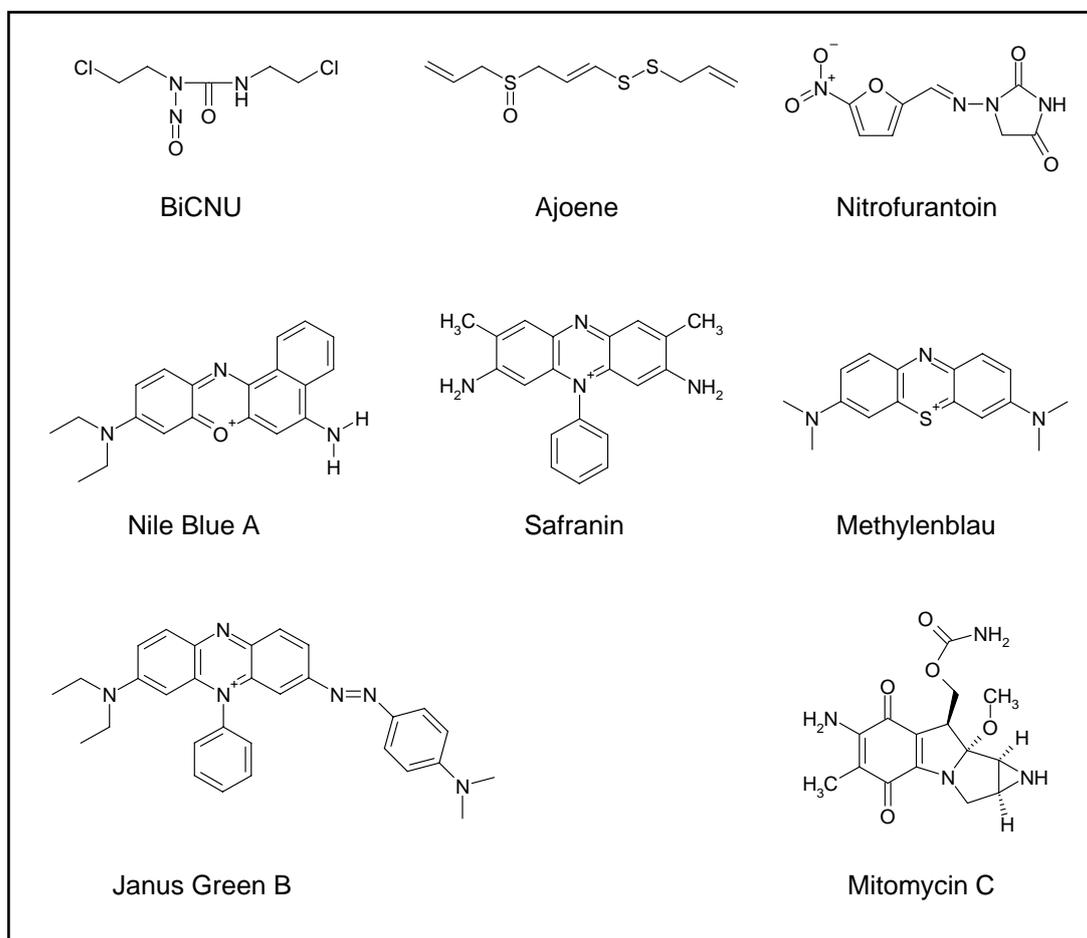


Abbildung 1.10 Inhibitoren der Glutathion-Reduktase. BiCNU ist ein kovalenter Inhibitor der GR und bindet an das redoxaktive Cys58 [KARPLUS *et al.*, 1988]. Ajoene ist ebenfalls ein kovalenter Inhibitor und gleichzeitig ein subversives Substrat (siehe 1.2.2) der GR [GALLWITZ *et al.*, 1999], wohingegen Nitrofurantoin ausschließlich als solches dient, das Enzym aber nicht inhibiert [MURAKAMI *et al.*, 1989]. Nile Blue A, Safranin, Methylenblau und Janus Green B binden über einen nicht-kovalenten Bindungsmodus in der Dimer-Kavität [LUOND *et al.*, 1998; SAVVIDES & KARPLUS, 1996; FARBER *et al.*, 1998; VENNERSTROM *et al.*, 1995]. Mitomycin C dagegen ist kompetitiv zu dem Coenzym FAD und führt somit zu einer Inhibierung des Enzyms [OKUDA *et al.*, 1989].

(Dimer-Kavität, DK), welche von Aminosäuren beider Untereinheiten gebildet wird (siehe Abb. 3.2). Inhibitoren binden über verschiedene Wechselwirkungen in der DK, nicht jedoch über einen kovalenten Me-

chanismus. Die biologische Funktion der DK ist bis jetzt unklar. Es wird jedoch vermutet, dass durch die Bindung von Substanzen in dieser Kavität ein Elektronenfluss unterbrochen wird. Eventuelle aus der Bindung von Inhibitoren resultierende Konformationsänderungen des Proteins (allosterische Inhibierung) können weitestgehend ausgeschlossen werden. Abbildung 1.10 zeigt eine Übersicht über einige Inhibitoren der GR. Neben ihrer Verwendung als Zielprotein zur Entwicklung von Cytostatika, ist die hGR auch ein Angriffspunkt von Antimalaria-Medikamenten [ZHANG *et al.*, 1988a, b; KRAUTH-SIEGEL & COOMBS, 1999]. Dies beruht darauf, dass Plasmodien während ihrer Entwicklung im menschlichen Wirt ein intraerythrocytäres Stadium durchlaufen. Wird nun die hGR der Erythrocyten gehemmt, wächst der oxidative Stress für den Parasiten massiv an, so dass dieser in seiner Lebensfähigkeit eingeschränkt wird. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Plasmodien empfindlicher gegen oxidativen Stress sind als Erythrocyten, so dass eine teilweise Inhibierung des Enzyms ausreicht, um die Plasmodien zu schädigen. Diese Sensitivität der Plasmodien gegenüber oxidierenden Agentien, die wie bereits erwähnt, auf der Tatsache beruht, dass die Parasiten keine Katalase und Glutathion-Peroxidase besitzen, macht auch die pfGR zu einem sehr geeigneten Zielprotein für die Entwicklung von Antimalaria-Medikamenten. So ist die pfGR z. B. das Zielprotein von Methylenblau, einem Medikament, das lange Jahre erfolgreich zur Bekämpfung der Malaria eingesetzt wurde [FARBER *et al.*, 1998].

1.2.2 Trypanothion-Reduktase

In der Ordnung *Kinetoplastida* ist das Glutathion/Glutathion-Reduktase-System durch Trypanothion und Trypanothion-Reduktase ersetzt. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Trypanothiondisulfid (TS₂) zu Trypanothion (T(SH)₂):

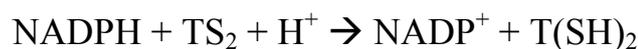
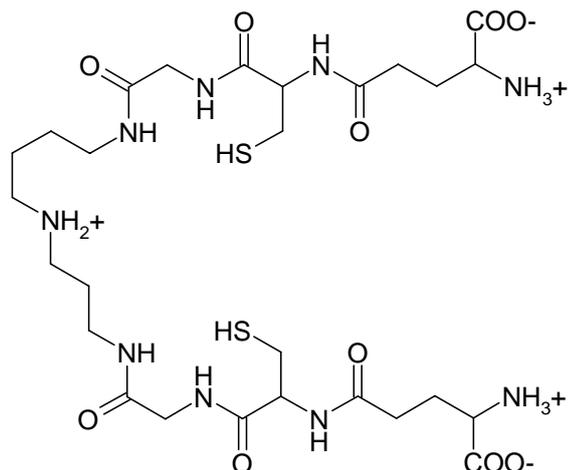


Abbildung 1.11 Trypanothion. Diese Abbildung zeigt die Strukturformel von reduziertem Trypanothion (T(SH)₂). T(SH)₂ besteht aus zwei Glutathion-Molekülen, welche über eine Spermidinbrücke miteinander verbunden sind. Es stellt ein äußerst wichtiges Antioxidans dar. Durch die Oxidation von T(SH)₂ entsteht eine interne Disulfidbrücke [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2005].



Durch diesen spezifischen Redoxstoffwechsel unterscheiden sich die Kinetoplastiden von fast allen anderen Eukaryoten und Prokaryoten, die meist ein Glutathion- und/oder Thioredoxin-System besitzen. Dadurch

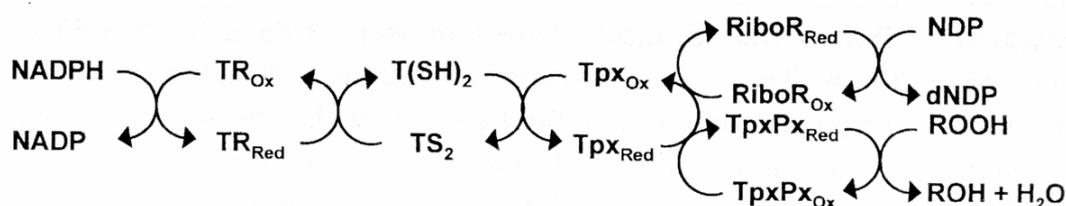


Abbildung 1.12 Dithiolgestütztes Redoxsystem in Trypanosomen. In Trypanosomen überträgt eine Kaskade aus TR, T(SH)₂ und Tpx (Tryparedoxin) Elektronen von NADPH auf die Ribonukleotidreduktase (RiboR), welche die Reduktion von Nucleosiddiphosphaten (NDP) zu Desoxynucleosiddiphosphaten (dNDP) katalysiert, sowie auf TpxPx (Tryparedoxin-Peroxidase), die Hydroperoxide entgiftet [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2005].

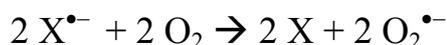
sind die Proteine, die in diesen Stoffwechselweg involviert sind, sehr attraktive Zielproteine für die Entwicklung von trypanoziden Medikamenten [KRAUTH-SIEGEL & INHOFF, 2003; PINEYRO *et al.*, 2005]. Andere Organismen, welche auch einen Trypanothion-Stoffwechsel besitzen, sind *Euglena gracilis* [MONTRICHARD *et al.*, 1999] und *Entamoeba histolytica*, dem Erreger der Amöbenruhr [TAMAYO *et al.*, 2005]. Das Trypanothion-System ersetzt in den Kinetoplastiden wahrscheinlich nicht nur das Glutathion-System, sondern auch die Funktion der Thioredoxin-Reduktase. Das Thiol-Polyamin-Konjugat Trypanothion besteht aus zwei Glutathion-Molekülen, welche über eine Spermidin-Brücke miteinander verbunden

sind (siehe Abb. 1.11) und stellt, ebenso wie Glutathion, ein äußerst wichtiges Antioxidans dar. Ein wesentlicher Unterschied ist dagegen, dass Trypanothion ein Dithiol ist. Durch reversible Oxidation der beiden SH-Gruppen eines Trypanothion-Moleküls entsteht eine interne Disulfidbrücke. Analog zu GSH ist T(SH)₂ an der Entgiftung von Wasserstoffperoxid sowie organischen Peroxiden, an der Desoxynukleotid-Synthese und an der Detoxifikation von Wirkstoffen und Ketoaldehyden beteiligt [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2003]. Die trypanothionabhängige Entgiftung von Hydroperoxiden ist für Trypanosomen von entscheidender Bedeutung, da sie aufgrund der fehlenden Katalase (siehe 1.2) nur niedrige Hydroperoxidspiegel tolerieren. An dieser Entgiftung sind neben T(SH)₂ noch Tryparedoxin (Tpx) und die Tryparedoxin-Peroxidase (TpxPx) beteiligt, welche ebenfalls potentielle Zielproteine zur Entwicklung von Antitrypanosomiasis-Medikamenten darstellen [STEINERT *et al.*, 1999] (siehe Abb. 1.12). Durch die Detoxifikation von Wirkstoffen, welche sowohl das Ausschleusen als auch die Sequestrierung von Thiol-Wirkstoffkonjugaten beinhaltet, spielt Trypanothion auch eine wichtige Rolle bei der Medikamentenresistenz [LEGARE *et al.*, 1997]. In Leishmanien ist an diesem Detoxifikationsprozess wahrscheinlich das Protein PGPA (P-Glycoprotein-ähnliches Protein A) beteiligt. Dieses ATP-abhängige Protein ist in der Lage, Metall-Thiol-Konjugate durch die Zellmembran zu translozieren. Eine Überexpression des eng verwandten „*Multidrug resistance-associated protein A*“ (MRPA) in *T. brucei* führt zu einem 10-fachen Anstieg des IC₅₀-Wertes für Melarsoprol [SHAHI *et al.*, 2002; ALIBU *et al.*, 2006]. Die oben erwähnte Detoxifikation von Ketoaldehyden erfolgt allgemein durch eine glutathionabhängige Dismutation zu Hydroxysäuren und wird durch die Enzyme Glyoxalase I und II katalysiert. Durch diese Enzyme wird z. B. auch das cytotoxische und mutagene Methylglyoxal, das als Nebenprodukt der Glycolyse anfällt, entgiftet. In Trypanosomen jedoch ist auch bei dem Glyoxalase-System Glutathion durch Trypanothion ersetzt [GREIG *et al.*, 2006]. Dies alles zeigt, dass Trypanothion von sehr großer Wichtigkeit für die Kinetoplastiden ist und die TR somit ein sehr attraktives Zielmolekül für die Medikamentenentwicklung darstellt. Analog zur GR besitzt auch die TR zwei Bindestellen für Inhibito-

ren: das aktive Zentrum und ebenfalls eine Kavität an der Dimer-Achse. An diese Stellen können z. B. Polyamine, tricyclische Verbindungen (Acridine, Phenothiazine), Aminodiphenylsulfide, Platinkomplexe usw. binden, welche die TR reversibel bzw. irreversibel inhibieren. Eine weitere wichtige Gruppe von Inhibitoren der Disulfidreduktasen sind die subversiven Substrate, die auch als *Turncoat*-Inhibitoren bezeichnet werden [CENAS *et al.*, 1994; GALLWITZ *et al.*, 1999]. Diese Moleküle ändern die antioxidative Aktivität dieser Enzyme zu einer prooxidativen Aktivität um. Typischerweise wird ein subversives Substrat (X) durch eine Disulfidreduktase in einem Einelektronenschritt zum entsprechenden Radikal reduziert:



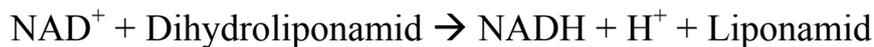
Dieses reagiert dann mit molekularem Sauerstoff zum Superoxidradikal, wobei das subversive Substrat regeneriert wird:



Dies hat zur Folge, dass die eigentlichen Substrate der Disulfidreduktasen nur noch eingeschränkt reduziert und NADPH und O₂ zu Erzeugung von Radikalen verbraucht werden. Somit wird der oxidative Stress in der Zelle erhöht. Beispiele für subversive Substrate der TR sind Nitrofurane und Naphtochinone wie Menadion, Plumbagin und Lapachol [BLUMENSTIEL *et al.*, 1999; SALMON-CHEMIN *et al.*, 2001].

1.2.3 Liponamid-Dehydrogenase

Ein weiteres Zielprotein für die Entwicklung von Antitrypanosomiasis-Medikamenten ist die Liponamid-Dehydrogenase, welche die E3-Untereinheit der drei α -Ketosäuren-Dehydrogenase-Komplexe (Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und *branched-chain* α -Ketosäuren-Dehydrogenase-Komplex) bildet [KRAUTH-SIEGEL & SCHONECK, 1995]. Sie katalysiert die Oxidation von proteingebundenem Liponamid:



Liponamid (siehe Abb. 1.13) ist in zahlreichen enzymatischen Reaktionen, wie oxidativen Decarboxylierungen, als Coenzym beteiligt, wo es für Acyl-Gruppen- und Wasserstoff-Transfer verantwortlich ist. Dabei wird das Coenzym zur Dihydroliponsäure reduziert und muss zur weiteren Verwendung wieder durch Oxidation regeneriert werden.

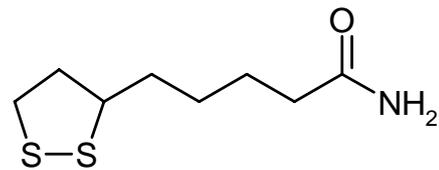


Abbildung 1.13 Liponamid. Diese Abbildung zeigt die Strukturformel von oxidiertem Liponamid. Es ist in zahlreichen enzymatischen Reaktionen als Coenzym beteiligt.

Darüber hinaus katalysiert die LipDH auch die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol [XIA *et al.*, 2001]. Neben seiner Rolle als Elektronentransport-Komponente in der mitochondrialen Atmungskette, schützt Ubichinol auch die Zellmembranen vor Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffspezies. Diese kann zur Zerstörung der Membranen und Änderungen in der Fluidität der Fettsäuren führen, was u. U. einen Funktionsverlust von Rezeptoren und Ionenkanälen zur Folge hat. Weiterhin spielt die LipDH vermutlich eine Rolle bei der Glucose-Aufnahme der *long slender*-Formen afrikanischer Trypanosomen. In diesem Entwicklungsstadium der Trypanosomen ist die LipDH mit der inneren Oberfläche der Plasmamembran assoziiert. Ein Liponsäure-abhängiger Import von Zuckern wird auch für *Escherichia coli* diskutiert [RICHARME, 1985].

Abgesehen von Carmustine, welches auch die GR hemmt (siehe 1.2.1), Melarsenoxid, welches ebenfalls Enzyme mit benachbarten SH-Gruppen inhibiert, und einigen subversiven Substraten (z. B. Naphtochinone), sind für die LipDH keine Inhibitoren bekannt. Unter den subversiven Substraten der LipDH befinden sich jedoch auch Nitrofuranderivate wie Nifurtimox, welches zur Therapie der akuten Phase der Chagas-Krankheit verwendet wird (siehe 1.1.2.2) [KRAUTH-SIEGEL & SCHONECK, 1995]. Dieses wird von der LipDH in einem Einelektronenschritt reduziert, was zur Bildung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 führt.

Ebenso wie die TR und GR besitzt die LipDH zwei potentielle Bindestellen für Inhibitoren: die Substratbindestellen und eine Kavität an der Dimer-Achse.

1.3 Arzneimittelforschung gestern und heute

Die systematische Suche nach Wirkstoffen für Arzneimittel begann etwa in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Damals wurden chemische Substanzen ungezielt auf ihre Wirksamkeit in biologischen Systemen getestet (*random screening*). Eines der bekanntesten Erfolgsbeispiele dieser Art von Wirkstofffindung ist die Acetylsalicylsäure, welche 1897 von Felix Hoffmann entdeckt wurde und unter dem Namen Aspirin® Weltruhm erlangte [BÖHM *et al.*, 2002]. Aber auch viele Antibiotika und Antiparasitika, die heute noch in Gebrauch sind, wurden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts mittels *random screening* entdeckt [MONAGHAN & BARRATT, 2006; MCKELLAR & JACKSON, 2004; ROOS *et al.*, 2001]. In den 1960er Jahren schließlich ging die Zahl neuentwickelter Medikamente stark zurück. Dies ist möglicherweise auf eine verminderte Erfolgsrate des ungezielten *Screenings*, steigende Kosten für Forschung und Entwicklung sowie strengere Regelungen in der Arzneimittelsicherheit zurückzuführen. Bei den Infektionskrankheiten und Parasitosen spielte zusätzlich auch noch ein verstärktes Auftreten von Resistenzen eine wichtige Rolle [FURUYA & LOWY, 2006; JONES & GEORGE, 2005].

Heutzutage hat sich durch die Sequenzierung ganzer Genome und die Generierung der dazugehörigen biologischen Information (*Genomics* bzw. *Functional Genomics*) der klassische Forschungsansatz umgekehrt. So ermöglicht die ineinandergreifende Nutzung moderner Technologien wie Bioinformatik, Chemoinformatik, HTS (*High-Throughput-Screening*) und kombinatorischer Chemie einen Prozess der Wirkstofffindung, der von einem Zielprotein (*Drug Target*) ausgeht. Ein solches Zielprotein besitzt eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung oder im Verlauf einer Krankheit und dient als Angriffspunkt für chemische Substanzen, die dieses Protein entweder inhibieren oder aktivieren. Dadurch wird der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst bzw. im besten Fall die Krankheit geheilt. Dieser auch als *Target-based Approach* bezeichnete Ansatz gliedert sich

in fünf Schritte [SELZER *et al.*, 2000; SELZER *et al.*, 2004; SELZER, 2005]. Der erste Schritt umfasst die Identifizierung eines Zielproteins, welche sowohl mittels klassischer molekularbiologischer Techniken und Hochdurchsatz-Methoden, als auch mit bioinformatischen Verfahren durchgeführt werden kann. Im nächsten Schritt (*Target-Validierung*) wird überprüft, ob eine Inhibierung oder Aktivierung des Zielproteins wirklich den gewünschten Effekt auf den Krankheitsverlauf zeigt. Neben der biologischen Validierung potentieller Zielproteine (z. B. durch *loss of function*- oder *gain of function*-Mutationen in Tiermodellen oder *RNA interference* (RNAi)) kann auch eine chemische Validierung durch bereits bekannte Antagonisten oder Agonisten durchgeführt werden. Der dritte Schritt des *Target-based Approach* besteht aus der Identifikation von Leitstrukturen, also kleiner chemischer Moleküle, welche agonistisch oder antagonistisch mit dem Zielprotein interagieren. Hierzu werden in Hochdurchsatz-Reihenuntersuchungen die einzelnen Substanzen großer chemischer Substanzbibliotheken auf ihre Fähigkeit untersucht, die Aktivität des Zielproteins in gewünschter Weise zu beeinflussen. Ein alternativer Ansatz zur Ermittlung interagierender Substanzen ist das virtuelle *Screening*. Dabei werden chemische Substanzen *in silico*, d. h. mit Hilfe von Computern, auf eine Interaktion mit dem Zielprotein getestet (rationales Wirkstoffdesign, siehe 1.4). Die mit diesen Methoden identifizierten Substanzen weisen, abgesehen von der Wirkung auf das Zielprotein, natürlich noch nicht alle Eigenschaften eines pharmazeutischen Wirkstoffes auf. Deswegen werden die Leitstrukturen im nächsten Schritt einer chemischen Optimierung unterzogen. Dabei werden die Substanzen solange modifiziert bis sie in verschiedenen Parametern (z. B. Selektivität, Wirkstärke und -dauer, Bioverfügbarkeit und Toxizität) dem geforderten Profil entsprechen. Abschließend werden die optimierten Leitstrukturen auf ihre biologische Wirksamkeit im Zielorganismus getestet [BÖHM *et al.*, 2002; SELZER, 2005].

1.4 Chemoinformatik und rationales Wirkstoffdesign

In der modernen Wirkstoffforschung kommen neben den klassischen *in vitro*- und *in vivo*-Methoden in den letzten Jahren auch verstärkt *in silico*-

Verfahren wie Bioinformatik und Chemoinformatik zum Einsatz. Diese Verfahren können die klassischen Methoden nicht ersetzen, sondern diese vielmehr ergänzend unterstützen. Unter dem Begriff Bioinformatik versteht man die Anwendung informatischer Methoden auf große biologische Datenmengen, z. B. Sequenzdaten. Diese Daten werden gespeichert, organisiert und analysiert mit dem Ziel, neue Informationen daraus abzuleiten und biologische bzw. medizinische Fragestellungen zu beantworten [LESK, 2005; SELZER *et al.*, 2004]. Dabei verwendet die Bioinformatik unter anderem Methoden wie Sequenzanalysen, Bestimmung orthologer Proteine, sowie *Datamining* in Proteinmotiv- und Strukturdatenbanken. Die Chemoinformatik dagegen beschäftigt sich allgemein mit der Anwendung informatischer Methoden zur Lösung chemischer Problemstellungen [GASTEIGER, 2006]. Dazu gehören vor allem die Aufbereitung virtueller chemischer Strukturen und ihre Verwaltung in Datenbanken, die Berechnung chemischer Eigenschaften und ADMET-Parameter (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity*), sowie die Methoden des rationalen Wirkstoffdesigns. Diese umfassen beispielsweise die Ableitung quantitativer Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) [BROWN & LEWIS, 2006], *de novo* Design [SCHNEIDER & FECHNER, 2005], die Homologie-Modellierung (siehe 1.4.1) [FISER & SALI, 2003], Pharmakophor-Analysen (siehe 1.4.2) [STEINDL *et al.*, 2006] und molekulares *Docking* (siehe 1.4.3) [CHEN *et al.*, 2006].

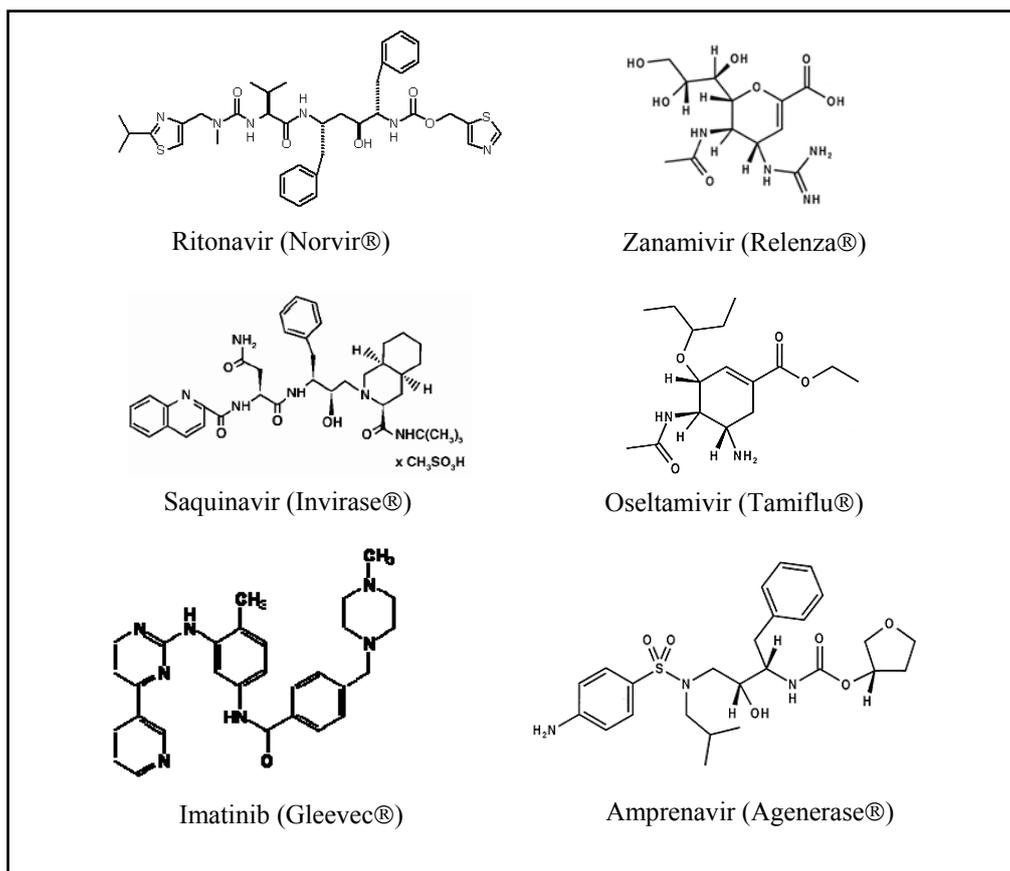


Abbildung 1.14 Medikamente, bei deren Entwicklung rationales Wirkstoffdesign beteiligt war. Bei Agenerase®, Invirase® und Norvir® handelt es sich um HIV-Protease-Inhibitoren. Gleevec® wird zur Behandlung der Chronischen Myeloiden Leukämie eingesetzt. Relenza® und Tamiflu® dienen zur Behandlung der Influenza [Lit. siehe Text].

Erfolgsbeispiele, bei deren Entwicklung rationales Wirkstoffdesign maßgeblich beteiligt war, sind Medikamente wie Imatinib (Gleevec®) [AYOUB *et al.*, 2005], ein Medikament zur Behandlung der Chronischen Myeloiden Leukämie, Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®) [MACDONALD, 2000] zur Behandlung von Influenza sowie Amprenavir (Agenerase®) [BROPHY *et al.*, 2000], Saquinavir (Invirase®) [REGAZZI *et al.*, 1999] und Ritonavir (Norvir®) [ARVIEUX & TRIBUT, 2005], drei HIV-Protease-Inhibitoren (siehe Abb. 1.14).

1.4.1 Homologie-Modellierung

Methoden wie proteinbasierte Pharmakophor-Analysen (siehe 1.4.2) oder molekulares *Docking* (siehe 1.4.3) sind auf die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Zielproteins angewiesen (siehe Abb. 1.15). Diese Strukturen werden üblicherweise mit Hilfe der Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Solche Verfahren sind jedoch sehr zeit- und kostenaufwendig und können nicht für jedes Zielprotein von In-

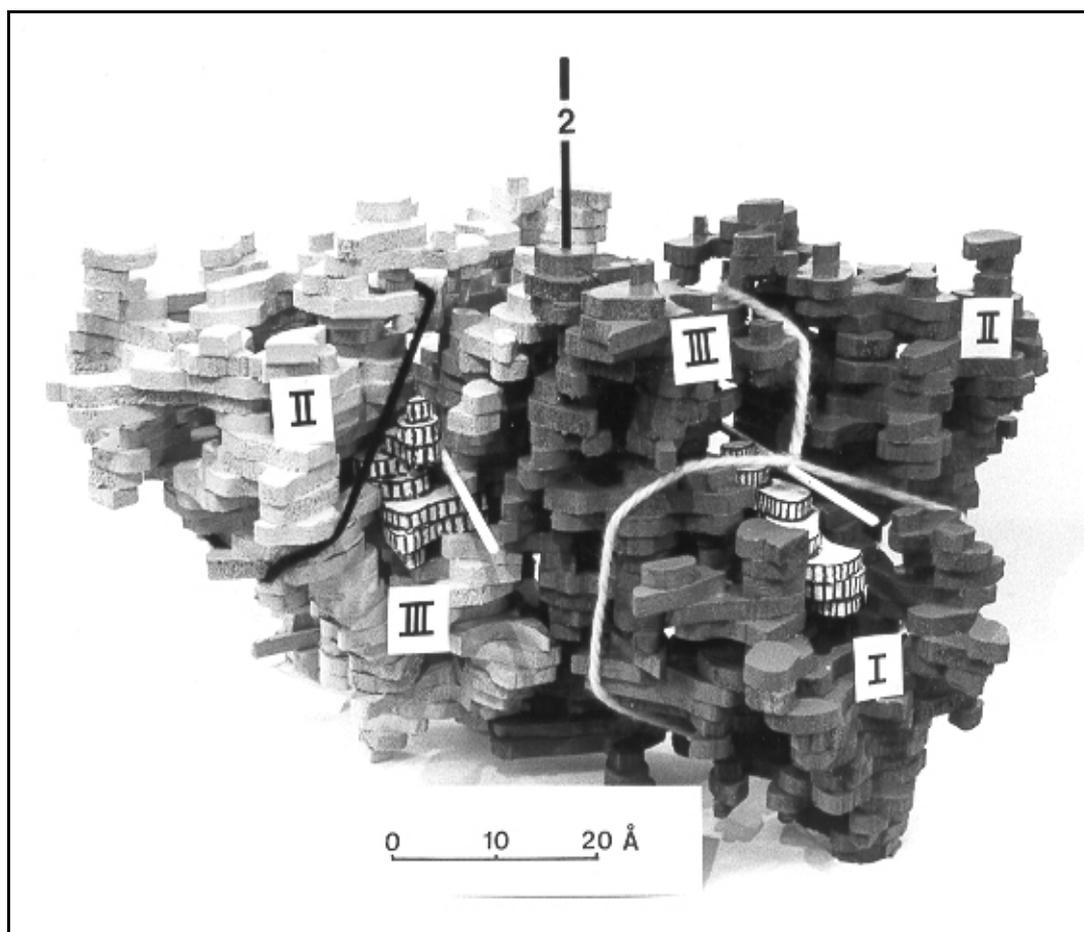


Abbildung 1.15 Balsaholzmodell der humanen Glutathion-Reduktase. Die Abbildung zeigt ein Balsaholzmodell der humanen Glutathion-Reduktase (siehe 1.2.1) basierend auf einer frühen Röntgenkristallstrukturanalyse des Enzyms (Auflösung: 6Å (0,6nm)) [ZAPPE *et al.*, 1977].

teresse durchgeführt werden. Bisweilen wird die Strukturaufklärung auch durch andere Faktoren verhindert, insbesondere durch mangelhafte Kristallisation membrandurchspannender Proteine wie z. B. G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Deswegen bedient man sich oftmals verschiedener

Strukturvorhersagemethoden, wie beispielsweise der Homologie-Modellierung. Dieses Verfahren beruht auf der Annahme, dass homologe Proteine, die ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen, normalerweise auch ähnliche Faltungsmuster zeigen. Ist nun von einem Protein, welches eine gewisse Sequenzidentität zu dem Zielprotein aufweist, die dreidimensionale Struktur bereits bekannt, kann diese als Vorlage (Templat) für die Modellierung der Struktur des Zielproteins verwendet werden [SELZER *et al.*, 2004]. Zu Beginn der Homologie-Modellierung wird zunächst immer ein Sequenz-*Alignment* zwischen den Sequenzen des Zielproteins und des Templat-Proteins angefertigt (siehe Abb. 1.16). Je höher die Sequenzidentität zwischen Zielprotein und Templat-Protein ist, desto höher ist auch die Qualität der berechneten Homologie-Modelle. Diese wird außerdem von der Auflösung der Templat-Struktur beeinflusst. Stimmen die Aminosäuren zwischen Zielprotein und Templat-Protein überein, werden die Raumkoordinaten des Templat-Proteins für die Modellstruktur übernommen. Ist dies nicht der Fall, wie in nicht oder nur schwach konservierten Bereichen, werden die Raumkoordinaten der Aminosäuren der Modellstruktur anhand von Rotamer-Bibliotheken bestimmt. Diese enthalten verschiedene mögliche Ausrichtungsmuster von Aminosäureseitenketten. Die nicht konservierten Regionen bilden häufig auch Schleifen (*Loops*) aus, für welche im Anschluss an die Modellierung ein spezieller *Refinement*-Schritt durchgeführt wird. Interessanterweise finden sich die weniger konservierten Bereiche oft an der Oberfläche der Proteine und haben so kaum Einfluss auf die strukturell konservierten Regionen im Inneren der Proteine, wo meist auch das aktive Zentrum lokalisiert ist [SELZER *et al.*, 2004]. Nach der Modellierung erfolgt eine Beurteilung des Modells anhand verschiedener Parameter wie Gesamtenergie, Kollisionen von Atomen usw. [BÖHM *et al.*, 2002; FORSTER, 2002]. Abbildung 1.17 zeigt ein Beispiel einer Homologie-Modellierung einer Aldehyd-Dehydrogenase von *Caenorhabditis elegans*. Um geeignete Template für die Homologie-Modellierung des Zielproteins zu identifizieren, wurde mit dieser Proteinsequenz eine BLAST-Suche [ALTSCHUL *et al.*, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1997] in der Protein-Strukturdaten-

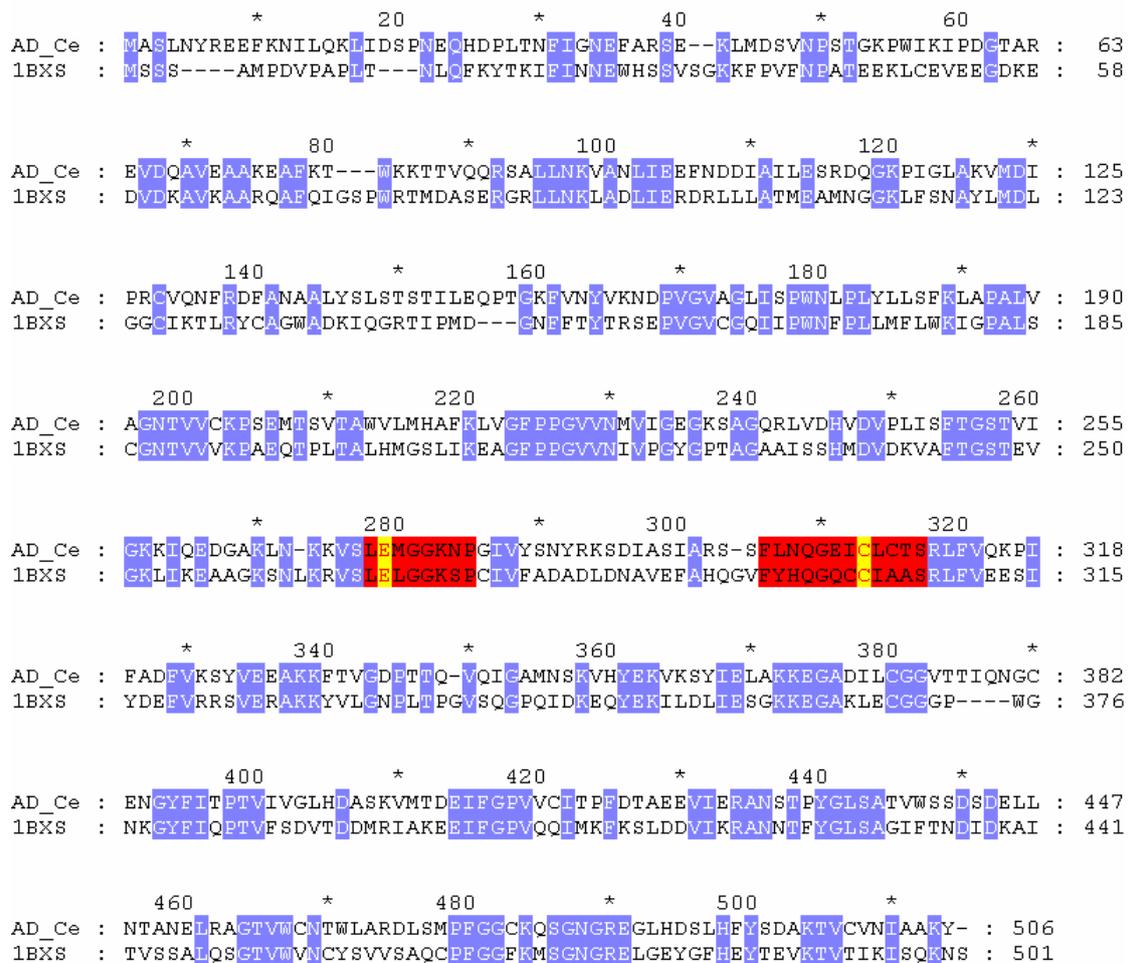


Abbildung 1.16 Alignment einer Aldehyd-Dehydrogenase von *Caenorhabditis elegans* (AD_Ce) mit der Sequenz der Templat-Struktur von *Ovis aries* (1BXS). Identische und ähnliche Aminosäuren sind blau hinterlegt. Sequenzbereiche, welche zum aktiven Zentrum gehören, sind rot, die katalytischen Aminosäuren gelb markiert.

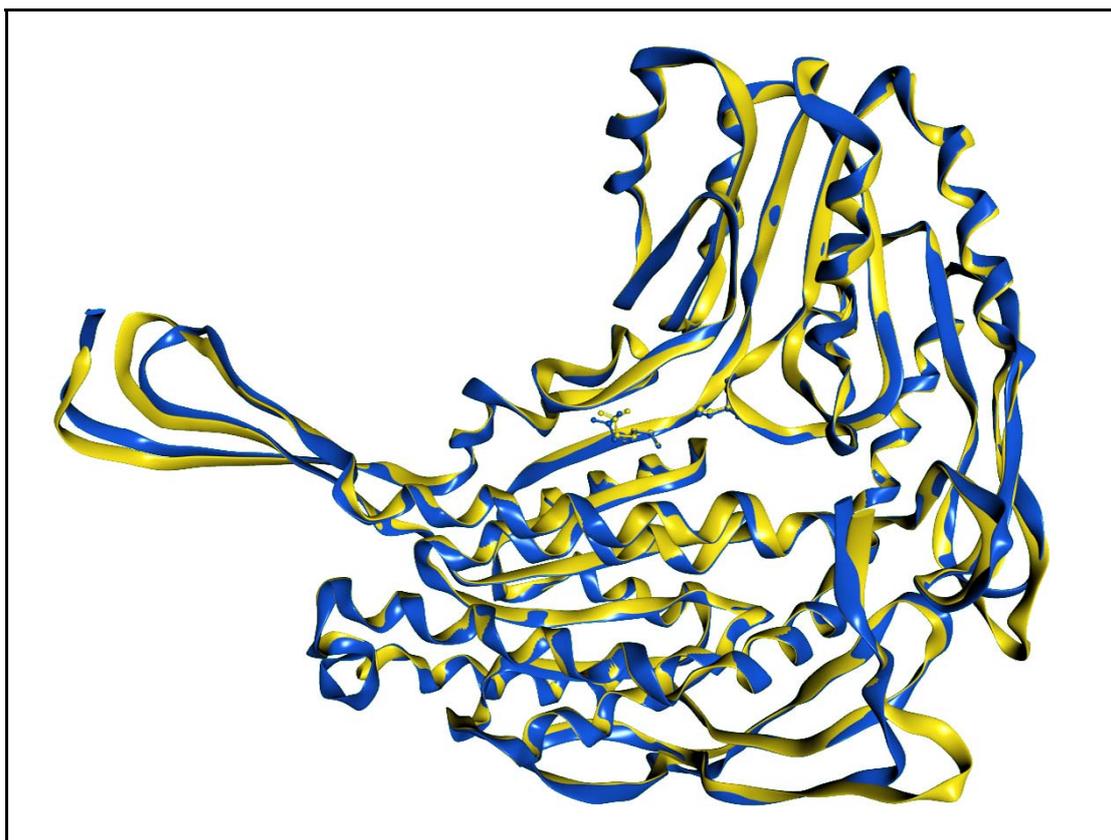


Abbildung 1.17 Homologie-Modell einer Aldehyd-Dehydrogenase von *Caenorhabditis elegans*. Die Abbildung zeigt die Sekundärstruktur des berechneten Homologie-Modelles (gelb) und die Sekundärstruktur des Templates (blau) von *Ovis aries* (PDB-Acc.-Nr.: 1BXS) [MOORE *et al.*, 1998]. Die Aminosäuren Glu und Cys des aktiven Zentrums (siehe Abb. 1.16) sind in *ball-and-stick*-Darstellung gezeigt.

bank PDB [BERMAN *et al.*, 2003] durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Aldehyd-Dehydrogenase von *Ovis aries* (PDB-Acc.-Nr.: 1BXS) aufgrund der relativ hohen Auflösung (2,35 Å) und des Grades der Konservierung (39% Sequenzidentität bzw. 57% Sequenzähnlichkeit) als Templat-Struktur für die Homologie-Modellierung am besten geeignet war.

1.4.2 Pharmakophor-Analysen

Als Pharmakophor-Modell bezeichnet man die Anordnung chemischer Eigenschaften (*Features*) im dreidimensionalen Raum. Solche Modelle können von biologisch aktiven Liganden eines Proteins (ligandbasiertes Pharmakophor-Modell) oder von der Bindetasche eines Proteins (proteinbasiertes Pharmakophor-Modell) abgeleitet werden. Bei der Erstellung

von ligandbasierten Pharmakophor-Modellen werden von aktiven Liganden Konformere generiert und diese dann überlagert. Im Anschluss werden aus diesen Überlagerungen chemische Eigenschaften extrahiert, welche bei mehreren Liganden gemeinsam vorkommen. Bei der Auswahl der Liganden, die für die Erstellung der Modelle verwendet werden, ist streng darauf zu achten, dass diese die gleiche Bindetasche im Protein adressieren, da die Modelle ansonsten unspezifisch werden. Bei der Erstellung von proteinbasierten Pharmakophor-Modellen erfolgt eine Analyse der Bindetasche des Proteins sowie der Eigenschaften der an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren. Das aus diesen Eigenschaften abgeleitete Pharmakophor-Modell stellt sozusagen ein Negativ-Abbild der Bindetasche dar. An Positionen, wo sich im Protein z. B. negative Ladungen finden, werden im Pharmakophor-Modell positive Ladungen platziert. Entsprechendes gilt für Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren. Pharmakophor-Modelle zeigen also die für die biologische Wirkung relevanten Eigenschaften eines Liganden bzw. eines Proteins und die räumliche Anordnung derselben. Wichtige chemische Eigenschaften, die bei der Erstellung von Pharmakophor-Modellen berücksichtigt werden, sind z. B. Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren, hydrophobe, aliphatische, aromatische, geladene und ionisierbare Gruppen [BÖHM *et al.*, 2002; YAMASHITA & HASHIDA, 2004]. Diese werden jedoch in den Modellen soweit abstrahiert, dass die jeweiligen Eigenschaften von verschiedenen funktionellen Gruppen dargestellt werden können. Wenn für das Zielprotein eine Kristallstruktur mit einem co-kristallisierten Liganden zur Verfügung steht, ist es – zusätzlich zu den oben erwähnten protein- und ligandbasierten Methoden – auch möglich, solche Modelle aus den Interaktionen eines Liganden mit dem Protein zu erstellen (siehe Abb. 1.18) [KROVAT *et al.*, 2005]. Pharmakophor-Modelle werden im Allgemeinen dazu verwendet, große virtuelle Substanzdatenbanken dahingehend zu filtern, dass die resultierenden Substanzen eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, mit dem Zielprotein zu interagieren. Somit kann die Anzahl der Substanzen, die für *Docking*-Studien (siehe 1.4.3) verwendet werden, im

Vorfeld reduziert werden. Weiterhin können Pharmakophor-Modelle auch dazu verwendet werden, fokussierte Substanzbibliotheken für *in vitro*-Versuche zu erstellen.

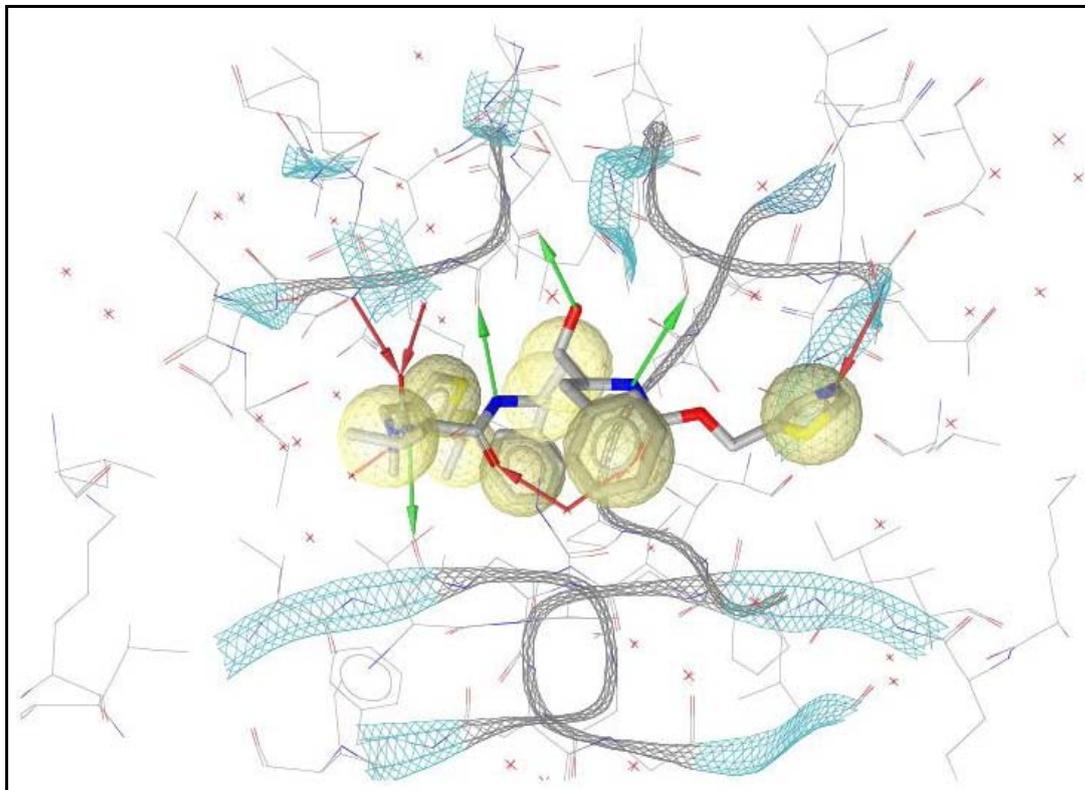


Abbildung 1.18 Pharmakophor-Modell der HIV-Protease. Die Abbildung zeigt die Interaktionen des Inhibitors Ritonavir (siehe Abb. 1.14) mit der HIV-Protease (PDB-Acc.-Nr.: 1HXW) [KEMPF *et al.*, 1995]. Die roten Pfeile symbolisieren Wasserstoffbrückenakzeptoren des Liganden, die grünen Wasserstoffbrückendonoren. Die gelben Sphären dagegen markieren lipophile Bereiche des Inhibitormoleküls.

1.4.3 Docking

Eine weitere Methode des rationalen Wirkstoffdesigns ist das molekulare *Docking*. Darunter versteht man das computergestützte Einpassen kleiner chemischer Strukturen in die räumlich definierte Bindetasche eines Proteins. Dazu wird zunächst der Ligand in der Bindetasche platziert und anschließend auf mögliche Interaktionen mit Aminosäuren des Proteins untersucht (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen, ionische Wechselwirkungen, Metallkomplexe Kation- π -Interaktionen, π - π -Wechselwirkungen). Die hydrophoben Interaktionen sind dabei im We-

sentlichen entropischer Natur, d. h. es handelt sich nicht um direkte Wechselwirkungen. Vielmehr beruht der entropische Beitrag darauf, dass sich für das Ligand-Protein-Wasser-System die Zahl der Freiheitsgrade aufgrund der Assoziation des Liganden an das Protein ändert (BÖHM *et al.*, 2002; KITCHEN *et al.*, 2004). Die o. g. Interaktionen zwischen Protein und Ligand werden mittels *Scoring*-Funktionen bewertet und es erfolgt eine Abschätzung der freien Bindungsenthalpie ΔG zwischen Protein und Ligand. In dieser Bewertung geht zusätzlich eine Abschätzung über die topologische Passform mit ein. *Docking*-Methoden kombinieren also die Vorhersage möglicher Bindungsmodi von Liganden an Proteine mit einer Vorhersage von Affinitäten dieser geometrischen Anordnungen. Zur Durchführung von *Docking*-Studien stehen verschiedene Programme zur Verfügung. Diese unterscheiden sich beispielsweise dadurch, wie die Bindetasche des Proteins beschrieben wird, ob das Protein als teilweise flexibel betrachtet wird, ob der Ligand als flexibel betrachtet wird oder wie die Konformationen der Liganden generiert werden. Zur Erzeugung der Ligandkonformationen gibt es im Wesentlichen drei verschiedene Ansätze: systematische Suchen, Simulationsmethoden und stochastische Suchen. Bei den systematischen Suchen nach Ligandkonformationen, welche z. B. in Programmen wie DOCK [EWING *et al.*, 2001], Hammerhead [WELCH *et al.*, 1996] und auch FlexX [KRAMER *et al.*, 1999] Verwendung finden, wird ein potentieller Ligand zunächst fragmentiert und ein Basis- bzw. Kopffragment in der Bindetasche platziert. Der Rest des Liganden wird im Anschluss inkrementell in der Bindetasche aufgebaut, wobei nur Konformationen mit niedriger Energie und optimalen Wechselwirkungen des Liganden mit dem Protein berücksichtigt werden. Die Simulationsmethoden verwenden Moleküldynamik-Verfahren um Ligandkonformationen zu generieren. Diese sind jedoch sehr rechenintensiv und oftmals nicht in der Lage, in einem vertretbaren Zeitraum hohe Energiebarrieren zu überwinden, so dass u. U. nur ein lokales Minimum der Konformationsenergie des Liganden, jedoch nicht das globale Minimum gefunden wird. Bei den stochastischen Suchen werden auf Zufallsbasis Änderungen an Ligandkonformationen vorgenommen und diese anschließend optimiert. Auch hier kommen die oben erwähnten *Scoring*-

Funktionen zum Einsatz. Das Programm GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) verwendet in diesem Zusammenhang einen genetischen Algorithmus, welcher anhand einer Simulation eines Evolutionsprozesses (Mutation, Rekombination und Selektion von Individuen einer Population) verschiedene Ligandkonformationen generiert [JONES *et al.*, 1995; VERDONK *et al.*, 2003]. Bei dem eigentlichen *Docking*-Prozess hält GOLD die Seitenketten der Aminosäuren und das Rückgrat des Proteins starr. Lediglich die Wasserstoffbrückendonor- und Akzeptor-Gruppen können ihre Position ändern. Der Ligand dagegen wird flexibel gehalten. Wie bereits erwähnt, kommen den *Scoring*-Funktionen zwei verschiedene Aufgaben zu: Optimierung der Ligandkonformationen und Bewertung der Interaktionen zwischen Protein und Ligand. Durch die Bewertung dieser Interaktionen ist es möglich, eine ungefähre Abschätzung über die Bindungsaffinität der Liganden zu treffen. Jede *Scoring*-Funktion gewichtet dabei die verschiedenen Interaktionen zwischen Protein und Ligand (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen) unterschiedlich stark, sodass im Vorfeld evaluiert werden muss, welche *Scoring*-Funktion am besten für die Bewertung des vorliegenden Bindungsmodus geeignet ist. Man unterscheidet zwischen wissensbasierten, kraftfeldbasierten und empirischen *Scoring*-Funktionen [STAHL & RAREY, 2001]. Die wissensbasierten Funktionen leiten sich aus experimentell bestimmten Protein-Ligand-Komplexen ab und beschreiben einfache Interaktionstypen. Die kraftfeldbasierten Methoden verwenden vor allem elektrostatische und van-der-Waals-Interaktionen, welche anhand von Lennard-Jones-Potentialfunktionen beschrieben werden [SCHULZ-GASCH & STAHL, 2004]. Bei den empirischen Verfahren werden Terme verwendet, welche voneinander unabhängige Bindungseigenschaften bewerten. Diese Terme werden so optimiert, dass eine Korrelation zwischen biologischer Aktivität und dem errechneten *Scoring*-Wert entsteht [KITCHEN *et al.*, 2004; SCHNEIDER & BÖHM, 2002]. Das Programm GOLD stellt zwei *Scoring*-Funktionen zur Verfügung: GOLDScore (kraftfeldbasiert) [VERDONK *et al.*, 2003] und ChemScore (empirisch) [ELDRIDGE *et al.*, 1997; ANNAMALA *et al.*, 2007]. Darüber hinaus ist es möglich, benutzerdefinierte *Scoring*-Funktionen zu nutzen.

1.4.4 Virtuelles Screening

Der Begriff „virtuelles Screening“ oder auch „*virtual High-Throughput-Screening*“ (vHTS) umfasst alle Methoden der computergestützten Suche in sehr großen Substanzdatenbanken, so auch die Pharmakophor-Suchen (siehe 1.4.2) und das *Docking* (siehe 1.4.3) [SEIFERT *et al.*, 2007; KITCHEN *et al.*, 2004]. Das Ziel dieser Verfahren ist es, aus großen Substanzdatenbanken diejenigen Substanzen herauszufiltern, die möglicherweise mit einem Zielprotein interagieren und somit als Leitstrukturen für die Entwicklung von Wirkstoffen verwendet werden können. Ein entscheidender Vorteil dieser Methoden besteht darin, dass die Substanzen zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Realität vorliegen müssen und daher auch synthetisch schwer zugängliche Moleküle auf ihre potentielle Wirkung am Zielprotein untersucht werden können. Jedoch benötigen diese Verfahren aufgrund des hohen Rechenaufwandes oft sehr viel Zeit. Dies gilt insbesondere für das *Docking*. So benötigt das „Docken“ eines Liganden mit der *Software* GOLD im exaktesten *Docking*-Modus auf einer SGI-*Workstation* ca. 45min. Dieser Zeitbedarf ist natürlich zum Durchsuchen einer Datenbank mit mehreren Millionen Substanzen nicht zweckmäßig. Abhilfe schafft hier zum einen die Optimierung der Parameter des genetischen Algorithmus, sodass vertretbar „unexakte“ Ergebnisse in kürzeren Zeiträumen erreicht werden können und zum anderen die Verwendung von leistungsfähigeren Computerinfrastrukturen wie z. B. *Grid-Computing*-Systemen oder *Linux-Clustern*. Bei diesen Systemen sind mehrere Computer zu einem Rechnerverbund zusammengeschlossen, in welchem die zu berechnende Aufgabe parallel bearbeitet wird. Bei den *Grid-Computing*-Systemen werden üblicherweise anderweitig genutzte Computer, welche aus Standard-*Hardware* aufgebaut sind, zu einem Rechnerverbund zusammengefasst. Das bekannteste Beispiel eines solchen Systems ist wohl das SETI@Home (*Search for Extraterrestrial Intelligence at Home*)-Projekt [<http://setiathome.ssl.berkeley.edu>]. Darüber hinaus gibt es Projekte, die sich mit der Wirkstoffsuche (Fight-AIDS@Home) [<http://fightaidsathome/scripps.edu>] oder der Faltung von Proteinen (Folding@Home) [<http://folding.stanford.edu>] beschäftigen.

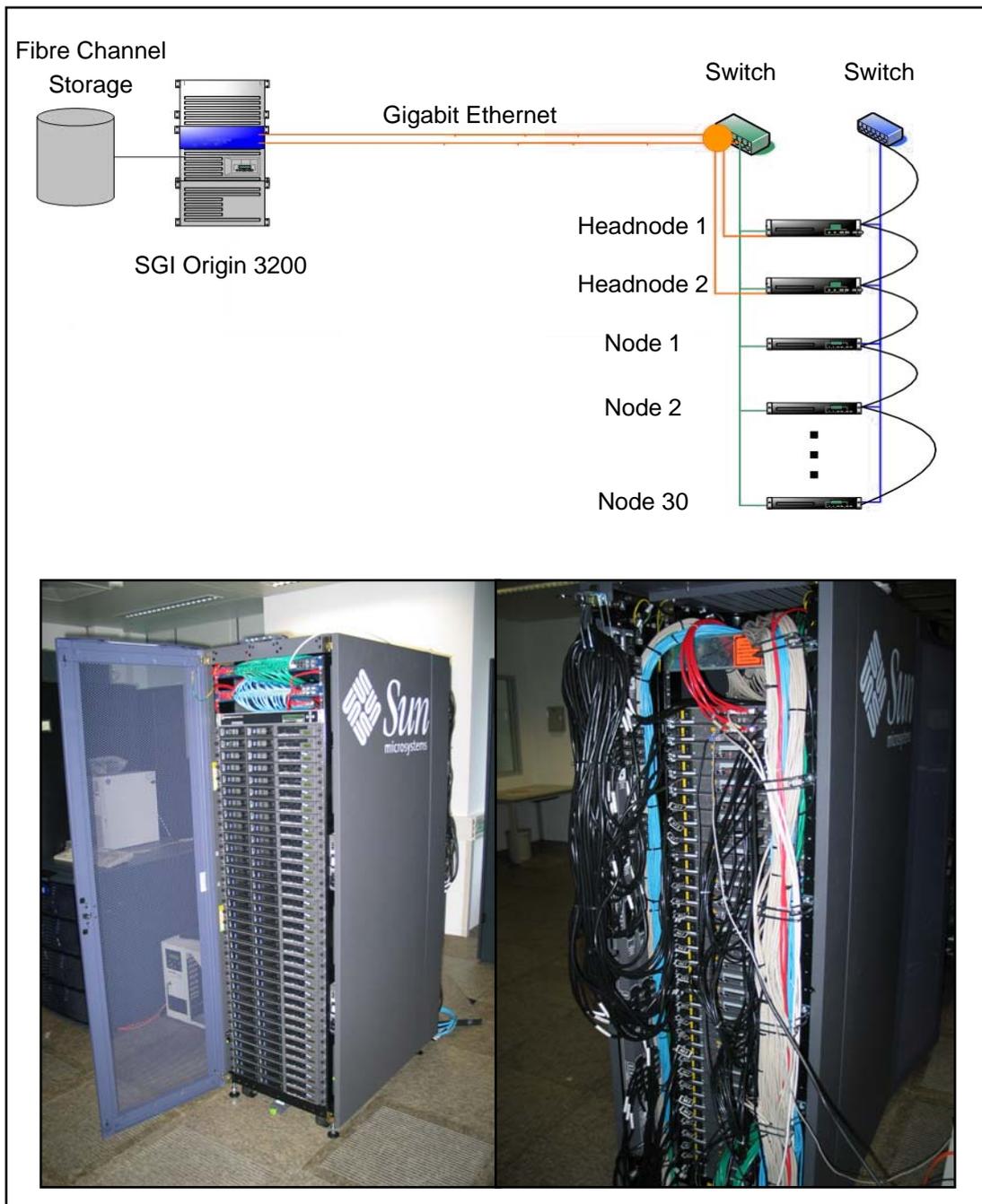


Abbildung 1.19 Linux-Cluster. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Netzwerkarchitektur der Linux-Cluster-Umgebung [Teracuda GmbH, verändert]. Die beiden *Headnodes* des *Clusters* sind über ein Gigabit-Netzwerk (orange) mit einem SGI-Fileserver verbunden. Dieser speichert die Daten auf einem *Fibre Channel RAID*-System. Die Kommunikation zwischen den einzelnen *Nodes* verläuft über ein eigenes 100Mbit-Subnetz (grün, blau). Zur Administration gibt es ein Service-Netz (schwarz). Der untere Teil der Abbildung zeigt die Front- und Rückansicht des Systems [Intervet Innovation GmbH].

Die einzelnen Rechner dieser *Grids* sind weltweit verteilt und über das *Internet* miteinander verbunden. Bei *Linux-Clustern* werden dagegen dedizierte Rechner verwendet, welche meist aus hochwertiger *Hardware* aufgebaut und über ein LAN (*Local Area Network*) verbunden sind (siehe Abbildung 1.19). Zur Parallelisierung der zu berechnenden Aufgaben gibt es verschiedene Methoden. Im Falle des *Dockings* hat es sich als sinnvoll erwiesen, diese Parallelisierung auf Ligandenebene vorzunehmen, d. h. jeder Computer des Rechnerverbundes führt parallel das *Docking* eines Liganden in die Bindetasche des Proteins durch. Bei diesem Vorgehen muss mittels einer Steuerungs-*Software* sichergestellt werden, dass die einzelnen Berechnungsaufgaben geordnet und nacheinander verteilt werden (*Queuing*), die einzelnen Ergebnisse wieder zusammengeführt werden und ein *Management* der Ressourcen durchgeführt wird. Bei der *Software* GOLD wird dies durch PVM (*Parallel Virtual Machine*) realisiert [http://www.csm.ornl.gov/pvm/pvm_home.html].

1.5 Zielsetzung

Die in den letzten Jahren immer weiter voranschreitende Automatisierung und Technisierung biologischer Experimente hatte die Generierung sehr großer Datenmengen zur Folge. Beispiele hierfür sind die Genomsequenzierungs- sowie die *Structural Genomics*-Projekte, welche zu einer Vielzahl von Sequenz- und Strukturdaten aus den verschiedensten Organismen führten. Die aus diesen Projekten resultierenden Daten können u. a. zur Entwicklung neuer Medikamente gegen Infektionskrankheiten (z. B. Malaria, Trypanosomiasis und Leishmaniose) oder andere Krankheiten (z. B. Krebs) verwendet werden. Diese Krankheiten stellen sehr ernstzunehmende Bedrohungen für die Gesundheit vieler Millionen Menschen dar, sodass die Entwicklung neuer, effektiver Medikamente dringend erforderlich ist. Moderne Ansätze zur Entwicklung neuer Medikamente bieten die Methoden der Bio- und Chemoinformatik, welche wertvolle Verfahren zur Unterstützung des Wirkstofffindungsprozesses bereitstellen. Dabei ist besonders das virtuelle *High-Throughput-Screening* von Interesse. Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und rechenintensiv und wird

deswegen auf speziellen Computerinfrastrukturen, wie z. B. Linux-*Clustern*, durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die bioinformatische und chemoinformatische Charakterisierung von Zielproteinen zur Entwicklung von Antimalaria- und Antitrypanosomiasis-Medikamenten. Der Schwerpunkt sollte dabei auf der humanen Glutathion-Reduktase liegen, welche sowohl ein Antimalaria-*Target* als auch einen Angriffspunkt für Cytostatika darstellt. Mit der Charakterisierung dieser Proteine sollten eine *in silico*-Identifizierung von Leitstrukturen, welche die verschiedenen Enzyme inhibieren, und die Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen einhergehen. Diese Inhibitoren können als Startpunkte für die weitere Entwicklung von Medikamenten gegen tropische Infektionskrankheiten und Krebs dienen. Zum anderen sollte evaluiert werden, ob die Methoden des virtuellen *Screenings* (Pharmakophor-Analysen und *Docking*) in der Lage sind, neben der Identifikation neuer Leitstrukturen, auch bereits vorhandene Literaturdaten zu reproduzieren. Darüber hinaus sollte eine Linux-*Cluster*-Infrastruktur für das virtuelle *High-Throughput-Screening* validiert und das *Setup* optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Hardware

- Linux-Cluster: Sun Fire V20z,
2x AMD Opteron 250 (32 Nodes),
Betriebssystem: SUSE Linux 9.0
- PC: Dell OptiPlex GX260, x86
Betriebssystem: Microsoft Windows XP (SP1)
- Unix-Computer: SGI Origin 3200, SGI O2,
SGI Octane 2, SGI Fuel
Betriebssystem: Irix 6.5

2.1.2 Software

- BioEdit 5.0.9, Sequenz-Alignment Editor,
Hall, T.A., North Carolina State University, USA, frei erhältlich,
[HALL, 1999]
- Catalyst 4.10, Software zum Erstellen von Pharmakophor-
Modellen, Accelrys Inc., San Diego, USA,
[<http://www.accelrys.com/>]
- CHARMM, Modul zur Energieminimierung von Molekülen,
Accelrys Inc., San Diego, USA, [<http://www.accelrys.com/>]

- ClustalW v1.4, Programm zur Erstellung globaler Sequenz-*Alignments*, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, frei erhältlich, [THOMPSON *et al.*, 1994]
- Corina 3.3: Konformergenerator
Molecular Networks GmbH, Erlangen, [<http://www.mol-net.com>]
- FlexX 1.13.5, Modul für Protein-Ligand-*Docking*,
Tripos Inc., St. Louis, USA, [<http://www.tripos.com/>],
[KRAMER *et al.*, 1999]
- GeneDoc 2.6.001, Sequenz-*Alignment* Editor,
Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Pittsburgh Supercomputing Center,
USA, frei erhältlich, [NICHOLAS *et al.*, 1997]
- Gold 2.2, *Software* zum Protein-Ligand-*Docking*,
Cambridge Crystallographic Data Centre, UK, [JONES *et al.*, 1995]
- Insight II, chemoinformatisches *Software*-Paket,
Accelrys Inc., San Diego, USA, [<http://www.accelrys.com/>]
- ISIS/Base, Datenbanksystem für chemische Substanzen
MDL Information Systems Inc., San Ramon, USA,
[<http://www.mdl.com>]
- Metalife Trinity 2006 v2.9, Bioinformatisches *Software*-Paket,
Metalife AG, Winden, [<http://www.metalife.de/>]
- Modeller, Modul zur Homologie-Modellierung,
Accelrys Inc., San Diego, USA, [<http://www.accelrys.com/>],
[FISER & SALI, 2003]
- Molcad, *Software* zur dreidimensionalen Visualisierung von Molekülen, Tripos Inc., St. Louis, USA, [<http://www.tripos.com/>]

- Office 97, Office XP
Microsoft Corp., Redmond, USA
- Sybyl 6.9, chemoinformatisches *Software*-Paket,
Tripos Inc., St. Louis, USA, [<http://www.tripos.com/>]
- Vector NTI, bioinformatisches *Software*-Paket
Invitrogen Corp., Carlsbad, USA

2.1.3 Datenbanken

Tabelle 2.1 Verwendete Datenbanken.

Datenbanken	URL	Referenz
GenBank:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	[BENSON <i>et al.</i> , 2005]
InterPro:	http://www.ebi.ac.uk/interpro/	[MULDER <i>et al.</i> , 2005]
KEGG Pathway Database:	http://www.genome.ad.jp/kegg/ pathway.html	[KANEHISA & GOTO, 2000]
PDB:	http://www.rcsb.org/pdb/	[BERMAN <i>et al.</i> , 2003]
Pfam:	http://www.sanger.ac.uk/Software/ Pfam/index.shtml	[BATEMAN <i>et al.</i> , 2004]
PlasmoDB:	http://www.plasmodb.org	[BAHL <i>et al.</i> , 2003]
PROSITE:	http://us.expasy.org/prosite/	[HULO <i>et al.</i> , 2006]
PubMed:	http://www.pubmed.gov/	[GARCIA DIAZ, 1999]
Swiss-Prot:	http://us.expasy.org/sprot/	[BOECKMANN <i>et al.</i> , 2003]

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zum Sequenzvergleich

Das Grundprinzip, welches allen Sequenzvergleichsmethoden zu Grunde liegt, ist das paarweise *Alignment*. Darunter versteht man das zufällige Anordnen zweier Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen und die Bewertung dieser Anordnung anhand eines wählbaren Kriteriums [SELZER *et al.*, 2004]. Im nächsten Schritt wird die Anordnung der Sequenzen zueinander durch Bewegen der einzelnen Nukleotide/Aminosäuren verändert und jeweils der Qualitätswert (*quality score*) berechnet. Dies geschieht solange, bis der Qualitätswert ein Maximum erreicht, also die beste Anordnung gefunden ist. Die Berechnung des Qualitätswertes erfolgt anhand von Ähnlichkeitsmatrizen (*scoring matrices*). Diese Matrizen lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: PAM- (*Point Accepted Mutation*) [WILBUR, 1985] und BLOSUM-Matrizen (**B**LOcks **S**UBstitution **M**atrix) [HENIKOFF & HENIKOFF, 1992]. Bei allen hier beschriebenen Analysen kam die BLOSUM62-Matrix zum Einsatz, welche für nah verwandte und mäßig entfernte Sequenzen geeignet ist. *Alignments*, bei denen vollständige Sequenzen verglichen werden, bezeichnet man als global, wogegen *Alignments* von Teilbereichen der Sequenzen als lokal bezeichnet werden. Lokale *Alignments* sind zum Beispiel bei der Suche nach Proteindomänen von Interesse. Beim Vergleich von mehreren Sequenzen miteinander wird das multiple *Alignment* verwendet. Die vorliegenden *Alignments* wurden mit dem in Metalife Trinity implementierten ClustalW-Algorithmus unter Verwendung der Standardeinstellungen erstellt [THOMPSON *et al.*, 1994]. Die *Alignments* wurden im Anschluss zur Visualisierung in das Programm GeneDoc importiert [NICHOLAS *et al.*, 1997].

2.2.2 Homologie-Modellierung der TR von *Leishmania donovani*

Die Homologie-Modellierung wurde mit dem Modul Homology innerhalb der InsightII *Software* durchgeführt [FISER & SALI, 2003; GREER, 1990]. Eine BLAST-Suche [ALTSCHUL *et al.*, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1997] mit der Sequenz des Zielproteins in der Proteinstruktur-Datenbank PDB [BERMAN *et al.*, 2003] zeigte, dass die Trypanothion-Reduktase von *Trypanosoma cruzi* (PDB Acc.-Nr.: 1GXF) [SARAVANAMUTHU *et al.*,

2004] aufgrund der Sequenzähnlichkeit (79% ähnliche Aminosäuren) und weiterer Faktoren wie z. B. der Auflösung (2,7Å (0,27nm)) und der Debye-Waller-Temperaturfaktoren (B-Faktoren) [GAO & PENG, 1999] am besten als Templat für eine Homologie-Modellierung geeignet war. Nach dem Einlesen der Strukturdaten des Templates, der Sequenzdaten desselben, sowie der Sequenzdaten der TR von *L. donovani*, wurde ein *Alignment* der Aminosäuresequenz des Templates mit der Sequenz des zu modellierenden Proteins angefertigt. Dabei wurde die BLOSUM62-Matrix verwendet (siehe 2.2.1). Aminosäuren, die von dem *Alignment*-Algorithmus nicht übereinander gelegt wurden, aber aufgrund der Position übereinander liegen müssen, wurden manuell korrigiert. Die anschließende Berechnung lieferte 10 Homologie-Modell-Vorschläge, die anhand verschiedener Parameter (z. B. Gesamtenergie der Struktur, Ausrichtung der Seitenketten) einer Einteilung unterzogen wurden, sodass man schließlich zur wahrscheinlichsten Struktur gelangte. Die Visualisierung des erstellten Homologie-Modells erfolgte mit Molcad [BRICKMANN *et al.*, 2000].

2.2.3 Erstellung von Pharmakophor-Modellen

Zu Beginn wurden bekannte Inhibitoren der humanen GR aus der Literatur zusammengetragen und in einer ISIS/Base-Datenbank [<http://www.mdl.com>] gespeichert. Anhand von 32 strukturell diversen und hochaktiven Inhibitoren, welche die Dimer-Kavität der hGR adressieren, wurden mit der *Software* Catalyst 4.10 ligandbasierte Pharmakophor-Modelle erstellt. Hierzu wurden folgende chemische Eigenschaften in die Berechnung der Modelle miteinbezogen: Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren, aliphatische und aromatische hydrophobe Gruppen, negativ geladene und negativ ionisierbare, sowie positiv geladene und positiv ionisierbare Gruppen und aromatische Ringsysteme. Mit den so erstellten Modellen wurde im Anschluss eine virtuelle Substanzdatenbank mit ca. 2 Millionen Molekülen durchsucht. Diese Datenbank setzte sich aus kommerziell erhältlichen Substanzen verschiedener *Supplier* zusammen. Um die Datenbank mit Pharmakophor-Modellen durchsuchen zu können, wurden im Vorfeld mit der *Software* Catalyst 4.10 maximal 300 Konformere pro Molekül generiert. Die Ergebnisse der Suchen mit den verschie-

denen Modellen wurden zusammengefasst und im Anschluss die Duplikate entfernt.

2.2.4 Aufbereitung der virtuellen Substanzbibliothek

Abhängig von den Umgebungsfaktoren können chemische Substanzen in der Realität verschiedene Zustände annehmen. Dies umfasst sowohl die strukturellen Eigenschaften (Konformere), die Tautomerisierungszustände (Tautomere) als auch die elektrochemischen Eigenschaften (Ionisierungszustände). Während die verschiedenen Konformere innerhalb des *Docking*-Prozesses automatisch berücksichtigt werden, ist dies für Tautomere und Ionisierungszustände nicht möglich. Deshalb müssen diese Molekül-Zustände vorher generiert und als separate Strukturen abgespeichert werden. Dadurch kann die virtuelle Substanzdatenbank sehr schnell auf ein Vielfaches ihrer Ausgangsgröße anwachsen. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden die Ionisierungszustände der Moleküle berechnet, jedoch aus Ressourcen-Gründen auf eine Tautomerisierung verzichtet. Ferner wurden nur solche Substanzen verwendet, deren Molekulargewicht unter 500 Da lag. Moleküle, die andere Atome als C, O, H, N, S, P, F, Cl, Br oder I enthielten, wurden aussortiert. Die Generierung der dreidimensionalen Startkonformere und die Addition von H-Atomen entsprechend des Ionisierungszustandes wurde mit der *Software* Corina [<http://www.mol-net.com>] durchgeführt.

2.2.5 Docking

Das eigentliche *Docking* wurde mit dem Programm GOLD [VERDONK *et al.*, 2003] durchgeführt. Zum Platzieren chemischer Moleküle in der Bindetasche (bzw. im aktiven Zentrum) eines Proteins verwendet GOLD einen genetischen Algorithmus (siehe 1.4.3). Um die Bindetasche des Proteins zu definieren, bietet GOLD verschiedene Methoden: a) durch die Definition eines Punktes im dreidimensionalen Raum, b) ausgehend von einem Atom oder einer Liste von Atomen, c) anhand einer Aminosäure oder einer Liste von Aminosäuren und schließlich d) mit Hilfe eines Referenzliganden. Für die vorliegenden Experimente wurde die Bindetasche anhand eines Atoms und eines wählbaren Radius um dieses Atom herum definiert. Der Radius wurde so gewählt, dass alle Aminosäuren, welche

potentiell mit Liganden interagieren können, erfasst wurden. Die Parameter des genetischen Algorithmus wurden so eingestellt, dass hinreichend genaue Ergebnisse in vertretbaren Zeiträumen erreicht wurden (siehe Tabelle 2.2). Um diese Parameter zu identifizieren, wurden im Vorfeld Testläufe mit verschiedenen Einstellungen durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Die Docking-Experimente wurden mit den beiden in GOLD implementierten *Scoring*-Funktionen (GOLDScore und ChemScore) durchgeführt. Diese bewerten z. B. die Bindungsenergie von Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein, die Energie der Torsionsspannungen oder van-der-Waals-Energien. Die „gedockten“ Liganden wurden anhand ihrer *Scoring*-Werte sortiert und einer visuellen Inspektion unterzogen. Dabei wurde zum einen überprüft, ob die erzeugten Konformationen richtig waren und zum anderen, ob die erwarteten Interaktionsmuster zwischen Ligand und Protein erfüllt wurden. Zusätzlich wurde ein manuelles *Consensus-Scoring* durchgeführt, d. h. es wurde besonderes Augenmerk auf diejenigen Substanzen gelegt, welche beim *Docking* mit beiden *Scoring*-Funktionen einen hohen *Scoring*-Wert erzielten.

Tabelle 2.2 Parameter des genetischen Algorithmus. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die optimierten Parameter des genetischen Algorithmus.

Parameter	Wert
Populationsgröße	50
Selektionsdruck	1.125
Anzahl der Operationen	1000
Nischengröße	2
Migrationsrate	0
Mutationsrate	100
Crossoverrate	100

2.2.6 Ähnlichkeits- und Substruktursuchen

Um Substanzen zu identifizieren, die strukturell ähnlich zu bereits gefundenen aktiven Inhibitoren sind, aber eventuell eine bessere inhibitorische Aktivität aufweisen, wurden Ähnlichkeits- und Substruktursuchen durchgeführt. Hierfür wurde das chemische Datenbanksystem ISIS/Base verwendet. Bei Ähnlichkeitssuchen wird ein Satz von Charakteristika eines Ausgangsmoleküls mit den Molekülen in einer Datenbank verglichen. Daraus resultieren Moleküle, die dem Ausgangsmolekül chemisch ähnlich sind, aber durchaus einer anderen Strukturklasse angehören können. Die Suche nach Strukturfragmenten dagegen bezeichnet man als Substruktursuchen. Bei dieser Art der Suche erhält man Moleküle, welche das Ausgangsmolekül als Bestandteil ihrer Struktur enthalten, aber verschiedene Substituenten tragen. Die neu gefundenen Substanzen sind also strukturell komplexer als das Ausgangsmolekül.

2.2.7 *In vitro*-Messungen

Die Untersuchungen der identifizierten Substanzen auf biologische Aktivität wurden am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg von den Arbeitsgruppen Prof. Dr. R. H. Schirmer (hGR und pfGR) und Prof. Dr. R. L. Krauth-Siegel (Liponamid-Dehydrogenase von *T. cruzi*) durchgeführt. Dabei wurde die Inhibition der katalytischen Aktivität der Enzyme in Anwesenheit der verschiedenen Substanzen gemessen. Diese Untersuchungen erfolgten über eine Messung der Absorptionsänderung bei 340nm. Bei der GR wurde die Reduktion von GSSG unter Oxidation von NADPH gemessen, bei der LipDH die Oxidation von Liponamid_{red} unter Reduktion von NAD⁺.

3 Ergebnisse

3.1 Glutathion-Reduktase

Das Enzym Glutathion-Reduktase katalysiert die Reduktion und Regeneration von Glutathion, einem äußerst wichtigem Antioxidans. Da Krebszellen und Plasmodien sensitiv gegenüber oxidativem Stress sind, ist sowohl die humane GR als auch die GR von *Plasmodium falciparum* ein validiertes Zielprotein für die Entwicklung von Medikamenten. Dabei ist besonders interessant, dass auch die hGR ein Angriffspunkt von Antimalaria-Medikamenten ist. Dies ist auf das intraerythrocytäre Stadium zurückzuführen, welches die Plasmodien in ihrer Entwicklung durchlaufen. Während dieses Stadiums führt eine Inhibierung der humanen Erythrocyten-GR zu einem massiven Anstieg von oxidativem Stress für die Parasiten, so dass diese in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt sind. Da Plasmodien empfindlicher gegen oxidativen Stress sind als Erythrocyten, reicht eine nicht vollständige Inhibierung des Enzyms aus, um die Parasiten zu schädigen [ZHANG *et al.*, 1988a, b; KRAUTH-SIEGEL & COOMBS, 1999].

3.1.1 Bioinformatische Tiefenanalyse

Als ein ubiquitäres Enzym kommt die Glutathion-Reduktase in Tieren, Pflanzen, Protozoen und Bakterien vor. Ein Vergleich der Sequenzidentitäten der GR verschiedener Organismen zeigt dabei eine Konservierung zwischen 27-51% bezogen auf die Gesamtsequenzlänge (siehe Tabelle 3.1). Im Anschluss an den Sequenzvergleich wurde mittels Datenbanksuchen in Motivdatenbanken wie Pfam und PROSITE [BATEMAN *et al.*, 2004; HULO *et al.*, 2006], sowie mittels Literatursuchen eine Proteinmotivanalyse durchgeführt. Dabei konnte ein für alle Klasse-1-Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen charakteristisches Motiv, welches einen Teil des aktiven Zentrums dieser Enzyme umfasst, identifiziert werden (PROSITE Acc.-Nr.: PS00076). Dieses Motiv enthält auch die redoxaktiven Cysteine (Cys59 und Cys64, Nummerierung bezogen auf die humane GR). Weiterhin konnten die FAD- und NADPH-Bindestellen (Gly28-Gly33 und Thr322-Asp332 bzw. Gly195-Ala200 und Met217-

Phe227), sowie eine Dimerisierungsdomäne (Cys441-Lys453) bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Konservierung in den funktionellen Bereichen des Enzyms deutlich höher liegt. So sind die Aminosäuren, welche das Motiv des aktiven Zentrums ausbilden (Gly56-Pro66), zwischen allen untersuchten GR-Sequenzen fast identisch. Ähnliches gilt für die FAD- und NADPH-Bindestellen. Hier liegt der Grad der Konservierung jedoch etwas niedriger (siehe Abbildung 3.1).

Tabelle 3.1 Sequenzidentitäten zwischen Glutathion-Reduktasen von *H. sapiens*, *P. falciparum*, *D. melanogaster*, *A. thaliana* und *E. coli*.

	<i>H. sapiens</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>E. coli</i>
<i>H. sapiens</i>		37,1	28,7	33,5	51,3
<i>P. falciparum</i>			26,9	29	40,8
<i>D. melanogaster</i>				28,2	31,8
<i>A. thaliana</i>					33,3
<i>E. coli</i>					

ERGEBNISSE

```

Hs_GR : ----MACRQEPQPPQPPPAAGAVAS*YDYLVI*GGGSGGLASAFRAAELCARAAVVS-----H : 53
Pf_GR : -----MYYDLI*VI*GGGSGGMAAARRAARHN*AKVALVEK-----S : 34
Dm_GR : -----MAPVQGSYDYDLI*VI*GGGSAGLACAREASLNGARVACLDFVKPTPLG-TKW : 50
At_GR : MARKMLVDGEIDKVADEANATHYDFDLFVI*GAGSGGVRAARF*SANHGAKVGT*CLLFFPHI*SSSEEIG : 67
Ec_GR : -----MTKHYDY*IAI*GGGSGGI*ASINRAAMY*QRCALIEA-----K : 36

Hs_GR : *KLGGT*CVNVG*CVFKKVM*NTAVHSEFMH*DH-ADYGFPS-CEGKFN*RVITKEKR*DAYVSR*LNAT*YQNN : 118
Pf_GR : RLG*GT*CVNVG*CVFKKIM*ENASVHD*ILENS-RHYGFDT-KFS-FNL*PLL*VER*RD*YI*QR*LN*NI*YR*QN : 98
Dm_GR : GVG*GT*CVNVG*CVFKKLM*HQAS*LLGEAV*HEA---AANNVDDKIK*PD*WHR*ICAVVQNH*ISRHW*VT*VVDL : 114
At_GR : GVG*GT*CVI*RG*CVFKKIL*VYGATY*GG*BL*EDA-KNYG*WEINEK*VD*FT*WKKL*LQ*KK*TD*BL*LR*LN*NI*YK*RL : 133
Ec_GR : EL*GGT*CVNVG*CVFKKVM*WHA*AI*QIREA*HMYG*PDY*GFDT-TINK*FN*WET*LI*AS*RT*AY*ID*RI*HT*SY*ENV : 102

Hs_GR : 140LT*SH*IE*IR*CHAA*FTSD*PKPT*IE-----VSGK*Y*TA*PH*LI*AT*GG*MT*ST*EH*ES*QI*PG*AS : 173
Pf_GR : LS*KR*VD*LY*E*TA*SE*FL*SE*NR*LI*KG*TKD*NN*KN*DN*G*PL*NE*E*IL*EG*RN*LI*AV*GN*K*E*V*E*P---P*V*K*G*IE : 162
Dm_GR : RD*K-K*VE*Y*IN*GL*GS*F*V*TR*TH*CC*PS*MK*SG-----ERTI*TA*QT*F*VI*AV*G-R*E*RY*P---D*IP*GA* : 166
At_GR : LANAA*VK*LY*E*EG*RV*V*GP*NE*VE*V*Q*ID*G-----TKIS*Y*TA*KH*LI*AT*GS*RA*Q*K*P---N*IP*G*HE : 188
Ec_GR : LG*NN*VD*VI*K*E*FA*RE*V*D---AK*TL*E-----VNG*E*TI*TA*DH*LI*AT*GG*RE*SH*P---D*IP*G*VE : 152

Hs_GR : *LGI*TS*DG*FF*Q*E*EL*P*GR*SV*IV*G*GY*IA*VE*MA*GL*IS*AL*G*SK*SI*MI*RH*DK*VL*RS*FD*SM*IS*TN*CT*EE*LE : 240
Pf_GR : NT*IS*SD*EFF*NI*KE*SKR*IG*IV*G*SG*Y*IA*VE*LI*NI*VI*K*RL*GI*DS*SY*IF*AR*GN*RI*LR*KF*DE*SV*IN*V*LE*ND*MK : 228
Dm_GR : EIG*TS*DDL*F*SLD*RE*GT*LV*V*G*AG*Y*IG*LE*CA*GE*IK*GL*GY*G*V*V*V*R---S*IV*LR*GF*D*Q*MA*EL*VA*AS*ME : 231
At_GR : LA*IT*SD*EA*LS*E*E*F*PK*RA*IV*L*GG*Y*IA*VE*FA*SI*WR*GM*GA*TV*DL*FF*RK*EL*PL*RG*FD*EM*RA*LV*AR*NL*E : 255
Ec_GR : YG*ID*SD*G*FF*AI*PAL*PE*RV*AV*V*G*AG*Y*IA*VE*LA*G*VI*NG*LG*AK*H*LF*VR*KH*AP*LR*SE*DP*MI*SE*TL*VE*VM*N : 219

Hs_GR : *NAG*VE*VL*K*F*SQ*KE*V*KK*TL*SG-LE*V*SM*VT*AV*P*GR*LP*V*MT*MI*PD*VD*CL*LI*WA*IG*RV*E*NT*KD*LS*LN*KL*GI : 306
Pf_GR : KNN*IN*IV*TF*AD*V*VE*IK*KV*SD*KN*LS*H*LS*DG*RI*Y-----EH*FD*H*VI*Y*CV*GR*SD*TE*NL*K*LE*KL*NV : 287
Dm_GR : ER*G---IP*FL*AD*V*DR*CRE*AD*DA*ARE*Y*RL*IQ*IR*E*T-----T*SH*HR*L*WA*IG*RK*GL*CD*SL*NL*P*MP*AL : 288
At_GR : GR*EV*NI*HP*QT*SI*TL*QL*TK*TD*QG-IK*VI*SS*HG*EE*F-----VAD*V*LF*AT*GR*SD*NT*K*RL*NL*EA*VG*V : 312
Ec_GR : AE*G*P*QL*HT*NA*IP*KA*V*V*KN*TD*GS*LT*LE*ED*GR*S-----ET*VD*CL*LI*WA*IG*RE*E*AN*DN*IN*LE*AA*GV : 277

Hs_GR : 340QT*DK*GH*II*V*DE*F*Q*NT*NV*K*GI*Y*AV*GD*V*CGK-----ALL : 339
Pf_GR : ET*NN*YI*V*VD*EN*Q*RT*SV*NN*II*Y*AV*GD*CC*MV*KK*SK*E*IE*DL*NL*KL*Y*NE*E*RY*LN*KK*EN*VT*E*DI*FY*NV*QL : 353
Dm_GR : TV*Q*KD-KI*P*VD*SQ*E*AT*NV*PH*II*Y*AV*GD*II*Y*GK-----PEL : 321
At_GR : EL*D*Q*AG*AV*K*V*DE*YS*RT*NI*PS*II*W*AV*GD*AT*NR-----INL : 345
Ec_GR : KT*NE*K*GI*IV*VD*K*Y*Q*NT*NI*E*GI*Y*AV*GD*NT*GA-----VEL : 310

Hs_GR : *TP*VA*IA*AG*RL*LA*HR*LF*E*Y*E*DS*KL*DY*NN*IP*TV*V*F*SH*P*PI*GT*V*GL*TE*DE*BA*IH*K*Y*GI*EN*V*KT*Y*ST*SET- : 405
Pf_GR : TP*VA*IN*AG*RL*LA*DR*LF*E*Y*E*TR-KT*NY*KL*IP*TV*V*F*SH*P*PI*GT*I*GL*SE*EA*AI*Q*Y*G*KN*V*K*I*Y*E*SK*E*TN : 419
Dm_GR : TP*VA*VL*AG*RL*LA*RR*LF*E*G-G*ST*Q*SM*DY*K*DV*AT*V*F*S*MS-T*S*AS*GL*AE*ED*A*SS*SE*P-R*IE*V*F*HG*Y*Y*KP : 385
At_GR : TP*VA*LM*EA*TC*EA*NT*AE*G*G*PT-KA*E*Y*SN*V*AC*AV*E*CI*P*PL*AV*V*GL*SE*EE*BA*VE*Q*AT*G-D*IL*V*E*TS*G*EN- : 409
Ec_GR : TP*VA*VA*AG*RR*LS*ER*LE*NN*P*DE*HL*DY*SN*IP*TV*V*F*SH*P*PI*GT*V*GL*TE*P*Q*AR*EQ*Y*G*DD*Q*V*K*V*Y*K*SET- : 376

Hs_GR : *---P*MY*H*AV*TK*RR*TK*CV*MK*V*CA*NK-E*EK*V*V*GI*H*MQ*GL*G*DE*ML*Q*GF*AV*V*KG*AT*KA*DF*DN*F*VA*IH : 468
Pf_GR : L*FF*S*Y*DI*E*PEL*KE*KT*Y*LK*LV*CV*GK-DE*LI*K*GL*HI*IG*LN*DE*IV*QG*FA*V*AL*K*MN*AT*KK*DF*DE*TI*E*PI*H : 485
Dm_GR : ---T*E*E*FI*P*Q*KS*V*RY*CY*LK*VA*ER*HG*D*OR*V*Y*GL*HY*IG*P*V*AG*E*VI*Q*GF*AA*AL*KS*G*LT*LT*LN-T*V*GI*H : 448
At_GR : ---P*K*NT*IS*GR*Q*E*KT*LM*KL*IV*DE*K-S*DK*VI*G*AS*MC*G*PD*AA*E*IM*Q*GI*AT*AL*K*CG*AT*KA*Q*FD*ST*V*GI*H : 472
Ec_GR : ---A*MY*TA*V*T*HR*Q*PCR*MK*LV*CV*GS-E*EK*IV*GI*H*GI*G*FG*MD*E*ML*Q*GF*AV*AL*KG*AT*KK*DF*DN*F*VA*IH : 439

Hs_GR : 540PT*SS*EE*LV*TLR----- : 479
Pf_GR : PT*A*EE*F*LT*IQ*P*WMK----- : 500
Dm_GR : PT*TA*EE*F*TR*LA*IT*K*PR*SG*LD*PT*P*AS*CCS----- : 476
At_GR : P*SS*A*EE*F*V*TR*MS*V*TR*RI*AH*K*PK*P*KT*NL----- : 499
Ec_GR : PT*A*EE*F*V*TR----- : 450

```

3.1.2 Analyse der Röntgenkristallstrukturen der GR

Derzeit (Stand: März 2007) gibt es in der Proteinstrukturdatenbank PDB [BERMAN *et al.*, 2003] 26 Kristallstrukturen der Glutathion-Reduktase. Dabei stammen die meisten Strukturen von *Homo sapiens*, einige von *Escherichia coli* und eine Struktur von *Plasmodium falciparum*. Teilweise wurden die Strukturen mit den Coenzymen FAD und NADPH, zum Teil mit dem Substrat Glutathion, sowie mit verschiedenen Inhibitoren co-kristallisiert. Unter den Strukturen mit Inhibitoren finden sich vier, bei denen der Ligand das aktive Zentrum adressiert (PDB-Acc.-Nr.: 1GRH, 1BWC, 1K4Q und 2GH5) und eine Struktur, bei welcher der Inhibitor in der Dimer-Kavität bindet (PDB-Acc.-Nr.: 1XAN). Die Auflösung dieser Strukturen liegt zwischen 1,7Å (0,17nm) und 3,0Å (0,3nm).

Bei den Methoden des strukturbasierten Wirkstoffdesigns, wie z. B. dem *Docking*, wird das Protein in der Regel starr gehalten. Dies impliziert, dass etwaige, durch die Bindung des Inhibitors verursachte Konformationsänderungen des Proteins (*induced fit*), nicht berücksichtigt werden. Die Konformationsänderungen können jedoch u. U. so groß sein, dass sie eine Bindung überhaupt erst ermöglichen. Deswegen ist es zweckmäßig, für diese Methoden Kristallstrukturen zu verwenden, welche bereits mit einem Inhibitor komplexiert sind. Dieser Inhibitor kann *in silico* entfernt werden, und dadurch weist die Bindetasche nun genügend Platz auf, so dass im Rahmen von *Docking*-Experimenten andere Liganden an dieser Stelle platziert werden können.

Abbildung 3.1 (vorherige Seite). Multiples Sequenz-Alignment von Glutathion-Reduktase-Sequenzen verschiedener Organismen. Dieses *Alignment* zeigt einen Vergleich von GR-Proteinsequenzen von *H. sapiens*, *P. falciparum*, *D. melanogaster*, *A. thaliana* und *E. coli*. Verschiedene Blautöne geben den Grad der Konservierung an (dunkelblau unterlegte Aminosäuren sind am stärksten konserviert). Rot unterlegte Aminosäuren sind Teil des aktiven Zentrums, wobei die redoxaktiven Cysteine gelb unterlegt sind. Orange und grün eingefärbte Positionen markieren die FAD- bzw. die NADPH-Bindestellen, der violette Bereich die Dimerisierungsdomäne. Weiterhin ist eine Insertion hervorgehoben, welche für die GR von *P. falciparum* spezifisch zu sein scheint (türkis) [SARMA *et al.*, 2003; Datenbankeinträge aus PROSITE und Pfam].

Darüber hinaus sollte die Proteinstruktur eine möglichst hohe Auflösung und geringe Temperaturfaktoren bei den Aminosäureresten in der Bindetasche aufweisen. Neben einer geeigneten Proteinstruktur ist es für das *Docking* außerdem wichtig, Daten über bereits bekannte Inhibitoren zur Verfügung zu haben. Diese dienen der Kalibrierung des *Docking*-Prozesses. Da die Datenlage bezüglich bekannter Inhibitoren für die Dimer-Kavität der Glutathion-Reduktase erheblich besser ist als für das aktive Zentrum, wurde in den weiteren Untersuchungen erstere adressiert und die PDB-Struktur 1XAN (hGR) verwendet [SAVVIDES & KARPLUS, 1996]. Die Auflösung dieser Struktur liegt bei 2,0Å (0,2nm). In dieser Kristallstruktur ist das Protein mit einem Inhibitor (3,6-Dihydroxy-xanthen-9-propionsäure) in der Dimer-Kavität komplexiert (siehe Abbildung 3.2). Bei der Analyse der GR-Strukturen in der PDB-Datenbank und bei der Literatursuche nach bekannten Inhibitoren wurde festgestellt, dass alle derzeit bekannten Substanzen, welche das aktive Zentrum der GR angreifen, kovalent an ein redoxaktives Cystein binden. Im Gegensatz dazu weisen alle bekannten Liganden, welche in der Dimer-Kavität binden, einen nicht-kovalenten Bindungsmodus auf. Dies war ein weiteres Kriterium, die Dimer-Kavität als Bindetasche für die *Docking*-Experimente zu verwenden. Nicht-kovalente Bindungen sind in solchen Experimenten besser adressierbar. Dagegen ist die Bewertung kovalenter Bindungen, wie sie im aktiven Zentrum zu finden sind, deutlich schwieriger.

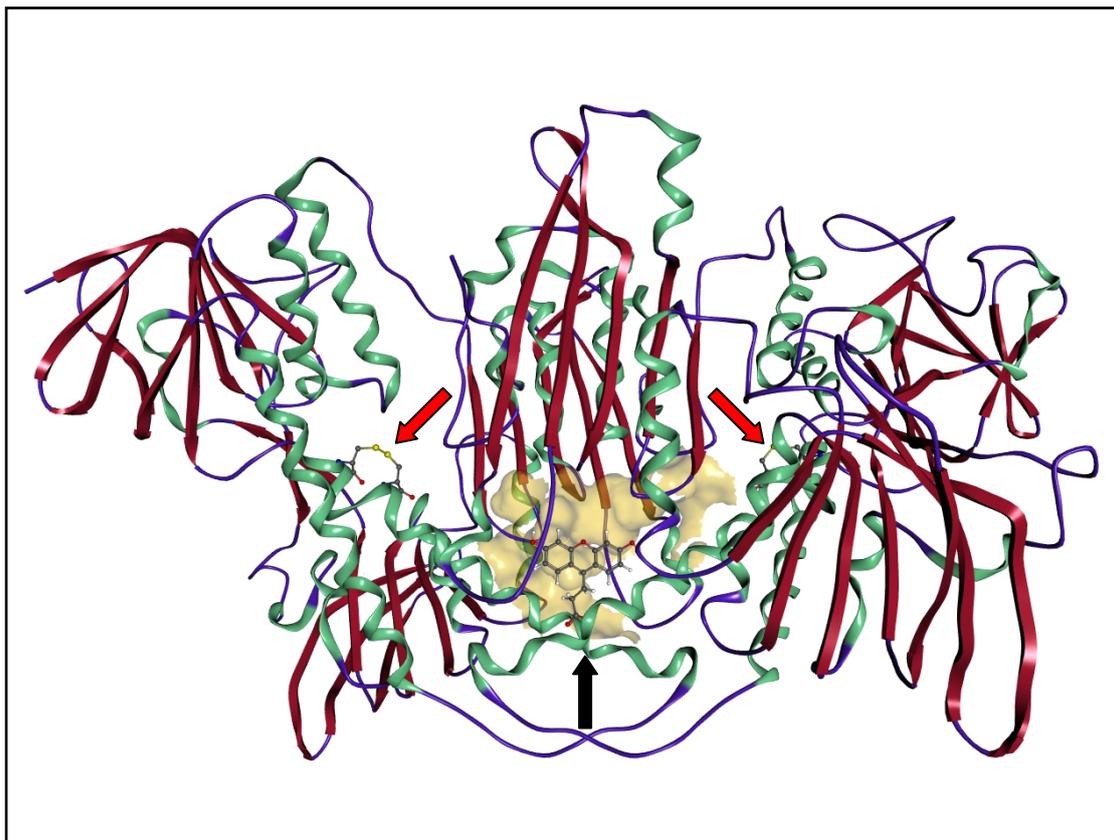


Abbildung 3.2 Kristallstruktur der humanen Glutathion-Reduktase. Die Abbildung zeigt die Kristallstruktur der humanen Glutathion-Reduktase (PDB-Acc.-Nr.: 1XAN) in *Ribbon*-Darstellung. Das Enzym liegt als Dimer vor. *Loop*-Regionen sind blau, α -Helices grün und β -Faltblätter dunkelrot dargestellt. Die roten Pfeile markieren die aktiven Zentren mit den insgesamt 4 redoxaktiven Cysteinen, der schwarze Pfeil die Dimer-Kavität (gelbe Oberfläche). In der Kavität befindet sich ein nicht-kompetitiver Inhibitor (3,6-Dihydroxy-xanthin-9-propionsäure) [SAVVIDES & KARPLUS, 1996].

Aus der Kristallstruktur lässt sich ableiten, dass die Bindung in der Dimer-Kavität v. a. über π - π -*stacking*-Interaktionen zwischen Phe78/Phe78' und dem Liganden sowie über Wasserstoffbrückenbindungen zu Asn71/Asn71', His75/His75' und Wassermolekülen erfolgt (siehe Abbildung 3.3).

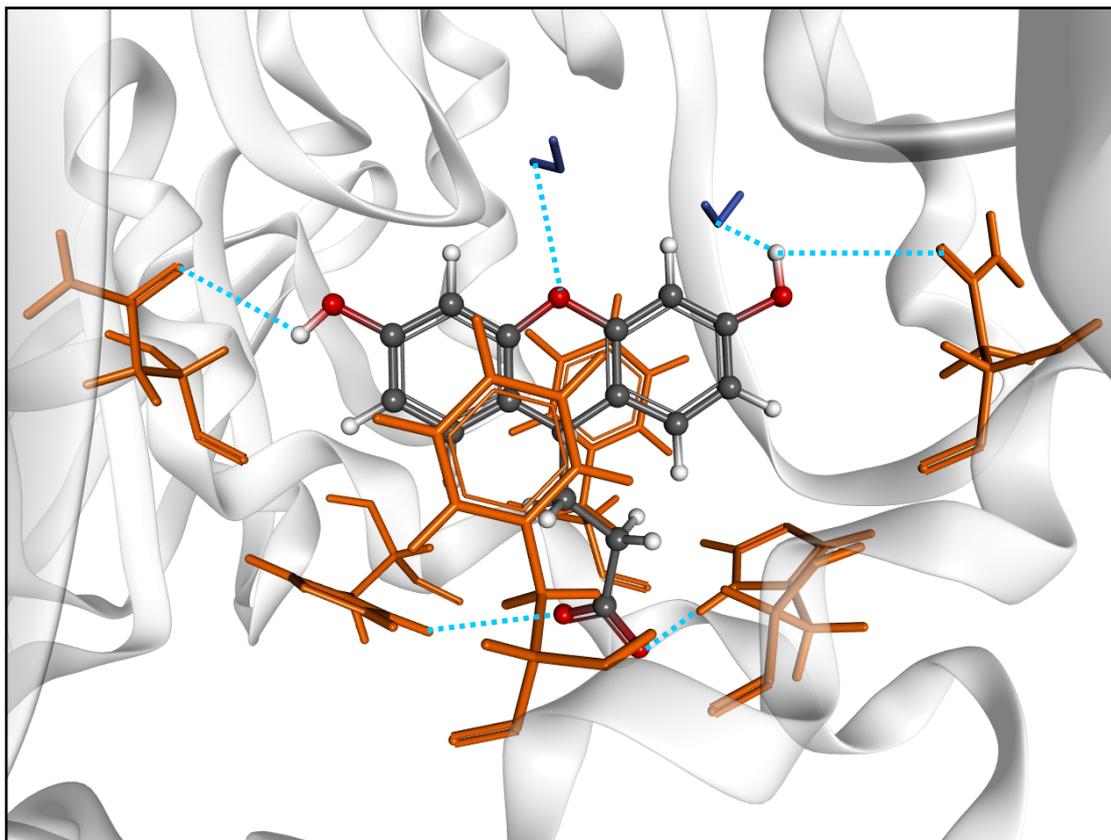


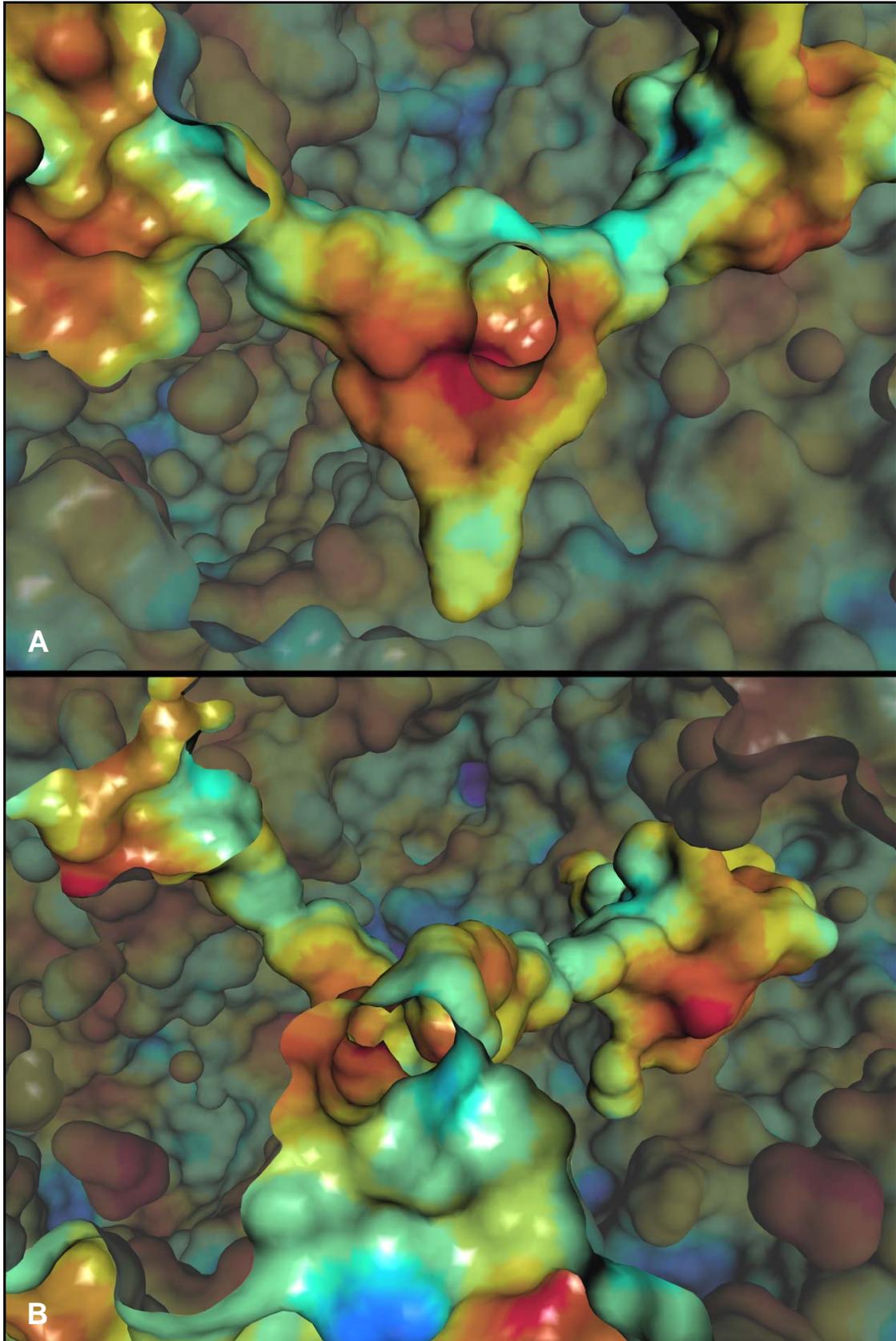
Abbildung 3.3 Dimer-Kavität der humanen Glutathion-Reduktase. Die Dimer-Kavität der hGR, welche im Zentrum des Enzyms lokalisiert und aus Aminosäuren beider Untereinheiten aufgebaut ist, dient als Bindestelle zahlreicher Inhibitoren. Die Bindung dieser Substanzen erfolgt v. a. über π - π -stacking-Interaktionen zu zwei Phe-Resten sowie über Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Asparagin- bzw. Histidin-Resten und Wassermolekülen. Der Inhibitor XAN (3,6-Dihydroxy-xanthen-9-propionsäure) ist in Atomfarben (C: grau, O: rot, H: weiß), die Aminosäuren in orange und die Wassermoleküle in blau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind in hellblau und die Sekundärstruktur des Enzyms in weiß abgebildet.

Über die funktionelle Bedeutung der Dimer-Kavität ist zurzeit nichts bekannt. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass die Kavität neben zwei Kanälen, die zu den jeweiligen aktiven Zentren führen, über zwei weitere Kanäle mit der Oberfläche des Proteins verbunden ist und somit Zugang zum umgebenden Medium hat. Ein Vergleich der Sequenzbereiche, welche die Dimer-Kavität der hGR und pfGR ausbilden, lässt vermuten, dass aufgrund des Konservierungsgrades eine Inhibierung beider Enzyme durch einen Inhibitor erreicht werden kann (siehe Abbildung 3.4): 9 von 21 Aminosäuren (dies entspricht 43%), welche die Dimer-Kavität der pfGR ausbilden sind identisch mit Aminosäuren in der

Kavität der hGR. Auch eine Betrachtung der chemischen Eigenschaften dieser Bindestellen zeigt, wie ähnlich die beiden Enzyme sind. In Bezug auf das Lipophilie-Potential ergeben sich kaum Unterschiede (siehe Abbildung 3.5), bei dem elektrostatischen Potential sind nur leichte Unterschiede in der Ladung zu erkennen. Dabei ist die Kavität der hGR eher negativ und die der pfGR eher neutral [SARMA *et al.*, 2003].



Abbildung 3.4 Paarweises Sequenz-Alignment der Glutathion-Reduktase-Sequenzen von *P. falciparum* und *H. sapiens*. In diesem Alignment sind neben der Konservierung (blau) auch strukturelle und funktionelle Bereiche des Enzyms markiert: das aktive Zentrum (rot) und die Dimer-Kavität (grüne Kugeln). Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind identisch, wogegen in der Dimer-Kavität nicht alle Aminosäuren konserviert sind [SARMA *et al.*, 2003].



3.1.3 Pharmakophor-Modelle der humanen Glutathion-Reduktase

Für die Erstellung der Pharmakophor-Modelle der humanen Glutathion-Reduktase wurde die *Software* Catalyst 4.10 verwendet. Mit dieser *Software* ist es möglich, ligandbasierte Pharmakophor-Modelle abzuleiten und anschließend mit diesen Modellen virtuelle Substanzbibliotheken zu durchsuchen. Der Vorteil der ligandbasierten Modelle liegt darin, dass verschiedene chemische Eigenschaften strukturell diverser Liganden in ihnen abgebildet werden können.

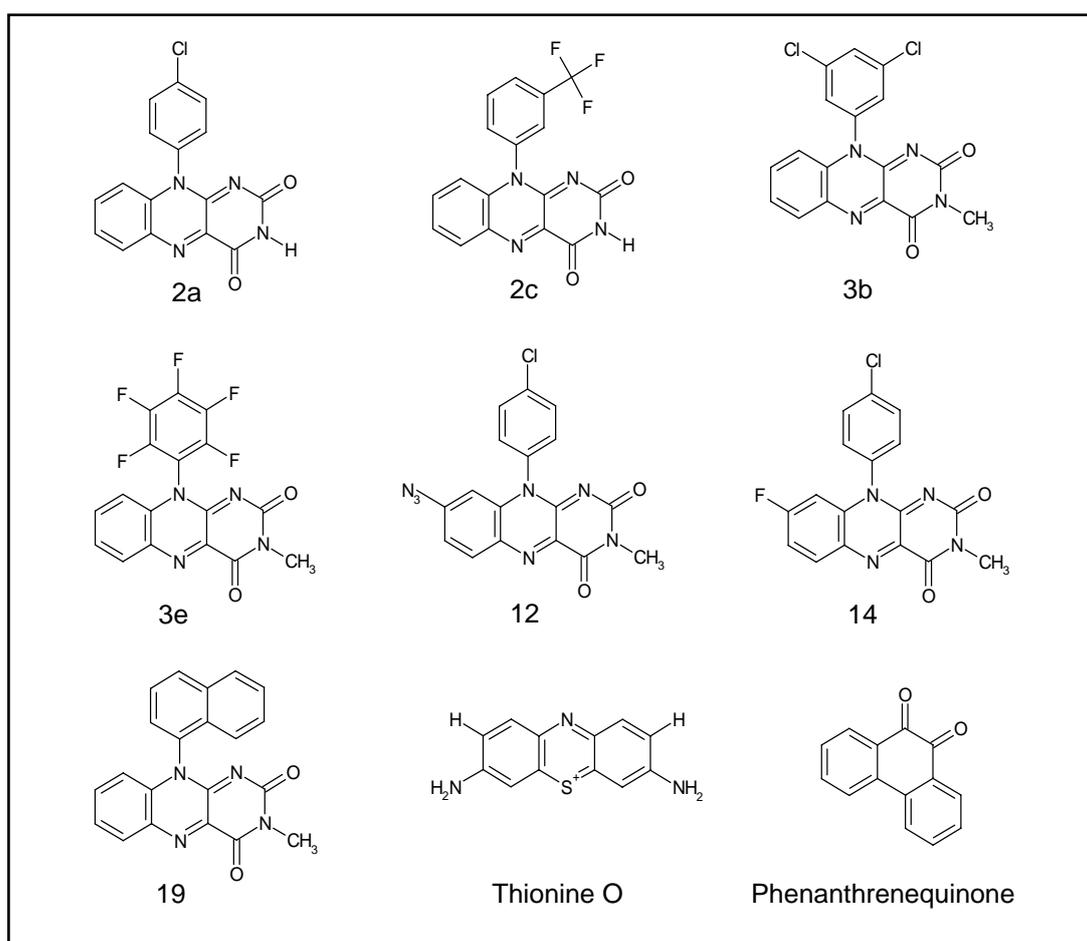


Abbildung 3.5 Lipophilie-Potential der Dimer-Kavitäten der hGR und pfGR im Vergleich (vorherige Seite). Ein Vergleich des Lipophilie-Potentials beider Kavitäten zeigt, dass diese sehr ähnlich sind (blau: hydrophile Bereiche, rot: lipophile Bereiche). Die Kavität der hGR (A) ist etwas größer und leicht lipophiler als die Kavität der pfGR (B). Beide Kavitäten sind über Kanäle mit den jeweiligen aktiven Zentren (rechts und links im Bild) sowie mit der Oberfläche der Proteine verbunden (Kanäle nach vorne und hinten, angeschnitten). Zur besseren räumlichen Visualisierung wurden die übrigen Bereiche farblich abgeschwächt.

Die vorliegenden Modelle wurden auf Basis von 32 Inhibitoren erstellt, welche in der Dimer-Kavität der hGR binden. Diese wurden mittels einer Literaturanalyse identifiziert und in einer ISIS-Datenbank abgelegt. Da die Substanzen unterschiedliche Aktivitäten aufwiesen, wurden sie in zwei Gruppen eingeteilt: hochaktive und schwächer aktive Inhibitoren. Bei der Erstellung der Pharmakophor-Modelle wurden die chemischen Eigenschaften hochaktiver Strukturen (siehe Abbildung 3.6) stärker in die Modelle miteinbezogen wurden, als die Eigenschaften von etwas schwächer aktiven Substanzen.

Die aus diesen Substanzen abgeleiteten Modelle (siehe Abbildung 3.7) enthalten chemische Eigenschaften wie Wasserstoffbrückenakzeptoren, positiv geladene und positiv ionisierbare Gruppen, aromatische Ringsysteme, aliphatische oder aromatische hydrophobe Gruppen sowie allgemeine hydrophobe Gruppen in unterschiedlicher Anzahl und räumlicher Anordnung. Sie lassen sich aufgrund der abgebildeten Eigenschaften in 3 Kategorien einteilen: Modelle der Kategorie 1 (obere Reihe) suchen u. a. nach aromatischen Ringsystemen, Modelle der Kategorie 2 (mittlere Reihe) u. a. nach aromatischen oder aliphatischen Gruppen und Modelle der Kategorie 3 (untere Reihe) u. a. nach allgemeinen hydrophoben Gruppen.

Abbildung 3.6 (vorherige Seite) Auswahl hochaktiver hGR-Inhibitoren. Diese Abbildung zeigt eine Auswahl von hochaktiven hGR-Inhibitoren, die zur Erstellung der ligandbasierten Pharmakophor-Modelle verwendet wurden. Die Bezeichnungen beziehen sich auf verschiedene Synthese-Serien und sind den Publikationen von BECKER *et al.*, 1990; SCHONLEBEN-JANAS *et al.*, 1996; SARMA *et al.*, 2003; LUOND *et al.*, 1998 sowie GRELLIER *et al.*, 2001 entnommen.

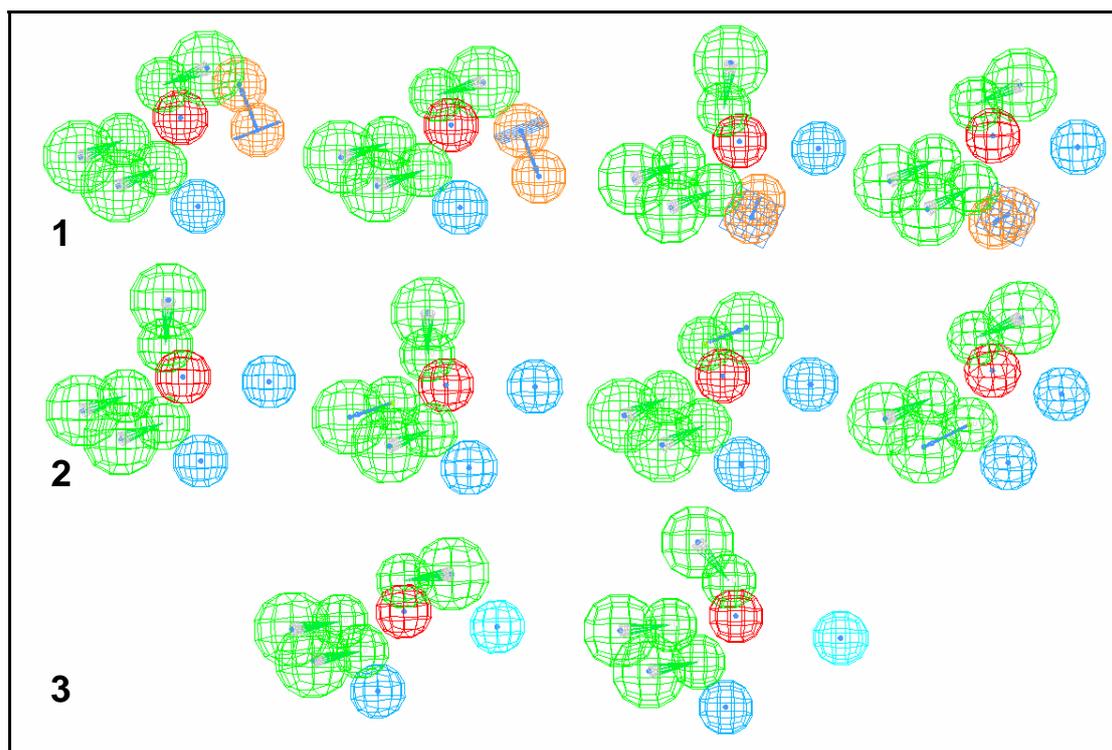


Abbildung 3.7 Ligandbasierte Pharmakophor-Modelle der humanen Glutathion-Reduktase. Anhand von 32 bekannten hGR-Inhibitoren wurden 10 ligandbasierte Pharmakophor-Modelle erstellt. Diese Modelle bilden die chemischen Eigenschaften der Substanzen im dreidimensionalen Raum ab (grün: Wasserstoffbrückenakzeptoren, rot: positiv geladene und positiv ionisierbare Gruppen, orange: aromatische Ringsysteme, hellblau: aliphatische oder aromatische hydrophobe Gruppen, cyan: allgemeine hydrophobe Gruppen). Aufgrund der abgebildeten chemischen Eigenschaften lassen sich die Modelle in 3 Kategorien einteilen, die jeweils in einer Reihe zusammengefasst sind.

Um die Pharmakophor-Modelle zu validieren, wurde untersucht, wie gut die Strukturen aktiver und nicht aktiver Substanzen geometrisch auf die Modelle passen (siehe Abbildung 3.8). Zur Quantifizierung wurde dabei ein „*best fit*“-Wert berechnet, der angibt, wie viele Merkmale des Modells von einer Substanz getroffen werden und in welcher Güte. Dabei zeigte sich, dass hoch aktive Substanzen einen hohen Wert erzielten (≥ 5) und schlecht bzw. nicht aktive Substanzen einen niedrigen Wert (≤ 1) und die Modelle somit für hGR-Inhibitoren spezifisch sind.

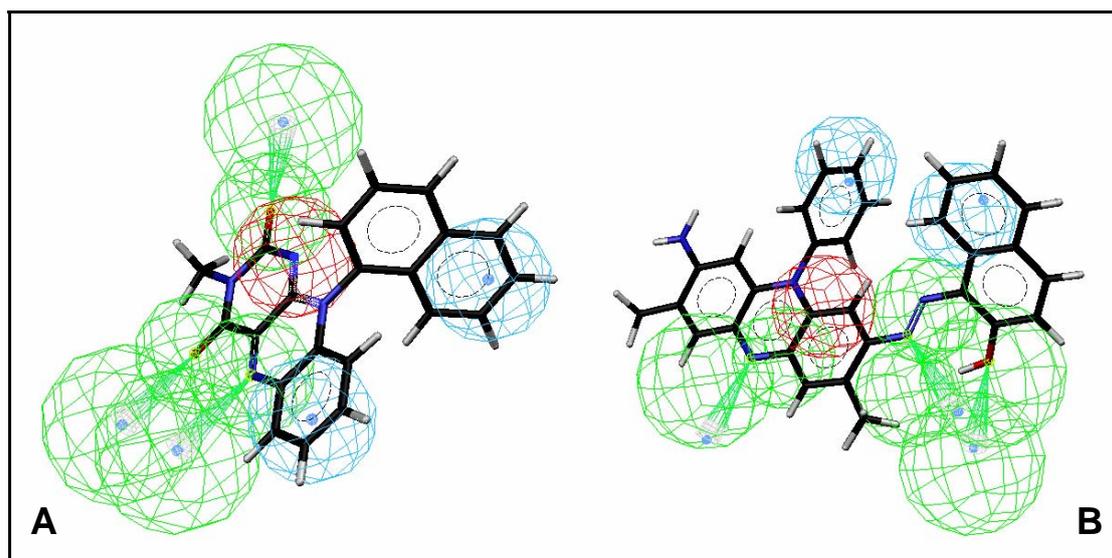


Abbildung 3.8 Validierung der Pharmakophor-Modelle der humanen Glutathion-Reduktase. Teil A der Abbildung zeigt exemplarisch die Überlagerung eines hochaktiven Inhibitors der humanen Glutathion-Reduktase (IC₅₀: 11 µM) mit einem ligandbasierten Pharmakophor-Modell. Man kann erkennen, dass die Vektoren, die von den Atomen des Inhibitors ausgehen, jeweils in die Mitte der Sphären des Pharmakophor-Modells weisen. Dies verdeutlicht die sehr gute geometrische Passform des Inhibitors zum Modell („best fit“-Wert: 5,8). Teil B der Abbildung zeigt exemplarisch die Überlagerung eines sehr schlechten Inhibitors (IC₅₀: 72µM) mit dem identischen Pharmakophor-Modell (Ansicht gedreht). Hierbei weisen die Vektoren nicht in die Mitte der Sphären, was eine sehr schlechte geometrische Passform veranschaulicht („best fit“-Wert: 0,8). (Modelle: grün: Wasserstoffbrückenakzeptoren, rot: positiv geladene und positiv ionisierbare Gruppen, hellblau: aliphatische oder aromatische hydrophobe Gruppen; Moleküle: schwarz: C, blau: N, rot: O, grau: H).

Nach der Validierung der Pharmakophor-Modelle wurden diese für die Identifizierung neuer potentieller Inhibitoren der hGR verwendet. Hierzu musste eine virtuelle Substanzbibliothek, die ca. 2 Millionen kommerziell verfügbare Moleküle enthielt, zuvor in das Catalyst-Format überführt und Konformere für die einzelnen Strukturen generiert werden. Im Anschluss wurden mit jedem einzelnen Pharmakophor-Modell geeignete Substanzen identifiziert. Nach der Suche wurden die Ergebnisse der einzelnen Modelle zusammengefasst, um keine Substanzen zu verlieren. Tabelle 3.2 zeigt die Anzahl der mit den einzelnen Modellen gefundenen Substanzen.

Tabelle 3.2 Ergebnisse der Pharmakophor-Suchen in einer virtuellen Substanzbibliothek mit ca. 2 Millionen Strukturen.

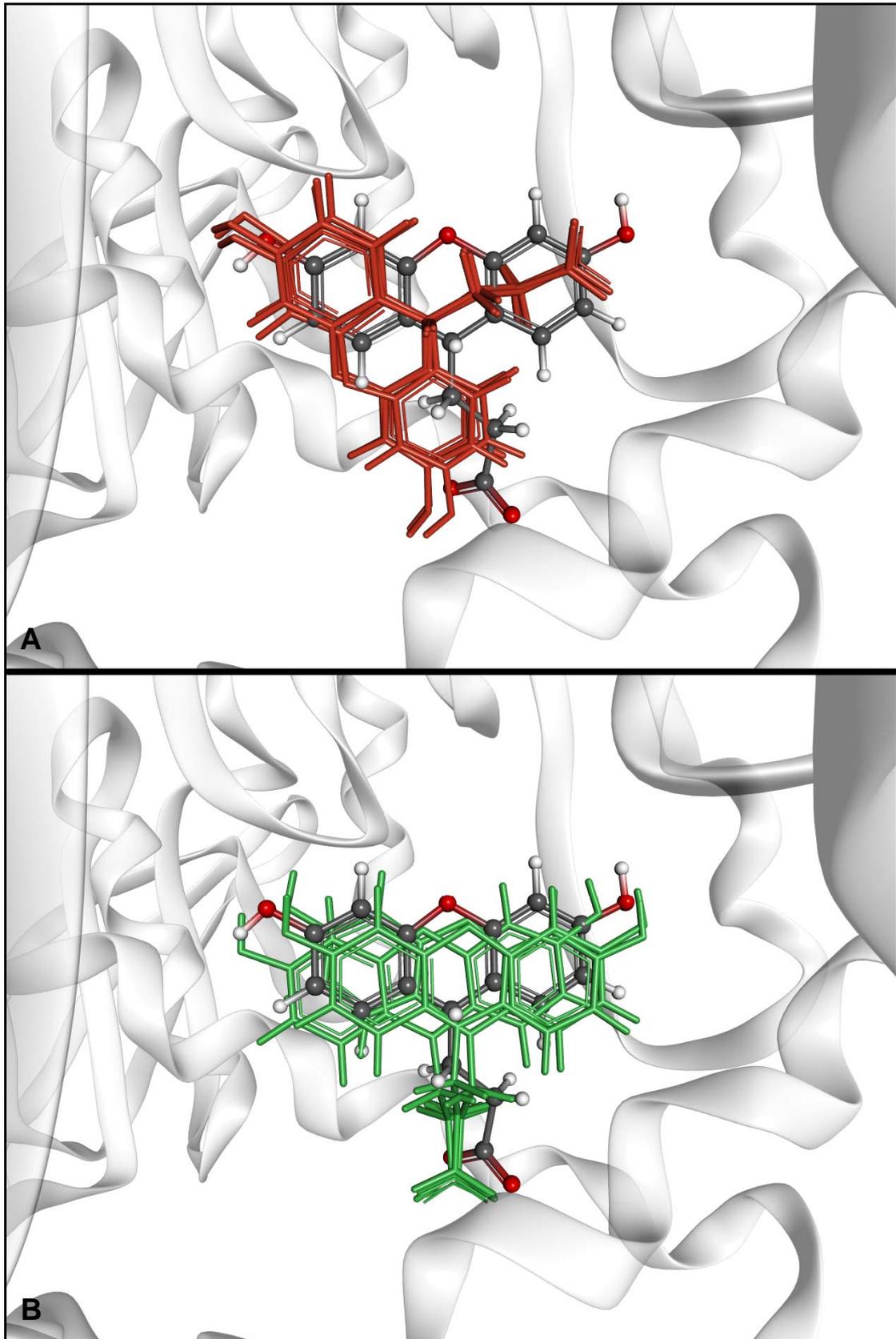
Pharmakophor-Modell	Kategorie	Anzahl der Treffer
1	1	89932
2	1	90271
3	1	90385
4	1	77082
5	2	90566
6	2	90129
7	2	88907
8	2	90925
9	3	108446
10	3	113679

Wie die Anzahl der Treffer zeigt, sind die Modelle der Kategorien 1 und 2 etwas stringenter als die Modelle der Kategorie 3. Nach dem Entfernen der Duplikate wurde aus dem zusammengefassten Strukturdatensatz mit dem Programm BCUT [MASON & BENO, 2000] ein hochdiverser Auszug mit 5391 Substanzen erstellt. Dieser Schritt war notwendig, da zu diesem Zeitpunkt die *Hardware* für ein Hoch-Durchsatz-*Docking*-Experiment (z. B. ein *Linux-Cluster*) noch nicht zur Verfügung stand und ein virtuelles *Screening* mit dem *Docking*-Ansatz somit nicht in vertretbaren Zeiträumen durchführbar gewesen wäre.

3.1.4 Optimierung und Validierung des *Docking*-Setups

Zu Beginn eines jeden *Docking*-Experimentes ist es notwendig, die Parameter des *Docking*-Programms für das jeweilige Zielprotein zu optimieren, sodass in vertretbarer Zeit ausreichend genaue Ergebnisse produziert werden. Dies beinhaltet auch die Auswahl einer geeigneten *Scoring*-Funktion, welche einerseits die Interaktionen zwischen Protein und Ligand bewertet und andererseits auch die generierten Ligandkonformationen im Protein optimiert. Dabei muss diejenige *Scoring*-Funktion identi-

fiziert werden, welche für die Bewertung und Reproduktion des jeweiligen Bindungsmodus am zweckmäßigsten ist. Im Falle der hGR musste die Scoring-Funktion sowohl hydrophobe Interaktionen des Liganden mit Phe-Resten als auch Wasserstoffbrücken zu Asn- und His-Resten des Proteins (siehe Abbildung 3.3) berücksichtigen. Eine adäquate Methode um die *Docking*-Parameter zu optimieren und geeignete *Scoring*-Funktionen zu identifizieren, ist das *Redocking*. Bei diesem Ansatz wird ein Ligand, der in einer Proteinstruktur co-kristallisiert ist, aus dieser extrahiert, anschließend minimiert und danach mit Hilfe der *Docking-Software* wieder in das Protein eingepasst. Es wird also überprüft, ob die *Software* in der Lage ist, die native Ligandkonformation im Protein zu reproduzieren. Diese Prozedur wird mehrmals durchgeführt und dabei jedes Mal die *Docking*-Parameter verändert bis zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Das Ergebnis des *Redockings* ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Nach der Optimierung der Parameter und unter Verwendung einer geeigneten *Scoring*-Funktion ist die *Software* GOLD in der Lage, die in der Kristallstruktur vorliegende Ligandkonformation zu reproduzieren. Wie auf der Abbildung zu erkennen ist, spielt die Auswahl der richtigen *Scoring*-Funktion eine sehr wichtige Rolle. So produziert die ChemScore-Funktion hier eine Ligandkonformation, die von der nativen Konformation abweicht (oberer Teil der Abbildung), wohingegen die GOLDScore-Funktion hier sehr gute Ergebnisse liefert (unterer Teil der Abbildung). In den folgenden *Docking*-Versuchen zeigte sich jedoch, dass mithilfe der ChemScore-Funktion eine bessere Trennung von hochaktiven und schwächer aktiven Substanzen bei gleichzeitiger Generierung plausibler Ligandkonformationen erreicht werden konnte. Deswegen wurden sowohl die ChemScore- als auch die GOLDScore-Funktion für die nachfolgenden Experimente verwendet.



Um die Abweichung der „gedockten“ Konformationen von der nativen Konformation zu quantifizieren, wurden RMSD-Werte berechnet (*root mean square deviation*). Diese stellen ein Maß für die Genauigkeit des *Dockings* dar. RMSD-Werte $<0,2$ nm (2 \AA) gelten dabei als sehr gut [FERRARA *et al.*, 2004]. Vor der Optimierung der Parameter lagen die ermittelten RMSD-Werte zwischen $0,5$ und $0,6$ nm (5 und 6 \AA), nach der Optimierung bei $0,086$ nm ($0,86 \text{ \AA}$). Es konnte also eine deutliche Verbesserung der Genauigkeit erzielt werden.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Geschwindigkeit des *Dockings* auf die Genauigkeit der erzielten Ergebnisse auswirkt. Hierzu wurde ein Testdatensatz mit 135 Substanzen verwendet, der sowohl hochaktive als auch schwächer aktive hGR-Inhibitoren enthielt. Damit war es einerseits möglich, zu überprüfen, ob das *Docking*-Programm in der Lage ist, zwischen hochaktiven und schwächer aktiven Substanzen zu differenzieren und andererseits eine Korrelation zwischen Geschwindigkeit und Genauigkeit abzuleiten. Bei diesen Experimenten wurden beide *Scoring*-Funktionen (ChemScore und GOLDScore) und drei Geschwindigkeitsstufen des genetischen Algorithmus (langsam, mittel, schnell) überprüft. Die Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen Korrelationen der Platzierungen der hochaktiven und schwächer aktiven Substanzen, die bei den verschiedenen Geschwindigkeitsstufen erzielt wurden, jeweils unter Verwendung der beiden *Scoring*-Funktionen. Unter der Annahme, dass die langsamste Geschwindigkeitsstufe die genauesten Ergebnisse erzielt, kann man erkennen, dass die mittlere Stufe hinreichend genaue Lösungen produziert, wohingegen die schnellste Stufe deutlich schlechter abschneidet. Für die weiteren *Screening*-Versuche wurde die mittlere Stufe verwendet, welche gute Ergebnisse in akzeptablen Zeiträumen ermöglichte.

Abbildung 3.9 (vorherige Seite). Reproduktion der nativen Ligandkonformation in der Kristallstruktur der hGR durch Redocking. Teil A der Abbildung zeigt *Docking*-Lösungen, die mit der ChemScore-Funktion erzielt wurden (rot), Teil B die Lösungen, die mit der GOLDScore-Funktion gewonnen wurden (grün). Als Referenz dient der Ligand aus der Kristallstruktur. Bei diesem Liganden ist nur die GOLDScore-Funktion in der Lage, die native Konformation des Liganden zu reproduzieren. Wie sich in weiteren Experimenten zeigte, ist jedoch auch die ChemScore-Funktion in der Lage, plausible Ligandenkonformationen zu produzieren.

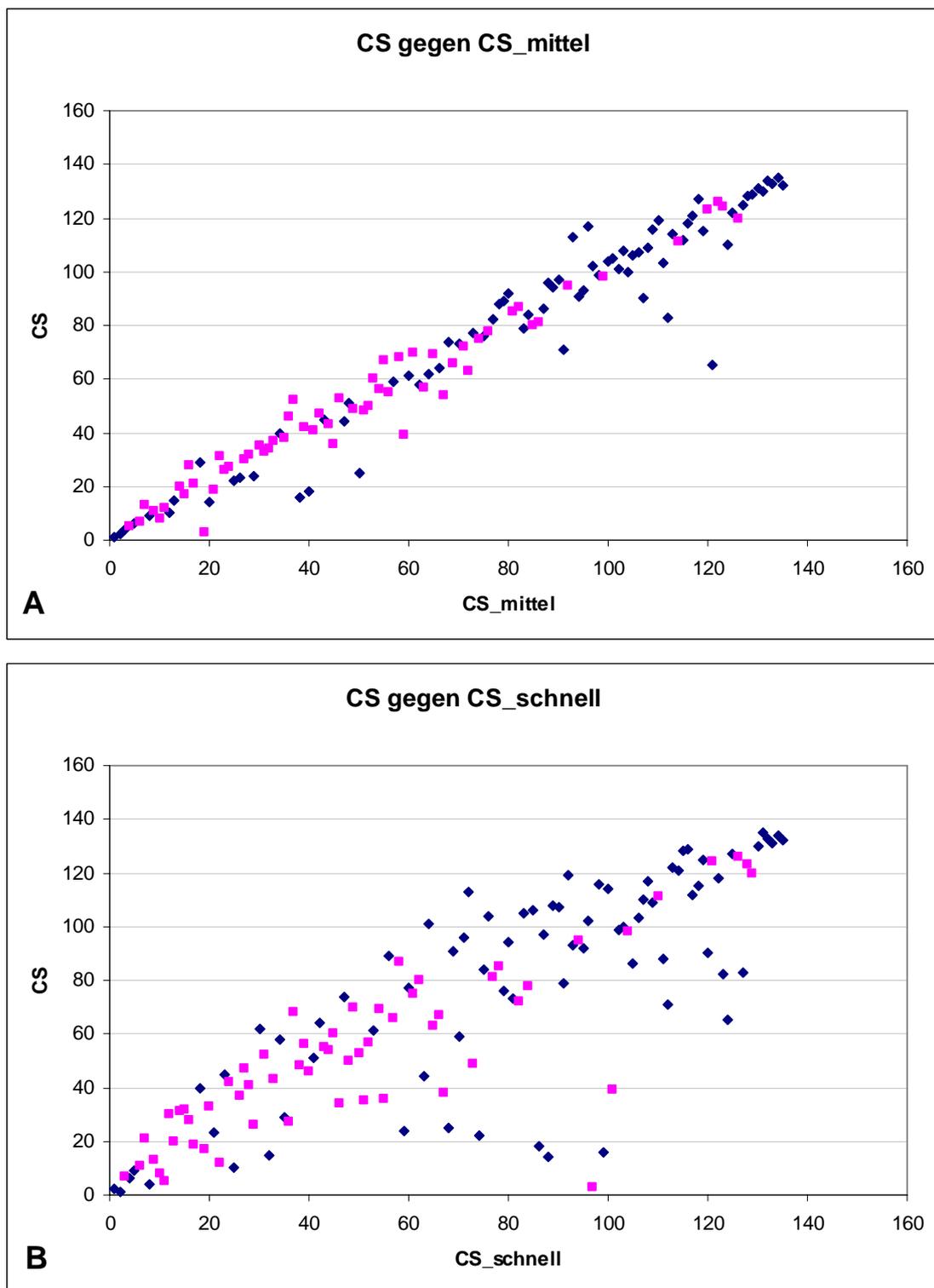


Abbildung 3.10 Korrelationen der Platzierungen hochaktiver und schwächer aktiver hGR-Inhibitoren (Docking mit ChemScore). Teil A der Abbildung zeigt die Platzierungen der Substanzen, die mit der langsamen Geschwindigkeitsstufe und unter Verwendung von ChemScore gedockt wurden (CS) gegen die Platzierungen der mittleren Geschwindigkeitsstufe (CS_mittel). Teil B der Abbildung vergleicht die langsame mit der schnellen Geschwindigkeitsstufe (CS_schnell). Hochaktive Substanzen sind in pink, schwächer aktive Substanzen in blau dargestellt.

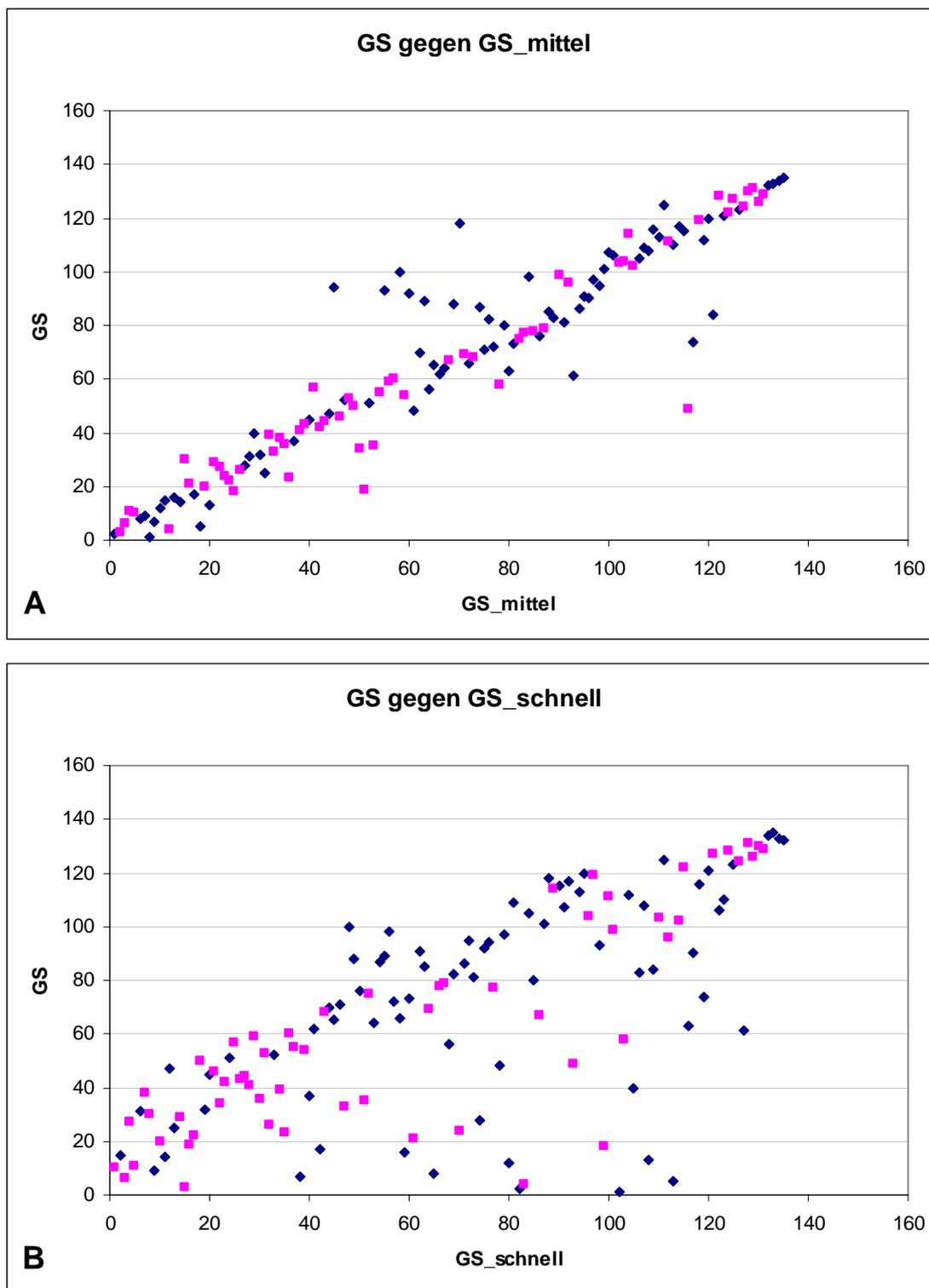


Abbildung 3.11 Korrelationen der Platzierungen hochaktiver und schwächer aktiver hGR-Inhibitoren (Docking mit GOLDScore). Teil A der Abbildung zeigt die Platzierungen der Substanzen, die mit der langsamen Geschwindigkeitsstufe und unter Verwendung von GOLDScore gedockt wurden (GS) gegen die Platzierungen der mittleren Geschwindigkeitsstufe (GS_mittel). Teil B der Abbildung vergleicht die langsame mit der schnellen Geschwindigkeitsstufe (GS_schnell). Hochaktive Substanzen sind in pink, schwächer aktive Substanzen in blau dargestellt.

Darüber hinaus kann man erkennen, dass die ChemScore-Funktion etwas besser in der Lage ist, hochaktive von schwächer aktiven Substanzen zu trennen: es werden mehr hochaktive Substanzen bei den niedrigen Platzierungen angereichert als bei der GOLDScore-Funktion.

3.1.5 Virtuelles Screening

Nach der Identifizierung der optimalen Parameter für die *Docking*-Experimente wurde der in 3.1.3 beschriebene hochdiverse Auszug auf potentielle Interaktionen mit der humanen Glutathion-Reduktase überprüft. Dazu wurde der Datensatz mit der *Docking-Software* GOLD unter Verwendung der in 3.1.4. beschriebenen Parameter in die Dimer-Kavität des Proteins eingepasst. Zur Überprüfung der Anreicherung wurden 59 hochaktive Substanzen unter den Auszug gemischt, woraus ein Datensatz mit 5450 Molekülen resultierte.

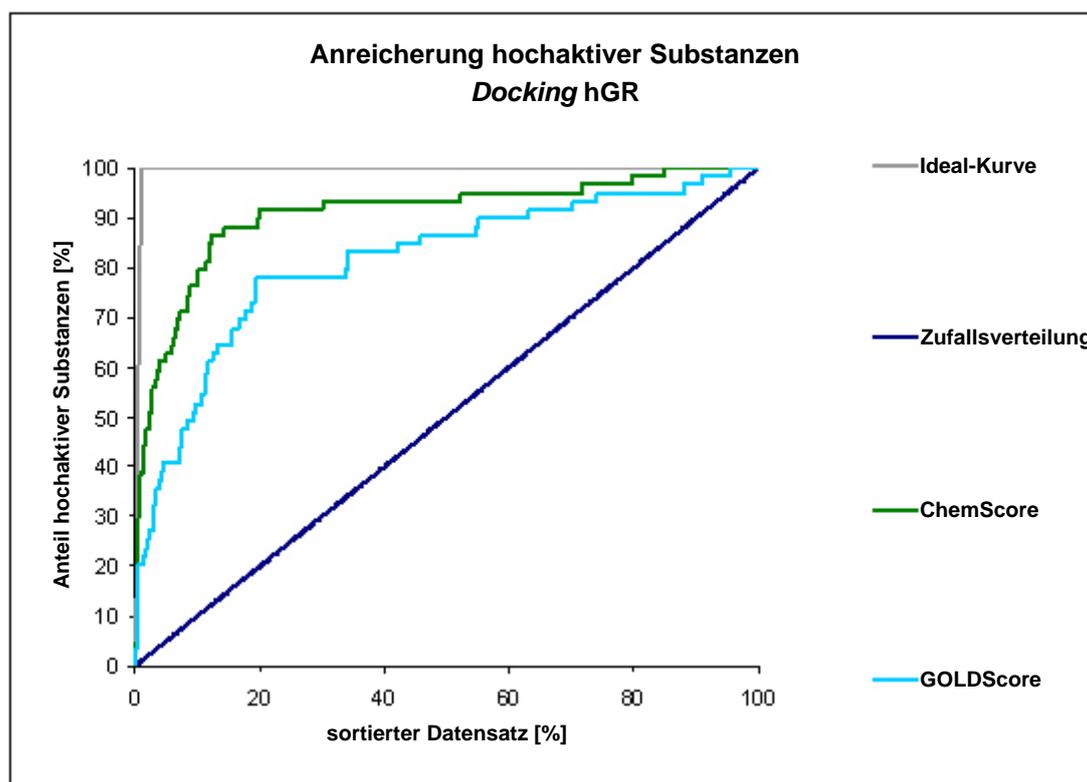


Abbildung 3.12 Anreicherung von hochaktiven Substanzen. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der beiden Anreicherungskurven, die mit der ChemScore- und der GOLDScore-Funktion erzielt wurden. Beide Scoring-Funktionen liefern Anreicherungen, die deutlich über der Zufallsverteilung (dunkelblau) liegen. Die ChemScore-Funktion (grün) lieferte eine bessere Anreicherung als die GOLDScore-Funktion (cyan).

Wie in Abbildung 3.12 zu erkennen ist, konnte mit beiden *Scoring*-Funktionen eine sehr gute Anreicherung erreicht werden. Die ChemScore-Funktion lieferte dabei leicht bessere Ergebnisse, was sich schon in den Validierungsversuchen (siehe Abbildung 3.10) abzeichnete. So konnten in den oberen 10% des nach den *Scoring*-Werten sortierten Datensatzes ca. 76% der hochaktiven Substanzen wieder gefunden werden, in den oberen 20% des Datensatzes sogar ca. 88%. Um die *Docking*-Ergebnisse auf ihre Plausibilität zu überprüfen, wurden die gedockten Konformationen von ca. 300 Substanzen, welche die höchsten *Scoring*-Werte erzielten, visuell inspiziert. Dabei wurde auch überprüft, ob die in 3.1.2. abgeleiteten Interaktionen (siehe Abbildung 3.3) wiedergefunden und neue potentielle Interaktionen identifiziert werden konnten. Da mit beiden *Scoring*-Funktionen richtige Konformationen erzielt werden konnten, wurde für die Auswahl der Substanzen, welche *in vitro* getestet werden sollten, ein manuelles *Consensus-Scoring* durchgeführt. Bei dieser Vorgehensweise wurden diejenigen Substanzen identifiziert, welche in beiden verwendeten *Scoring*-Funktionen gute Werte und richtige Konformationen erzielten. Für die *in vitro*-Versuche wurden insgesamt 40 Substanzen selektiert, die beispielsweise Strukturklassen wie substituierten Thiazolen, Benzothiazolen, Benzoxazolen und Thienopyrimidinen angehören (siehe Abbildung 3.13).

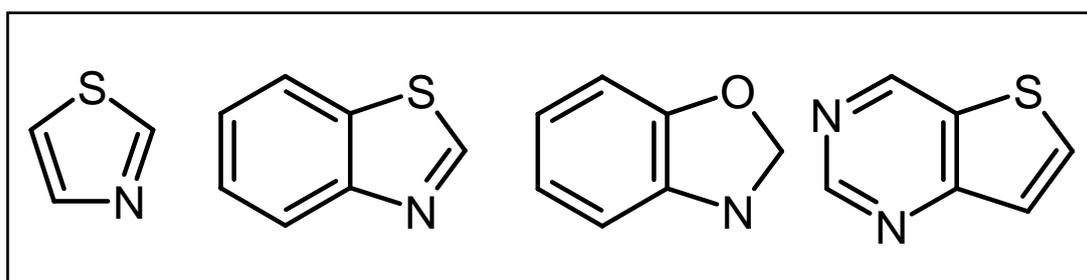


Abbildung 3.13 Substanzklassen, die für *in vitro*-Tests ausgewählt wurden. Für die *in vitro*-Tests auf Inhibierung der hGR wurden u. a. substituierte Thiazole, Benzothiazole, Benzoxazole und Thienopyrimidine selektiert (v. l. n. r.).

3.1.6 *In vitro*-Test der selektierten Substanzen

Vor der Verwendung in den *in vitro*-Experimenten wurden die 40 selektierten Substanzen mittels LC/MS-Messungen auf Reinheit und ihre Identität überprüft. Diese Messungen wurden von Liane Walther (*Lead Discovery/Compound Logistics*, Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim) durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Substanzen am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. H. Schirmer auf Inhibierung der hGR getestet. Dabei wurde über Detektion der Absorptionsänderung bei 340nm die von der Glutathion-Reduktase katalysierte Reaktion ($\text{NADPH} + \text{GSSG} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + 2 \text{GSH}$) in Anwesenheit der potentiellen Inhibitoren gemessen. Von den 40 getesteten Substanzen konnten 5 Inhibitoren die hGR-Aktivität signifikant hemmen. Sie erreichten IC_{50} -Werte zwischen 16 und $37\mu\text{M}$ (siehe Tabelle 3.3). Dabei ist zu beachten, dass für die Dimer-Kavität der hGR keine nanomolaren Inhibitoren zu erwarten sind und die bislang besten Inhibitoren, die aus der Literatur bekannt sind, ebenfalls im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich liegen.

Tabelle 3.3 IC_{50} -Werte (*in vitro*-Tests) der im virtuellen *Screening* identifizierten hGR-Inhibitoren.

Substanz	IC_{50} [μM]
1	19
2	37
3	24
4	27,5
5	16

3.1.7 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Nach der Bestätigung der inhibitorischen Wirkung in den *in vitro*-Experimenten wurden mithilfe von chemischen Ähnlichkeitsanalysen weitere potentielle Inhibitoren identifiziert. Dazu wurden sowohl Ähnlichkeitssuchen als auch Substruktursuchen auf Basis von Substanz 5

verwendet (siehe Tabelle 3.3). Eine solche Ermittlung von ähnlichen Substanzen ist sinnvoll, da die Testergebnisse dieser Substanzen in den *in vitro*-Experimenten wertvolle Informationen über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen liefern können. Ähnlichkeitssuchen identifizieren Substanzen, die ähnliche chemische Eigenschaften wie das Ausgangsmolekül aufweisen, aber durchaus einer anderen Strukturklasse angehören können. Substruktursuchen dagegen stellen eine Suche nach Strukturfragmenten dar. Es werden Moleküle identifiziert, welche das Ausgangsmolekül als Teil ihrer Struktur enthalten, aber weitere Substituenten besitzen. Mit diesen Methoden wurden 16 Substanzen ausgewählt, welche ebenfalls mit der Docking-Software GOLD in die Dimer-Kavität der hGR eingepasst (siehe 3.1.5) und mittels *in vitro*-Tests auf ihre biologische Wirksamkeit geprüft wurden (siehe 3.1.6). Dabei zeigten weitere 6 Substanzen eine sehr gute Inhibierung des Enzyms (siehe Tabelle 3.4).

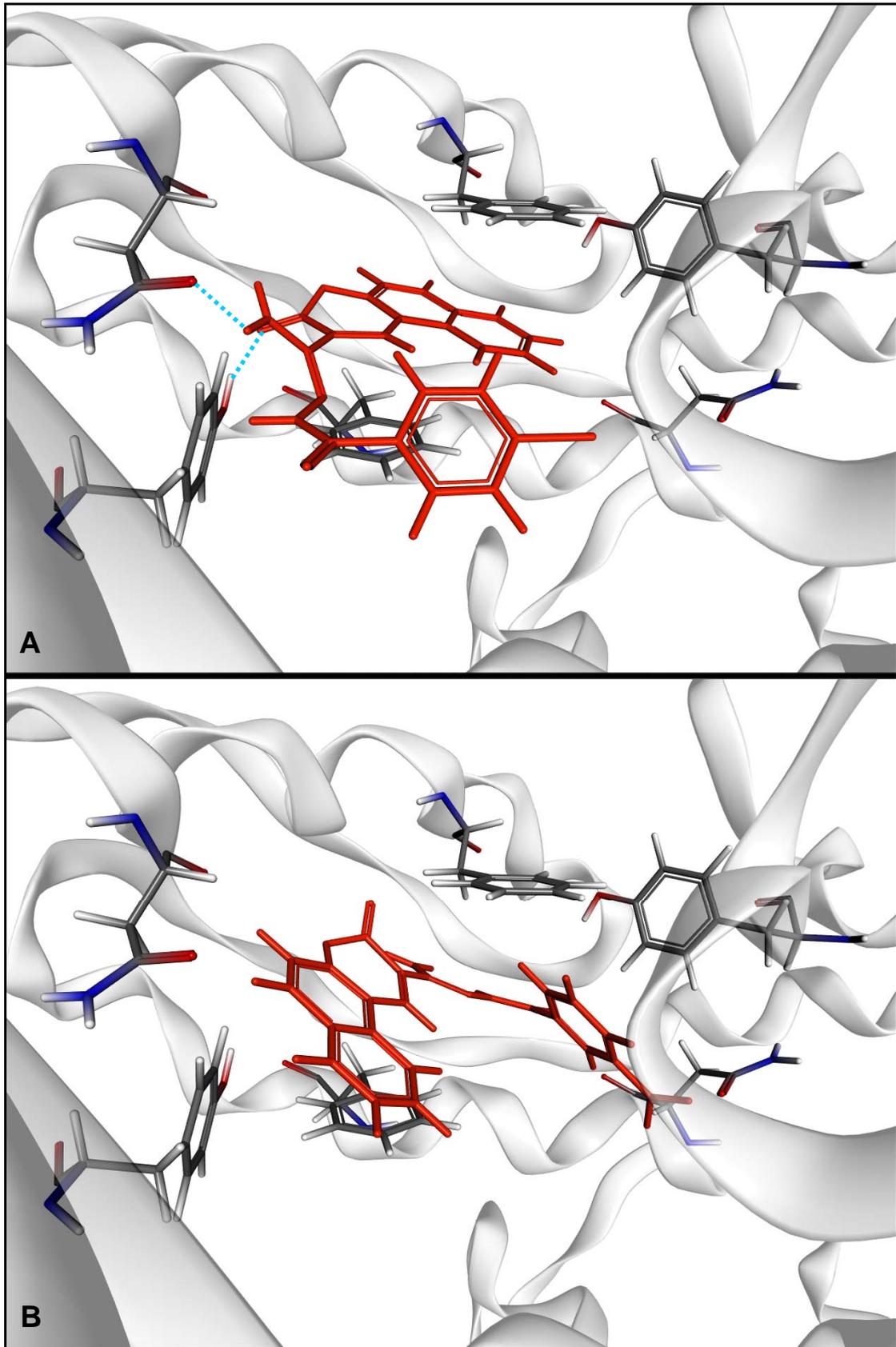
Tabelle 3.4 IC₅₀-Werte der mit Ähnlichkeits- und Substruktursuchen identifizierten Substanzen.

Substanz	IC ₅₀ [μM]
6	17
7	60
8	35
9	14,5
10	26
11	23

Als Ausgangsmolekül für die Ähnlichkeits- und Substruktursuchen wurde Substanz 5 (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

Die durch die Ähnlichkeitsanalysen identifizierten Substanzen weisen größtenteils vergleichbare Aktivitäten wie die mit den *Docking*-Versuchen gefundenen Moleküle auf. Dies gilt auch für Substanz 9, welche jedoch einer anderen Strukturklasse angehört. Diese Substanz zeigt die höchste Aktivität aller hier untersuchten Inhibitoren.

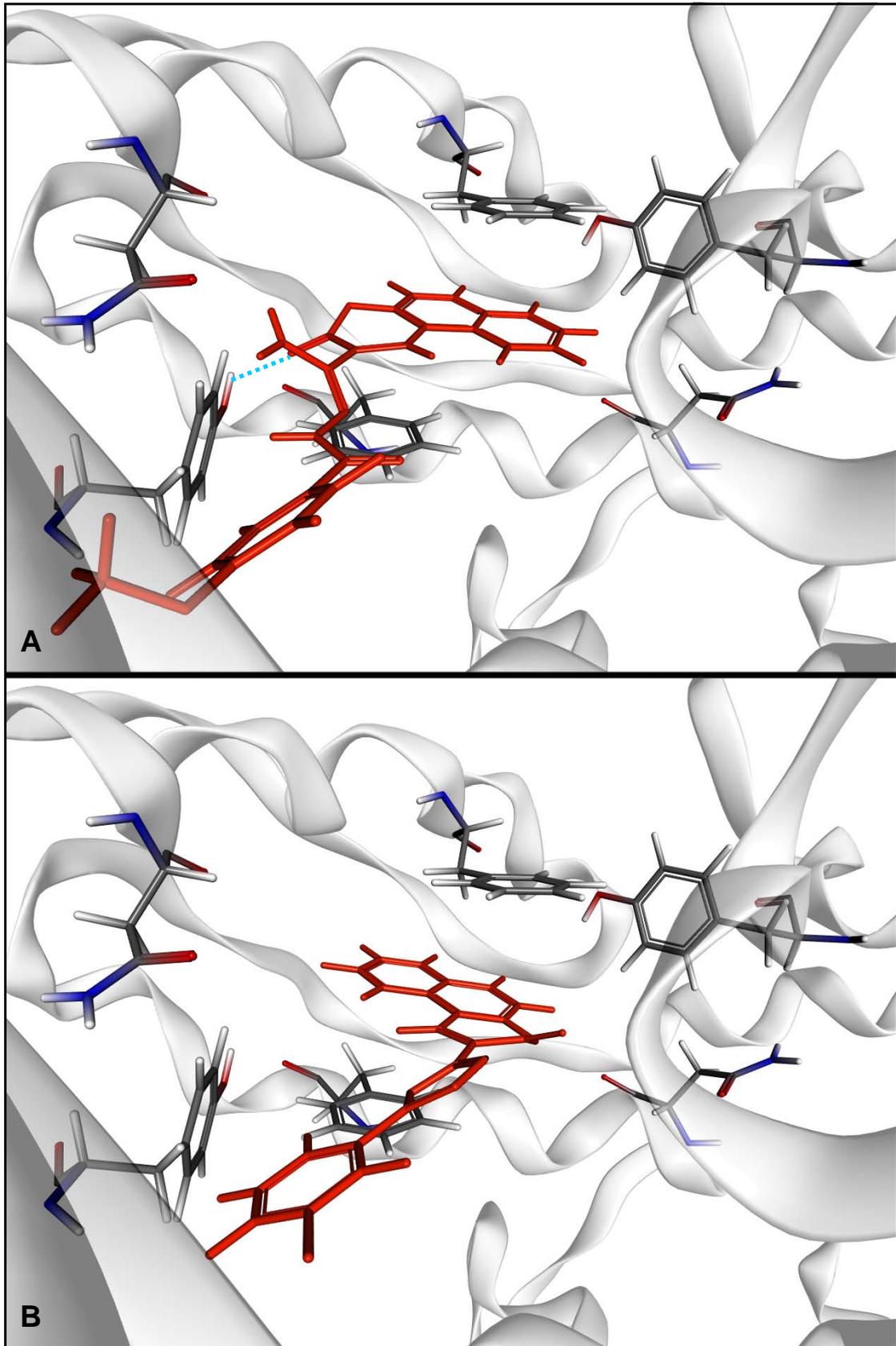
In einem nachfolgenden Experiment wurde überprüft, ob es durch eine Analyse der gedockten Konformationen dieser Inhibitoren möglich war, Abschätzungen über Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu treffen und Korrelationen zwischen dem Bindungsmodus und der inhibitorischen Aktivität abzuleiten. Die Abbildungen 3.14 und 3.15 zeigen die gedockten Konformationen der Substanzen 6-9.



Die *Docking*-Lösung von Substanz 6 (para-Brom-Substitution am Phenylring) zeigt, dass das Molekül eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asn71 sowie π - π -*stacking*-Interaktionen zu Phe78/Phe78' eingehen kann. Darüber hinaus bildet die Substanz eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr407 aus. Eine Interaktion mit Tyr407 ist insofern neu, da der cokrystallisierte Inhibitor XAN (siehe Abbildung 3.3) keine Wechselwirkung mit diesem Aminosäure-Rest zeigt. Die Kombination der Interaktionen des Inhibitors mit den Aminosäuren Phe78/Phe78', Asn71 bzw. Tyr407 resultieren in einem sehr guten IC_{50} -Wert von $17\mu M$.

Die Nitrogruppe der Substanz 7, welche sich in meta-Position am Phenylring befindet, veranlasst das Molekül eine ungünstige Position einzunehmen. Das aromatische Ringsystem ist nicht mehr parallel zu den beiden Phe-Resten ausgerichtet, sodass π - π -*stacking*-Interaktionen nicht mehr stattfinden können. Desweiteren können weder Wasserstoffbrücken zu den Asn- und Tyr-Resten noch zu Wassermolekülen ausgebildet werden, da die Interaktionspartner zu weit entfernt liegen. Da in diesem Fall die für Substanz 6 auftretenden Wechselwirkungen mit dem Protein ausbleiben, hemmt der Inhibitor 7 die hGR-Aktivität deutlich schlechter (IC_{50} -Wert: $60\mu M$).

Abbildung 3.14 (vorherige Seite) Gedockte Konformationen der Substanzen 6 und 7. Zur besseren Übersicht wurde die Ansicht im Vergleich zur Abbildung 3.3 um 115° in der x-Achse zum Betrachter hin und um 15° in der y-Achse gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Substanz 6 (A) hat einen IC_{50} -Wert von $17\mu M$. Substanz 7 (B) nimmt eine für Interaktionen mit dem Protein ungünstige Position ein. Dies resultiert in einem deutlich schlechteren IC_{50} -Wert ($60\mu M$). Wichtige Aminosäuren der Dimer-Kavität sind in Atomfarben, der Inhibitor in rot und das Rückgrat des Proteins in weiß dargestellt.



Substanz 8, welche eine para-methoxy-Substitution am Phenylring besitzt, nimmt im Vergleich zu Substanz 7 eine für Interaktionen mit dem Protein günstigere Position ein. Das aromatische Ringsystem liegt fast parallel zu den beiden Phe-Resten, sodass π - π -stacking-Interaktionen stattfinden können. Jedoch bildet das Molekül nur eine Wasserstoffbrücke zu Tyr407 aus, die Wasserstoffbrückenbindung zum Asparaginrest unterbleibt. Folgerichtig hemmt die Substanz 8 das Enzym deutlich besser als Substanz 7 (IC₅₀-Wert: 60 μ M), aber schlechter als Substanz 6 (IC₅₀-Wert: 17 μ M). Der für Substanz 8 gemessene IC₅₀-Wert beträgt 35 μ M.

Während die Substanzen 6-8 und 10-11 einer chemischen Strukturklasse angehören, stellt Substanz 9 eine Variation dieser Strukturklasse dar. Hier ist der Phenylring, welcher in meta-Position mit Chlor substituiert ist, über ein Oxadiazol mit dem aromatischen Ringsystem verbunden. Das Molekül nimmt ebenfalls eine für Interaktionen mit dem Protein sehr günstige Position ein. So ist das aromatische Ringsystem, ähnlich wie bei Substanz 8, fast parallel zu den Phe-Resten orientiert. Zusätzlich werden zwei weitere Wasserstoffbrücken zu umgebenden Wassermolekülen ausgebildet (diese sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 3.15 nicht gezeigt). Diese Wechselwirkungen führen zu einer sehr guten Hemmung des Enzyms. Mit einem IC₅₀-Wert von 14,5 μ M handelt es sich um den besten Inhibitor, der im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Substanzen mit der para-Brom- und der meta-Chlor-Substitution am Phenylring die höchsten Aktivitäten aufweisen. Für die Affinität der Bindung sind π - π -stacking-Interaktionen und Wasserstoffbrücken von entscheidender Bedeutung. Auffällig ist, dass die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche sehr schön mit den *in silico Docking*-Experimenten korrelieren.

Abbildung 3.15 (vorherige Seite) Gedockte Konformationen der Substanzen 8 und 9. Substanz 8 (A) kann Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen, bildet jedoch nur eine Wasserstoffbrückenbindung zu Tyr407 aus. Die Kombination der Wechselwirkungen resultiert in einem IC₅₀-Wert von 35 μ M. Die Konformation von Substanz 9 (B) erlaubt ebenfalls gute Interaktionen mit dem Protein. Darüber hinaus werden zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu umgebenden Wassermolekülen ausgebildet (nicht gezeigt). Die Substanz gehört einer anderen Strukturklasse an. Der IC₅₀-Wert liegt bei 14,5 μ M.

3.1.8 Glutathion-Reduktase von *Plasmodium falciparum*

Da die Dimer-Kavität der Glutathion-Reduktase von *Plasmodium falciparum* Ähnlichkeiten zur Kavität der hGR aufweist (siehe 3.1.2), wurde versucht, Moleküle zu identifizieren, welche in der Lage sind, beide Enzyme zu inhibieren. Dazu wurden die Substanzen 6 bis 11 in *in vitro*-Experimenten auf potentielle Inhibition der pfGR untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse in *Docking*-Experimenten nachvollzogen.

3.1.8.1 *In vitro*-Test von hGR-Inhibitoren auf pfGR

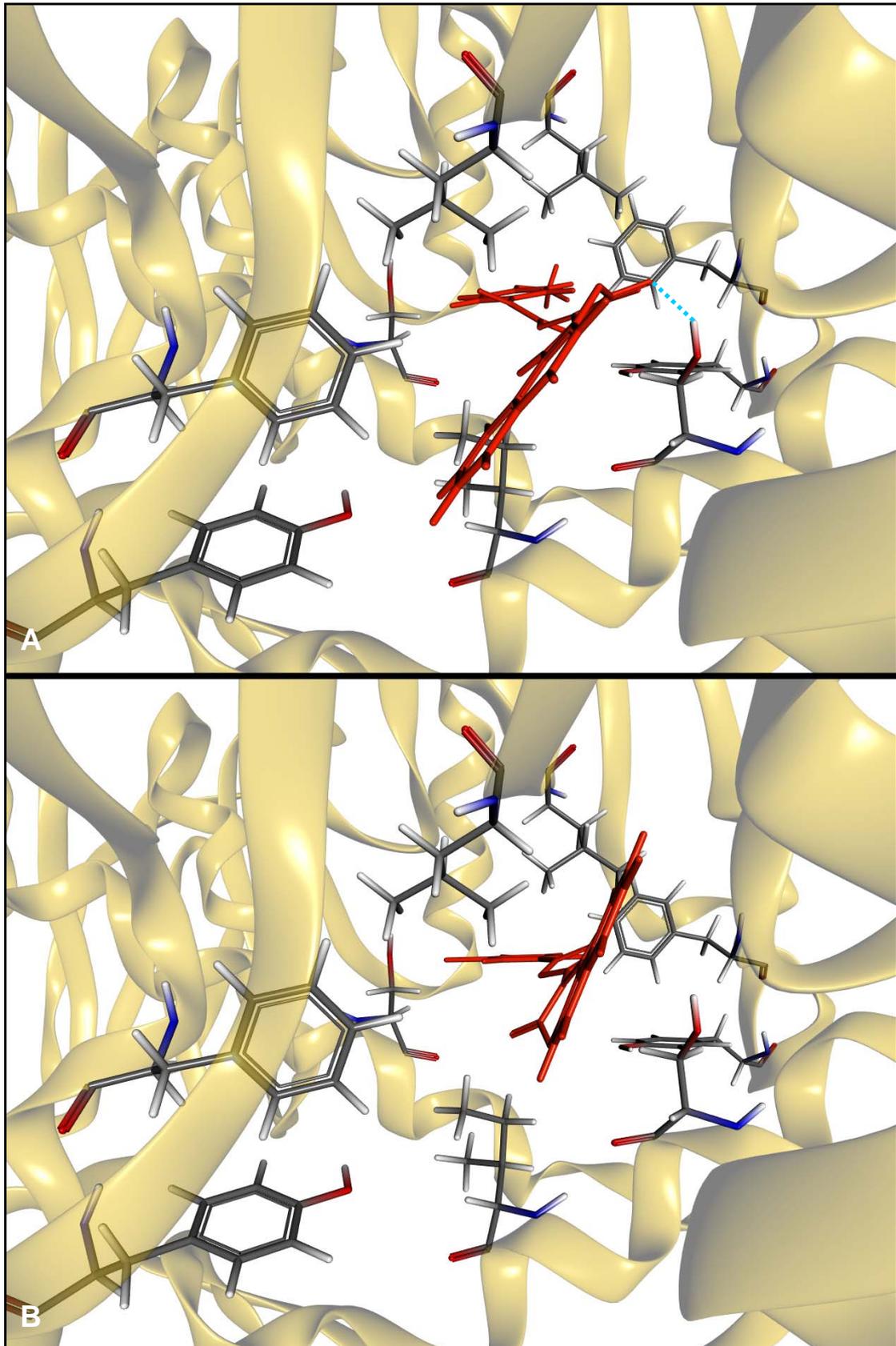
Ein *in vitro*-Test der Substanzen 6 bis 11 zeigte, dass 5 der Inhibitoren, welche die hGR hemmen, auch die pfGR inhibierten (siehe Tabelle 3.5). Die Unterschiede im Grad der Inhibierung sind auf die verschiedenen Geometrien der Dimer-Kavitäten beider Enzyme sowie die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften zurückzuführen. So fehlen bei der pfGR z. B. die beiden parallel angeordneten Phe-Reste, welche bei der hGR die Inhibormoleküle umschließen und π - π -*stacking*-Interaktionen mit dem Ligand eingehen können.

Tabelle 3.5 IC₅₀-Werte (pfGR) der mit Ähnlichkeits- und Substruktursuchen identifizierten Substanzen 6-11.

Substanz	IC ₅₀ [μ M]
6	40
7	nicht aktiv
8	38
9	50
10	45
11	28

3.1.8.2 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei pfGR-Inhibitoren

Im Anschluss an die *in vitro*-Experimente wurde versucht, die Ergebnisse mit *in silico*-Versuchen nachzuvollziehen. Hierzu wurden die Substanzen 6 bis 11 aus 3.1.7 mit Hilfe des *Docking*-Algorithmus in die Kristallstruktur der pfGR (PDB-Acc-Nr.: 1ONF) eingepasst. Dabei zeigte sich, dass die meisten der gedockten Konformationen plausible Bindungsmodi darstellten und die Moleküle gute *Scoring*-Werte erreichten. Die Abbildungen 3.16 und 3.17 zeigen die gedockten Konformation der Substanzen 8, 9 und 11.



Die *Docking*-Lösung von Substanz 8 (para-methoxy-Substitution am Phenylring) zeigt, dass das aromatische Ringsystem in einen hydrophoben Bereich des Proteins ragt. Zusätzlich kann eine Wasserstoffbrücke zu Ser55 ausgebildet werden, was für eine gute Interaktion zwischen Inhibitor und Ligand sorgt. Dies resultiert in einer guten inhibitorischen Aktivität und einem IC_{50} -Wert von $38\mu\text{M}$.

Wie die gedockte Konformation von Substanz 9 (meta-Chlor-Substitution am Phenyl-Ring) zeigt, sind hier, bedingt durch zu große Abstände, weder hydrophobe Interaktionen noch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Ligand möglich. Dies führt dazu, dass diese Substanz, die im *in vitro*-Test auf die hGR die beste Aktivität aufwies (IC_{50} -Wert: $14,5\mu\text{M}$) im Falle der pfGR nur eine niedrige Aktivität zeigt (IC_{50} -Wert: $50\mu\text{M}$).

Abbildung 3.16 (vorherige Seite) Gedockte Konformationen der Substanzen 8 und 9. Substanz 8 (A) nimmt eine für Interaktionen mit dem Protein geeignete Position ein. Es kann eine Wasserstoffbrücke zu Ser55 ausgebildet werden. Die Substanz hat einen IC_{50} -Wert von $38\mu\text{M}$. Die Konformation von Substanz 9 ist für Interaktionen mit dem Protein weniger gut geeignet. Durch die Position des Liganden sind keine Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäuren möglich. Darüber hinaus können keine Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Der IC_{50} -Wert dieser Substanz liegt bei $50\mu\text{M}$. Wichtige Aminosäuren der Dimer-Kavität sind in Atomfarben, der Inhibitor in rot und das Rückgrat des Proteins in gelb dargestellt.

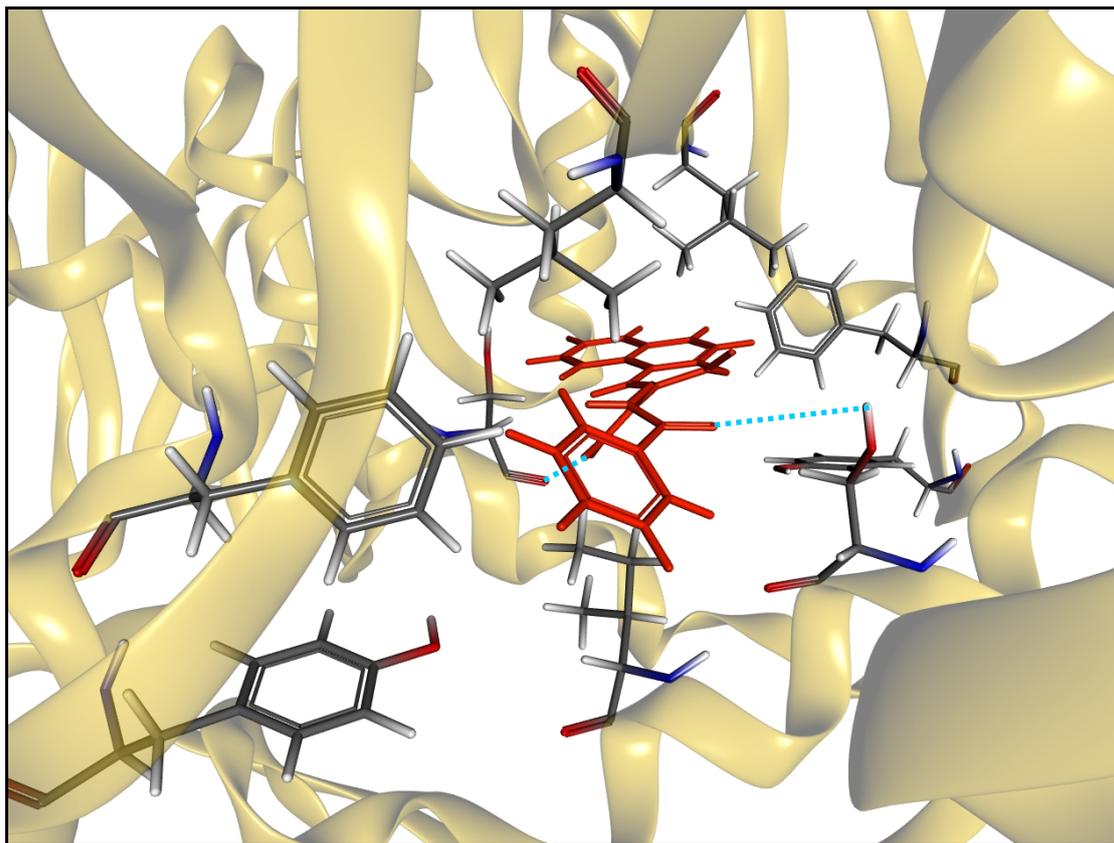


Abbildung 3.17 Gedockte Konformation der Substanz 11. Die Konformation dieser Substanz erlaubt gute Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des Proteins. Einerseits wird der hydrophobe Bereich des Proteins durch den Phenyl-Ring adressiert, andererseits können zwei Wasserstoffbrücken zu Ser55/Ser55' ausgebildet werden. Diese guten Interaktionsmöglichkeiten korrelieren mit der guten Aktivität von 28 μ M (IC₅₀-Wert).

Die gedockte Konformation dieser Substanz, welche keine Substitution am Phenyl-Ring trägt, lässt auf sehr gute Interaktionsmöglichkeiten mit dem Protein schließen. Ähnlich wie bei Substanz 8, ragt hier der Phenyl-Ring in einen hydrophoben Bereich des Proteins. Darüber hinaus können zwei Wasserstoffbrücken mit Ser55 und Ser55' ausgebildet werden. Diese Wechselwirkungen führen zu einer guten biologischen Aktivität (IC₅₀-Wert: 28 μ M), welche mit der Aktivität dieser Substanz auf der hGR vergleichbar ist.

Bei allen diesen *Docking*-Experimenten war eine gute Korrelation zwischen den vorgeschlagenen Bindungsmodi und den gemessenen Aktivitäten zu beobachten. Es konnte somit nachvollzogen werden, warum einige Inhibitoren die pfGR hemmen und andere nicht.

3.2 Trypanothion-Reduktase

Ein weiterer Vertreter der hier untersuchten Klasse 1 der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen ist die Trypanothion-Reduktase (TR). Sie katalysiert die Reduktion von Trypanothion, dem wichtigsten Antioxidans in Trypanosomen und Leishmanien. Ähnlich wie Plasmodien sind auch Trypanosomen und Leishmanien sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress, weshalb die Trypanothion-Reduktase ein sehr attraktives Zielprotein für die Medikamentenentwicklung darstellt. Darüber hinaus scheint das Trypanothion/Trypanothion-Reduktase-System auf Protozoen beschränkt zu sein, was seine Attraktivität als Angriffspunkt für trypanozide Medikamente erhöht, da wenig Nebenwirkungen für den Wirtsorganismus zu befürchten sind [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2003].

3.2.1 Suche nach subversiven Substraten

Neben kompetitiven und nichtkompetitiven Inhibitoren stellen auch die subversiven Substrate eine wichtige Gruppe von Inhibitoren der Disulfidreduktasen dar. Diese Substanzen werden in einem Einelektronenschritt zu einem Radikal reduziert, welches – sofern das Redoxpotential niedrig genug ist – im Anschluss nichtenzymatisch von molekularem Sauerstoff reoxidiert wird. Dabei entstehen sehr reaktive Superoxidradikale. Darüber hinaus werden die Substrate der Disulfidreduktasen nicht mehr oder nur eingeschränkt reduziert. Durch die Radikalbildung und den Mangel an Antioxidantien steigt der oxidative Stress in der Zelle massiv an. Abbildung 3.18 zeigt zwei in der Literatur beschriebene subversive Substrate der TR und die durch die Einelektronenreduktion entstehenden Radikale. Bei den gezeigten Strukturklassen handelt es sich um Nitrofurane und Chinone.

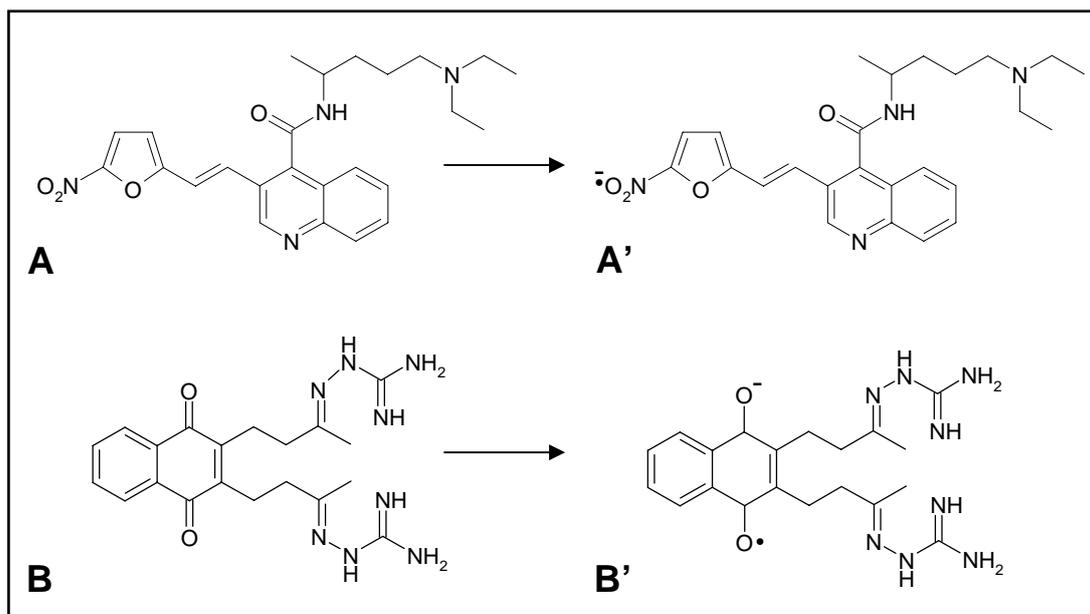


Abbildung 3.18 Subversive Substrate der Trypanothion-Reduktase. Nitrofuran- und Chion-Derivate (A und B) werden von der TR in einem Einelektronenschritt zu Radikalen (A' und B') reduziert. Diese Radikale werden von molekularem Sauerstoff reoxidiert, was zur Bildung von Superoxidradikalen führt [BLUMENSTIEL *et al.*, 1999; KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2005].

Auf Basis dieser Substanzen wurden mit Substruktur- und Ähnlichkeits-suchen weitere potentielle subversive Substrate identifiziert. Dabei wurde versucht, potentiell relevante chemische Komponenten (hydrophobe und reduzierbare Gruppen) beizubehalten. Im Falle der Nitrofurane wurde aus Gründen der Toxizität zusätzlich versucht, bioisostere Substanzen mit geringer Toxizität zu finden (siehe Abbildung 3.19).

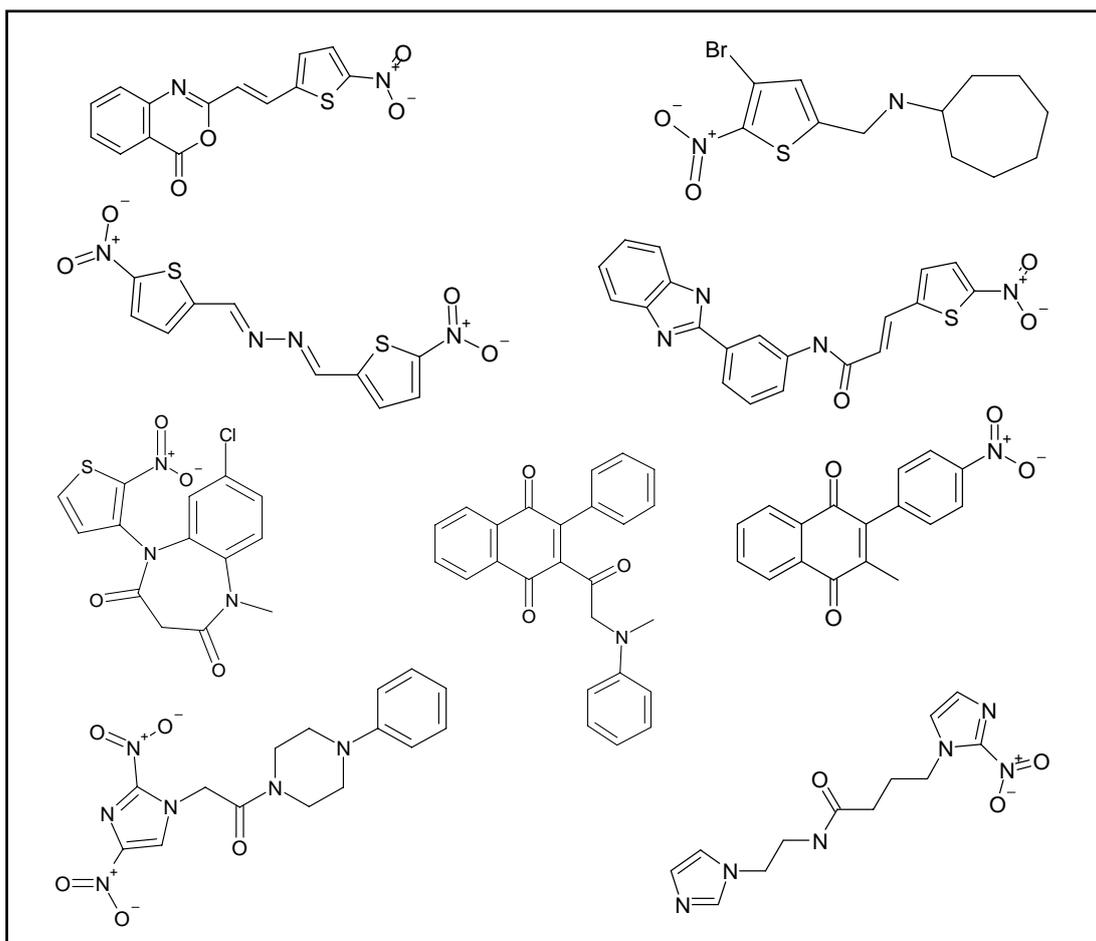


Abbildung 3.19 Auswahl an potentiellen subversiven Substraten der TR. Diese Abbildung zeigt eine Auswahl an potentiellen subversiven Substraten der TR, darunter Substanzen, welche zu den Nitrofuranen bioisoster sind, wie Nitroimidazole und Nitrothiophene.

Als bioisostere Alternativen zu den Nitrofuranen wurden Nitroimidazole und Nitrothiophene identifiziert. Da nicht klar ist, welche Bindungstasche durch die subversiven Substrate adressiert wird (Dimer-Kavität und evtl. auch das aktive Zentrum der TR) wurden zusätzlich auch Substanzen identifiziert, welche Strukturelemente von Inhibitoren enthalten, die bekanntermaßen im aktiven Zentrum binden (z. B. Azepine). Ferner wurde die Klasse der Chinone, welche als subversive Substrate bekannt ist, mit Nitrogruppen verknüpft um mehrere reduzierbare Gruppen zur Verfügung zu stellen. Diese subversiven Substrate wurden nach theoretischen Gesichtspunkten ausgewählt. Die biologische Aktivität muss in entsprechenden *in vitro*-Experimenten nachgewiesen werden.

3.2.2 Homologie-Modell der TR von *Leishmania donovani*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch einen *in silico*-Vergleich der TR von *T. cruzi* und *L. donovani* abgeschätzt werden, ob potentielle Inhibitoren, die gegen *T. cruzi* entwickelt wurden, auch die TR von *L. donovani* hemmen können. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine bioinformatische Analyse von TR-Sequenzen verschiedener Trypanosomatiden durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Sequenzen einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen. So liegt die Vermutung nahe, dass Substanzen, welche die Trypanothion-Reduktase von Trypanosomen inhibieren, auch das Potential besitzen, das Enzym von Leishmanien zu hemmen. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen und anhand von 3D-Informationen eine bessere Abschätzung treffen zu können, wurde auf Basis einer Kristallstruktur der TR von *T. cruzi* (PDB-Acc.-Nr.: 1GXF) ein Homologie-Modell für die TR von *Leishmania donovani* erstellt. Diese Kristallstruktur wurde als Templat für die Modellierung ausgewählt, da die korrelierende Aminosäuresequenz einen sehr hohen Konservierungsgrad (66% identische und 79% ähnliche Aminosäuren) und die Struktur eine relativ gute Auflösung (2,7Å (0,27nm)) aufwies. Darüber hinaus ist ein Inhibitor in der Struktur co-kristallisiert, sodass diese eine für die Aufnahme von Liganden geeignete Konformation aufweist. Zu Beginn wurde ein *Alignment* der TR-Sequenz von *L. donovani* mit der Sequenz der Templat-Struktur erstellt und dieses manuell korrigiert. Anhand dieses *Alignments* wurden 10 Homologie-Modelle generiert. Nach der Modellierung wurde mittels verschiedener Parameter wie z. B. Verletzungen der Wahrscheinlichkeits-Dichte-Funktionen (*probability density functions*, PDFs) und der Gesamtenergie die Qualität der berechneten Modelle überprüft. PDFs beschreiben räumliche Beschränkungen geometrischer Eigenschaften wie z. B. Bindungslängen, Bindungswinkel, Diederwinkel, van der Waals-Abstoßungen und Disulfidbrücken. Zur Ableitung dieser Beschränkungen wurden Datenbanken mit Referenzproteinstrukturen verwendet [SALI & OVERINGTON, 1994.]. Die Abbildung 3.20 zeigt die Superposition des besten Modells mit der Templat-Struktur.

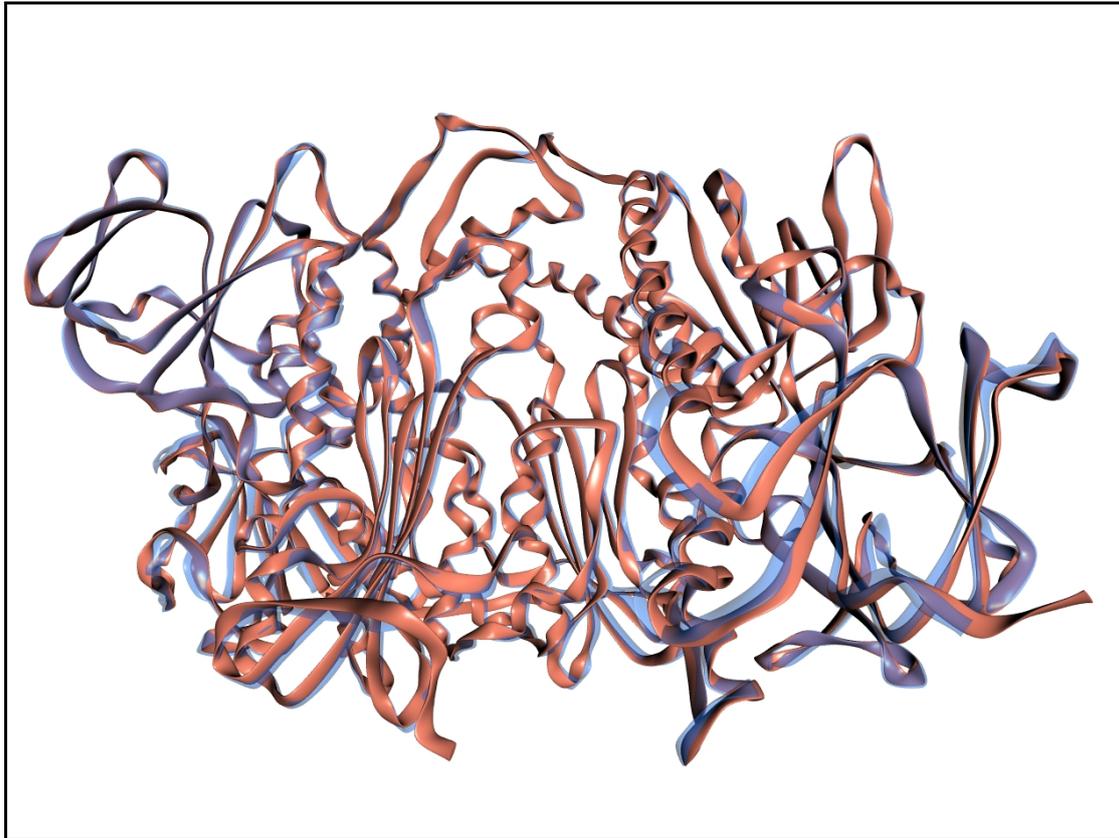


Abbildung 3.20 Homologie-Modell der Trypanothion-Reduktase von *Leishmania donovani*. Die Abbildung zeigt die Sekundärstruktur des berechneten Homologie-Modelles (orange) und die Sekundärstruktur des Templates (transparent blau) von *Trypanosoma cruzi* (PDB-Acc.-Nr.: 1GXF). In der Superposition der beiden Strukturen kann man erkennen, dass diese annähernd deckungsgleich sind.

Wie die Abbildung 3.20 zeigt, weist das Homologie-Modell der TR von *L. donovani* auf Sekundärstrukturebene eine sehr hohe Ähnlichkeit mit der Templat-Struktur von *T. cruzi* auf. Dies gilt für die α -helikalen Bereich, die β -Faltblätter und auch für die *Loop*-Regionen. Abgesehen von leichten Verschiebungen (rechts im Bild) sind die Strukturen fast deckungsgleich. Um eine Abschätzung über die potentielle Bindung von Inhibitoren der TR von *T. cruzi* an die TR von *L. donovani* treffen zu können, ist neben der Sekundärstruktur natürlich die Ausrichtung der Aminosäureseitenketten der beiden potentiellen Bindungsstellen (Dimer-Kavität und aktives Zentrum) von besonderem Interesse.

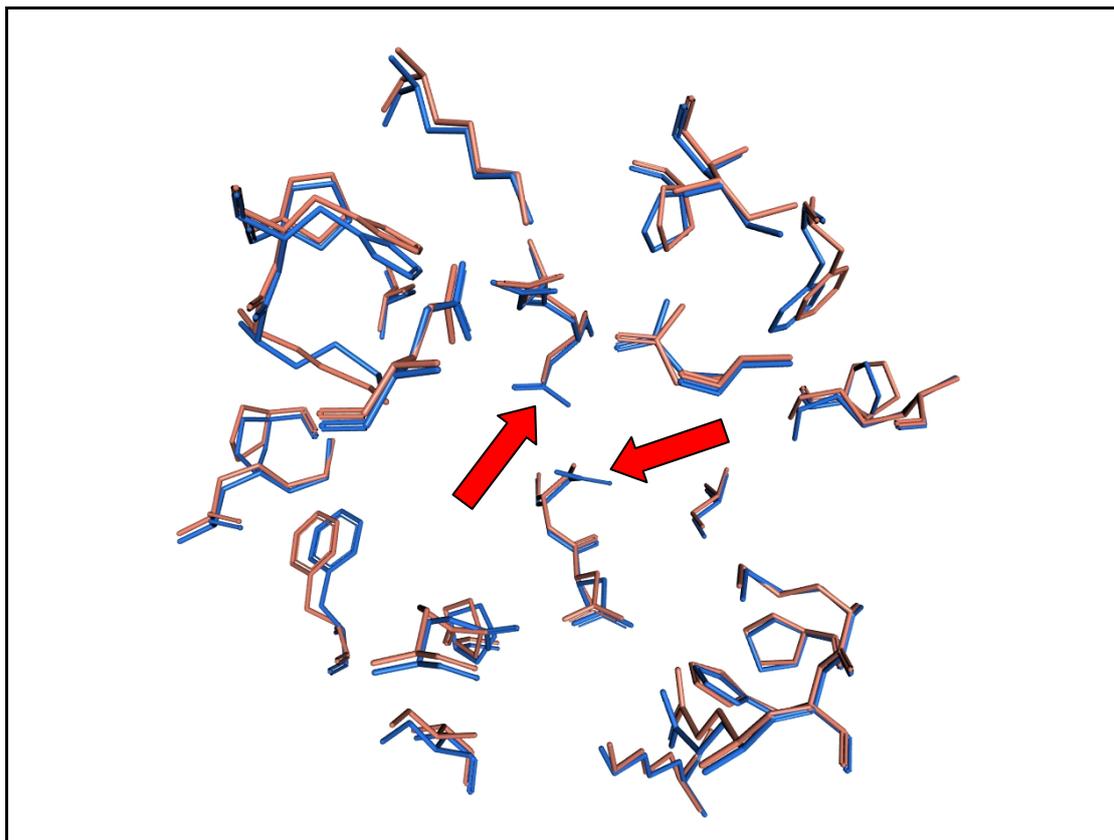


Abbildung 3.21 Aminosäuren der Dimer-Kavität der TR. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der wichtigsten Aminosäuren der Dimer-Kavität im Homologie-Modell (orange) und im Templat (blau). Die Kavität setzt sich aus Aminosäuren beider Untereinheiten zusammen. Man kann erkennen, dass die Seitenketten sehr ähnliche Konformere einnehmen. Die roten Pfeile markieren einen Austausch von Asn433 zu Ser433.

Abbildung 3.21 zeigt im Vergleich die Ausrichtung der Seitenketten der Aminosäuren in der Dimer-Kavität der beiden Enzyme. Zum einen kann man erkennen, dass die Aminosäuren bis auf einen Austausch von Asn433 (TR von *T. cruzi*) zu Ser433 (TR von *L. donovani*) (siehe rote Pfeile) identisch sind und zum anderen sehr ähnliche Konformere einnehmen. Minimale Verschiebungen sind bei einigen Histidinen, Prolinen und Phenylalaninen zu erkennen.

Eine Analyse des aktiven Zentrums der Enzyme zeigt ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 3.22). Auch hier nehmen die Seitenketten sehr ähnliche räumliche Ausrichtungen ein. Allerdings fehlt Arg287 im Enzym von *L. donovani*. Zusätzlich weist dieses Protein einen Austausch (Phe198 zu Tyr198, siehe roter Pfeil) auf.

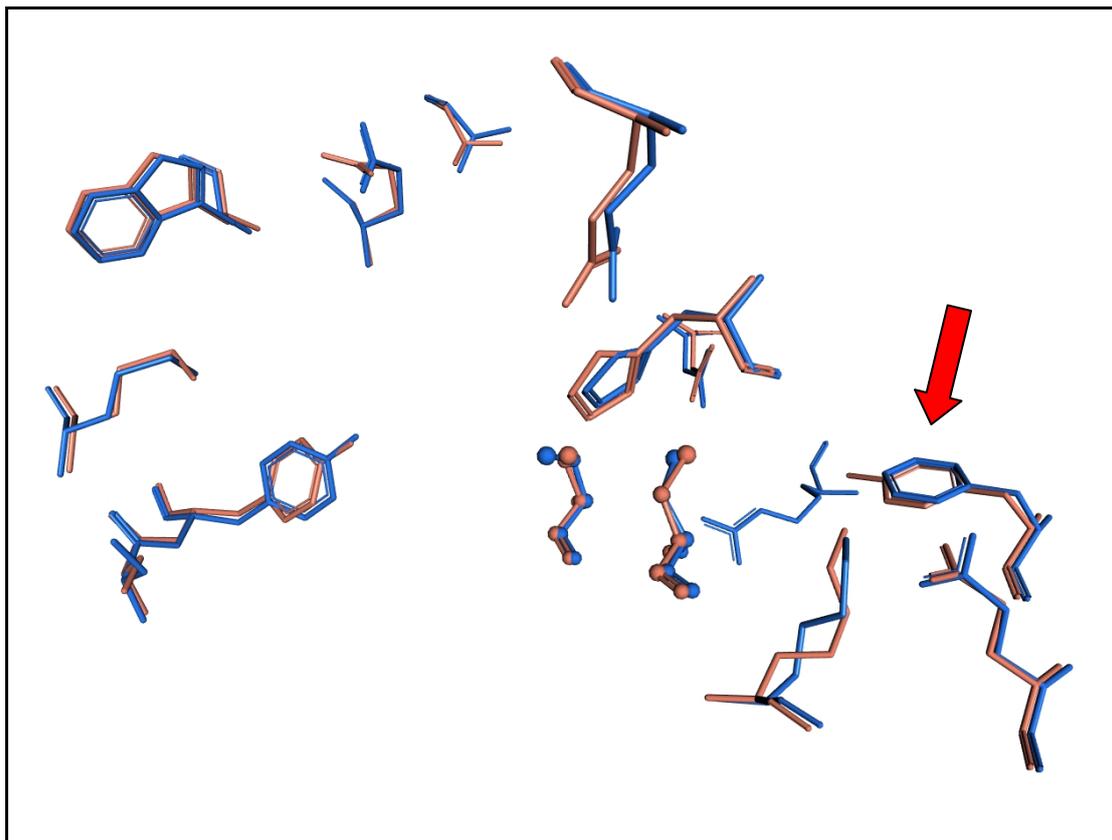


Abbildung 3.22 Aminosäuren im aktiven Zentrum der TR. In dieser Abbildung sind die wichtigsten Aminosäuren dargestellt, welche das aktive Zentrum der beiden Enzyme bilden (Farbgebung wie in Abbildung 3.21). Rechts im Bild erkennt man einen Austausch von Phe198 zu Tyr198 (roter Pfeil) sowie Arg287, welches im Enzym von *L. donovani* fehlt. Die beiden redoxaktiven Cysteine sind in *ball-and-stick*-Darstellung abgebildet.

Der Vergleich der TR von *T. cruzi* und von *L. donovani* zeigt, dass die beiden Enzyme sowohl auf Struktur-, als auch auf Sequenzebene sehr große Ähnlichkeiten aufweisen.

3.3 Liponamid-Dehydrogenase

Das letzte in dieser Arbeit untersuchte Enzym ist die Liponamid-Dehydrogenase (LipDH) von *Trypanosoma cruzi*. Es katalysiert die Oxidation von proteingebundenem Liponamid und ist Bestandteil mehrerer Multienzymkomplexe, wie z. B. des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes. Somit spielt es eine sehr wichtige Rolle im Stoffwechsel. Weiterhin ist die Liponamid-Dehydrogenase am Wirkmechanismus von Nifurtimox beteiligt, welches als subversives Substrat dient. Dieses Medikament wird zur Therapie der

akuten Phase der Chagas-Krankheit eingesetzt [BLUMENSTIEL *et al.*, 1999].

3.3.1 Analyse der Röntgenkristallstrukturen der LipDH

Von dem Enzym Liponamid-Dehydrogenase sind zurzeit 13 Kristallstrukturen öffentlich zugänglich. Außer NAD^+ und FAD sind keine weiteren Moleküle wie z. B. Inhibitoren co-kristallisiert. Neben Strukturen von *Homo sapiens* und *Saccharomyces cerevisiae* sind auch Strukturen von Bakterien in den Proteinstruktur-Datenbank PDB hinterlegt. Die Auflösungen bewegen sich zwischen $2,08\text{\AA}$ ($0,208\text{nm}$) und $8,0\text{\AA}$ ($0,8\text{nm}$). Im Rahmen dieser Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Klebe, Institut für pharmazeutische Chemie der Universität Marburg, eine Kristallstruktur der LipDH von *Trypanosoma cruzi* zur Verfügung gestellt. Diese hat eine Auflösung von $2,0\text{\AA}$ ($0,2\text{nm}$).

Bei der Analyse dieser Struktur zeigte sich, dass auch hier eine Dimer-Kavität zu finden ist. Diese ist, anders als bei der Glutathion- und Trypanothion-Reduktase, jedoch nicht mit den jeweiligen aktiven Zentren, sondern nur mit der Oberfläche des Proteins verbunden. Aufgrund ihrer Größe ist sie jedoch ebenfalls in der Lage, potentielle Inhibitormoleküle aufzunehmen. Eine Betrachtung der chemischen Eigenschaften zeigte, dass die Kavität eher hydrophob ist, während die Kanäle, die zur Oberfläche führen eher hydrophil sind. Die Abbildung 3.23 zeigt die Dimer-Kavität der Liponamid-Dehydrogenase. Zur Orientierung ist die gedockte Konformation eines potentiellen Inhibitormoleküls in der Kavität dargestellt. Eine Untersuchung des elektrostatischen Potentials zeigte, dass die Kavität leicht negativ geladen ist.

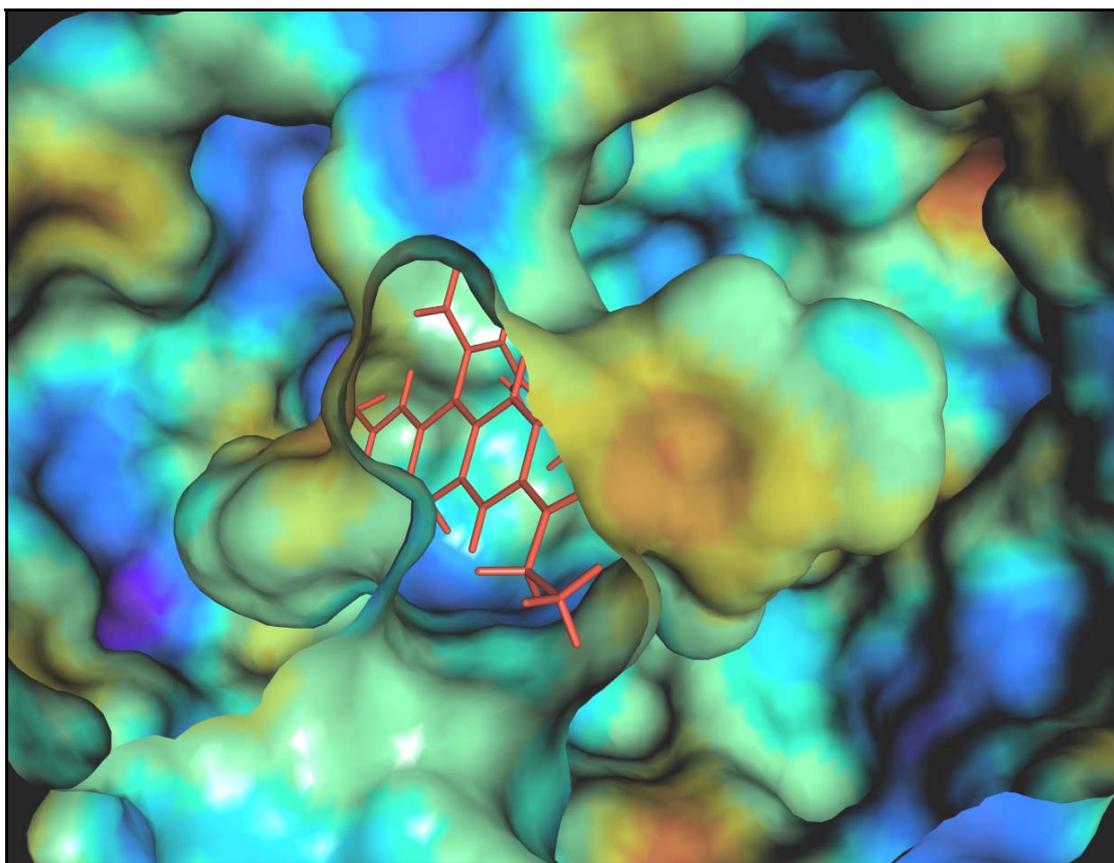


Abbildung 3.23 Dimer-Kavität der Liponamid-Dehydrogenase von *T. cruzi*. Die Kavität ist über zwei Kanäle mit der Oberfläche des Proteins verbunden. In der Kavität befindet sich ein potentieller Inhibitor (gedockte Konformation, rot). Hydrophile Bereiche der Oberfläche sind blau, lipophile Bereiche braun eingefärbt.

3.3.2 Virtuelles Screening

Vor dem eigentlichen *Screening* wurde der inzwischen zur Verfügung stehende *Linux-Cluster* anhand verschiedener *in-house*-Datensätze für das virtuelle Hochdurchsatz-*Screening* validiert und die Parameter des *Docking*-Algorithmus für diese Zwecke optimiert. Die Überprüfung dieser Optimierung erfolgte durch die Bestimmung von RMSD-Werten und mit Hilfe von Anreicherungsraten (siehe 3.1.4 und 3.1.5). Mit diesem validierten und optimierten *Setup* wurde das virtuelle *Screening* zur Identifikation von potentiellen Inhibitoren der Liponamid-Dehydrogenase von *Trypanosoma cruzi* durchgeführt. Hierfür wurde eine virtuelle Substanzbibliothek mit 132532 Substanzen verwendet und mit der *Docking-Software* GOLD unter Verwendung der ChemScore- und GOLDScore-Funktionen in das Protein eingepasst. Da jedoch, abgesehen von Melar-

senoxid, Carmustine und einigen subversiven Substraten, bis heute keine Inhibitoren für dieses Enzym bekannt sind, konnte das *Setup* im Vorfeld nicht speziell auf dieses Zielprotein optimiert werden. Nach dem *Screening* wurden die gedockten Konformationen nach den *Scoring*-Werten sortiert und visuell auf Plausibilität überprüft. Anhand dieser Überprüfung wurde eine Priorisierung und Selektion von 16 Substanzen vorgenommen, welche mittels *in vitro*-Tests auf ihre Fähigkeit getestet werden sollten, die LipDH von *T. cruzi* zu inhibieren. Die Abbildung 3.24 zeigt die gedockte Konformation eines potentiellen Inhibitors.

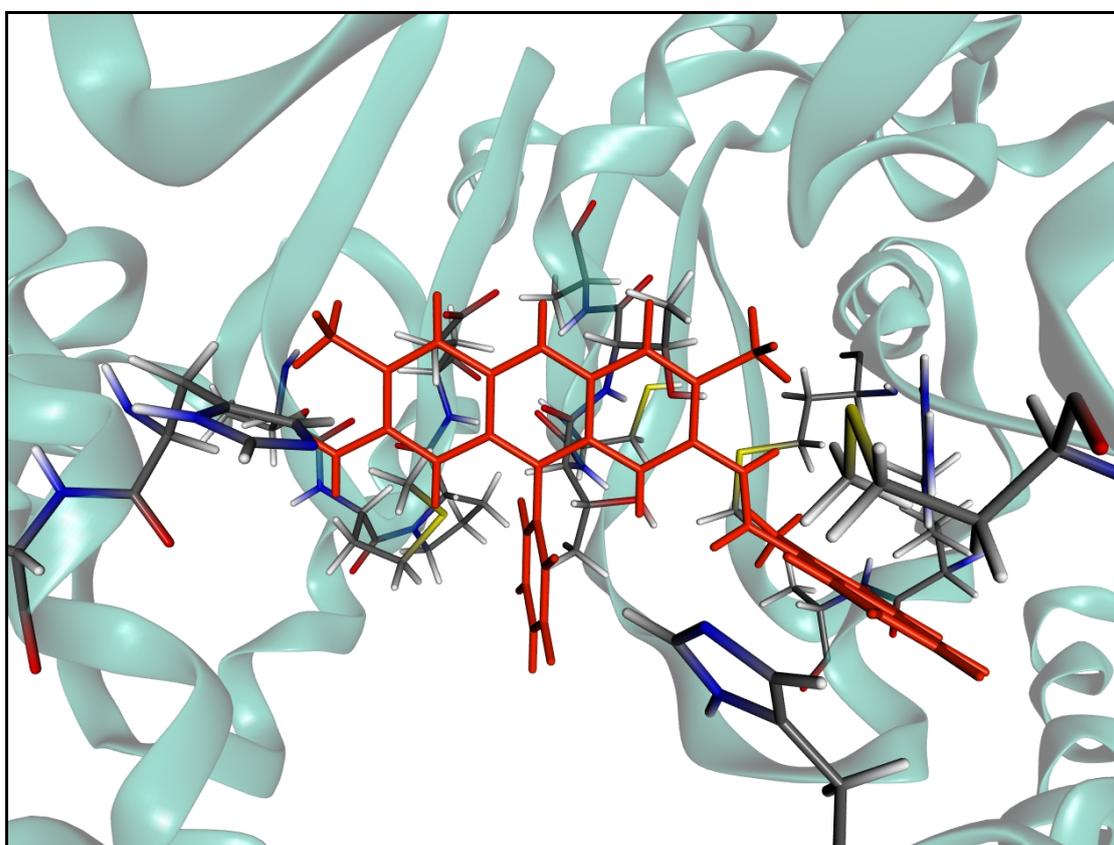


Abbildung 3.24 Gedockte Konformation eines potentiellen Inhibitors in der Dimer-Kavität der LipDH von *T. cruzi*. Die Kavität dieses Enzyms bietet sowohl hydrophobe Interaktionsmöglichkeiten (z. B. Methionine) als auch hydrophile Interaktionspunkte (z. B. Histidine). Von der gedockten Substanz (rot) werden vor allem die hydrophoben Aminosäuren adressiert. Die Sekundärstruktur des Enzyms ist in cyan und ausgewählte Aminosäuren der Dimer-Kavität sind in Atomfarben dargestellt.

3.3.3 *In vitro*-Test der selektierten Substanzen

Nach einer Qualitätskontrolle (siehe 3.1.6) wurden die selektierten Substanzen am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. L. Krauth-Siegel auf Inhibierung der LipDH getestet. Dabei wurde über Detektion der Absorptionsänderung bei 340nm die von der Liponamid-Dehydrogenase katalysierte Reaktion ($\text{NAD}^+ + \text{Dihydroliponamid} \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{Liponamid}$) in Anwesenheit der potentiellen Inhibitoren gemessen. Unter den *Assay*-Bedingungen waren nur 5 der 16 Substanzen löslich. Dies lag sicherlich daran, dass im Vorfeld relativ hydrophobe Substanzen ausgewählt wurden. Von den 5 getesteten Substanzen zeigten 3 eine primäre Aktivität (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 *In vitro*-Tests der primären Aktivität der gefundenen LipDH-Inhibitoren.

Substanz	Inhibierung [%] ($C_{\text{Inhibitor}}$)
12	11% (40 μM)
13	37% (100 μM)
14	9% (100 μM)

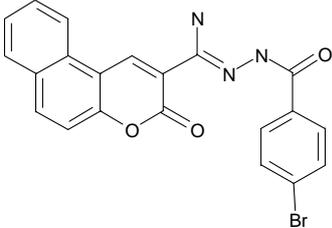
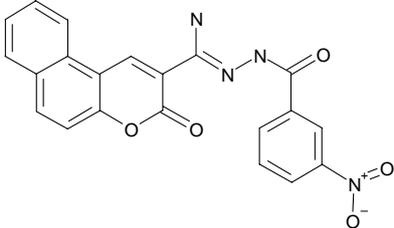
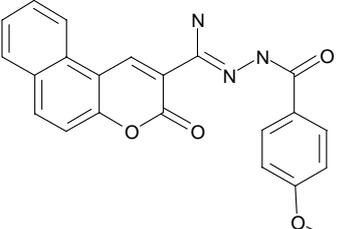
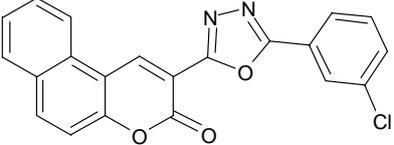
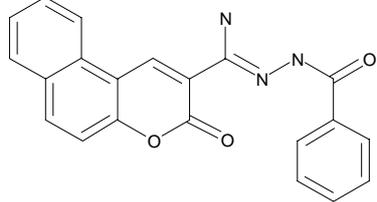
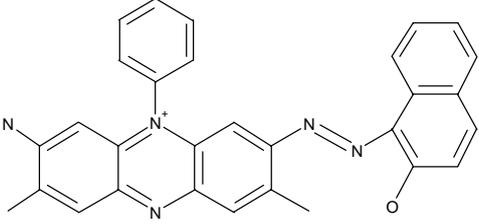
In Anbetracht der Tatsache, dass im Vorfeld keine Optimierung des *Docking*-Algorithmus durchgeführt werden konnte, da keine Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf die LipDH von *T. cruzi* existieren, liefern diese Ergebnisse wertvolle Hinweise für die zukünftige Suche nach potentiellen Inhibitoren.

3.4 Identifizierte Substanzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit verschiedenen *in silico*-Methoden Inhibitoren für die humane Glutathion-Reduktase, die Glutathion-Reduktase von *Plasmodium falciparum*, die Trypanothion-Reduktase und die Liponamid-Dehydrogenase von *Trypanosoma cruzi* identifiziert. Die Tabelle 3.7 gibt eine Übersicht der interessantesten hGR-, pfGR- und LipDH-Inhibitoren sowie deren biologischen Aktivitätä-

ten. In Abbildung 3.19 sind vielversprechende Substanzen gezeigt, die als subversive Substrate der TR identifiziert wurden.

Tabelle 3.7 Interessante Inhibitoren der hGR, pfGR und LipDH.

Nr.	Struktur	Enzym	IC ₅₀ [μM]	Inhibierung [%] (C _{Inh.})
6		hGR pfGR	17 40	-
7		hGR pfGR	60 inaktiv	-
8		hGR pfGR	35 38	-
9		hGR pfGR	14,5 50	-
11		hGR pfGR	23 28	-
13		LipDH	-	37% (100μM)

4 Diskussion

4.1 Glutathion-Reduktase

Die Glutathion-Reduktase ist ein validiertes Zielprotein für die Entwicklung von Antimalaria- und Antikrebs-Medikamenten. In diesem Zusammenhang haben bereits mehrere Forschungsgruppen an diesem Enzym gearbeitet mit dem Ziel, kleine chemische Moleküle zu finden, welche die Aktivität des Proteins inhibieren [SEEFELDT *et al.*, 2005; DEPONTE *et al.*, 2005]. Diese können als Vorstufen zur Entwicklung von Medikamenten dienen. Besonders interessant ist, dass neben der pfGR auch die hGR ein Zielprotein zur Entwicklung von Antimalaria-Medikamenten ist [ZHANG *et al.*, 1988a, b; KRAUTH-SIEGEL & COOMBS, 1999]. Dies liegt daran, dass der *Plasmodium*-Erreger sich während einer Phase seiner Entwicklung in den menschlichen Erythrocyten aufhält und eine Inhibierung der hGR so zu einem erhöhten oxidativen Stress für den Parasiten führt. Die humanen Erythrocyten haben durch eine Inhibierung der hGR eine verringerte Lebensdauer. Da sie jedoch fortwährend nachproduziert werden, stellt dies für den Menschen kein größeres Problem dar [SARMA *et al.*, 2003]. Aufgrund dieser Tatsache scheint es sinnvoll, beide Enzyme, also die hGR und die pfGR, mit einer Substanz gleichzeitig zu inhibieren. Dabei können synergistische Effekte auf die Hemmung des Parasitenwachstums erwartet werden, was u. U. auch zu einer langsameren Resistenzentwicklung bei den Plasmodien führen kann [SCHIRMER *et al.*, 1995; KRAUTH-SIEGEL & COOMBS, 1999].

4.1.1 *In silico*-Analyse der GR

Eine Analyse der GR verschiedener Organismen auf Sequenzebene ergab einen niedrigen bis mittleren Konservierungsgrad (zwischen 27% und 51%). Diese Werte sind jedoch auf die Gesamtsequenzlänge bezogen. Betrachtet man die funktionellen Bereiche des Enzyms oder auch die Dimer-Kavität separat, ist die Konservierung deutlich höher. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Inhibierung beider Enzyme durch einen Inhibitor erreicht werden kann. Dies konnte z. B. bereits für Flavin-Analoga nachgewiesen werden [BECKER *et al.*, 1990].

Für ein virtuelles *Screening* mit dem *Docking*-Ansatz ist es wichtig, eine Auswahl an bekannten Inhibitoren zur Optimierung des Algorithmus zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus benötigt man eine geeignete Proteinstruktur mit hoher Auflösung und niedrigen Temperaturfaktoren. Diese dienen als ein Maß für die Flexibilität der Aminosäureseitenketten [Gao & Peng 1999] und können so, zusammen mit der Auflösung der Struktur, die Genauigkeit des *Docking*-Prozesses sehr stark beeinflussen. Idealerweise existieren von dem zu untersuchenden Zielprotein mehrere Kristallstrukturen mit verschiedenen co-kristallisierten Inhibitoren. Dann ist es möglich, die unterschiedlichen Interaktionen, die das Protein mit verschiedenen Liganden eingehen kann, abzuleiten und diese Informationen für das virtuelle *Screening* zu nutzen. Zudem bewirkt eine Co-Kristallisation eines Inhibitors mit dem Protein, dass die Aminosäuren in der Bindetasche in Konformationen vorliegen, die für die Liganden-Bindung geeignet sind. Dies kann u. U. für ein erfolgreiches virtuelles *Screening* entscheidend sein. Im Falle der hGR existiert leider nur eine einzige Kristallstruktur (PDB-Acc.-Nr.: 1XAN), bei der sich ein Ligand in der Dimer-Kavität des Proteins befindet [SAVVIDES & KARPLUS, 1996]. Wichtige Interaktionen, die aus der Kristallstruktur 1XAN abgeleitet werden konnten, waren Wasserstoffbrückenbindungen zu Asn71/Asn71', His75/His75' und zu Wassermolekülen, sowie π - π -*stacking*-Interaktionen zwischen Phe78/Phe78' und dem Liganden. Die Verwendung der Information über diese Interaktionen bedingt evtl. eine Tendenz der mit dem *Docking* identifizierten Liganden zu ähnlichen Strukturklassen hin, da die Konformationen der Aminosäuren nur die Bindung dieses einen Liganden widerspiegeln.

Über eine Funktion der Dimer-Kavität ist zurzeit nichts bekannt, ebenso wenig über die Wirkungsweise der dort bindenden Inhibitoren [KARPLUS *et al.*, 1989]. Ein struktureller Vergleich des Apoenzyms mit der co-kristallisierten Form zeigte keine nennenswerten Änderungen in der Gesamtstruktur. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von SAVVIDES & KARPLUS, 1996, wo ebenfalls nur sehr leichte Verschiebungen des Proteinrückgrates detektiert werden konnten. Daher kann eine allosterische Inhibierung des Proteins weitgehend ausgeschlossen werden. Eine weitere

Möglichkeit, wonach die Bindung eines Liganden in der Dimer-Kavität den Elektronenfluss vom NADPH über FAD zum Substrat GSSG behindern soll, ist aufgrund der Lage der Kavität ebenfalls unwahrscheinlich. Wie in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, ist die Kavität, neben den Kanälen zu den beiden aktiven Zentren, über zwei weitere Kanäle mit der Oberfläche verbunden [SALMON-CHEMIN *et al.*, 2001]. Ein Inhibierungsmechanismus könnte sein, dass eines der beiden Produkt-Moleküle (GSH) das Protein über das aktive Zentrum verlässt, das andere jedoch über die Kanäle und die Dimer-Kavität. Wenn nun ein Ligand diese Kavität blockiert, kann GSH die GR nicht mehr verlassen und es kommt zu einer Hemmung. Diese Theorie könnte über entsprechende kristallografische Studien überprüft werden, in denen kontrolliert werden kann, ob sich GSH-Moleküle in den Kanälen befinden, welche die aktiven Zentren mit der Dimer-Kavität verbinden.

4.1.2 Pharmakophor-Modelle der GR

Um aus einer großen virtuellen Substanzbibliothek diejenigen Moleküle zu extrahieren, die eine hohe Interaktionswahrscheinlichkeit mit dem Zielprotein aufweisen, wurden anhand von bekannten Inhibitoren der hGR Pharmakophor-Modelle erstellt. Mit diesen Modellen ist es möglich, virtuelle Substanzbibliotheken zu filtern und zielproteinspezifische Auszüge („*focussed libraries*“) aus ihnen zu erstellen [GOTO *et al.*, 2006]. Im Falle der hGR ist es sinnvoll, ligandbasierte Pharmakophor-Modelle zu verwenden, da nur eine einzige Kristallstruktur mit co-kristallisiertem Inhibitor, aber viele diverse Inhibitoren bekannt sind. Diese Modelle können chemische Eigenschaften vieler, strukturell unterschiedlicher Liganden abbilden. Bei der Erstellung der ligandbasierten Modelle wurden neben den hochaktiven auch mittelaktive Substanzen miteinbezogen, um die Diversität der in den Modellen abgebildeten chemischen Eigenschaften zu erhöhen. Um die Trennschärfe der Modelle jedoch nicht negativ zu beeinflussen, wurden die Eigenschaften der mittelaktiven Substanzen schwächer gewichtet. Die bei der Validierung der Modelle berechneten „*best fit*“-Werte zeigten, dass die erstellten Modelle für Inhibitoren der hGR spezifisch sind. Diese erreichten hohe Werte, wohingegen schwachaktive und nichtaktive Substanzen niedrige Werte erzielten. Anhand un-

terschiedlicher Eigenschaften wurden die Modelle in drei Kategorien eingeteilt. Bei der Filterung einer virtuellen Substanzbibliothek lieferten diejenigen Modelle, die u. a. nach allgemeinen hydrophoben Eigenschaften (Kategorie 3) suchten, mehr Treffer als die Modelle, bei denen die hydrophobe Eigenschaft auf aromatische Ringsysteme (Kategorie 1) bzw. aromatische oder aliphatische Gruppen (Kategorie 2) eingeschränkt war. Dies ist zu erwarten, da mit den allgemeinen hydrophoben Eigenschaften natürlich auch aromatische und aliphatische Gruppen erfasst werden. Daraus können, wenn die anderen Eigenschaften der Substanzen ebenfalls gut auf die jeweiligen Modelle passen, Duplikate resultieren. Diese wurden im Anschluss aus dem Datensatz entfernt. Eine Alternative zu den ligandbasierten Modellen sind die protein-ligandbasierten oder proteinbasierten Modelle. Solche Modelle sind jedoch im Fall der GR aufgrund der Datenlage weniger sinnvoll. Protein-ligandbasierte Modelle könnten nur auf Basis einer einzigen Kristallstruktur abgeleitet werden, wodurch evtl. nicht alle potentiell möglichen Interaktionen mit dem Protein erfasst werden. Bei den rein proteinbasierten Modellen dagegen besteht die Gefahr, die relevanten nicht von den irrelevanten Interaktionen unterscheiden zu können.

4.1.3 Validierung der *Docking*-Versuche und virtuelles *Screening* zur Identifizierung von hGR-Inhibitoren

Vor dem eigentlichen virtuellen *Screening* wurde eine Optimierung und Validierung des *Docking-Setups* durchgeführt. Dies ist nötig, um die Parameter des Algorithmus auf die Gegebenheiten der jeweiligen Bindetasche im Protein anzupassen. Aus diesen Gegebenheiten leiten sich bestimmte Interaktionsmöglichkeiten zwischen Protein und Ligand ab, die mit den unterschiedlichen *Scoring*-Funktionen des *Docking*-Programms jeweils besser oder schlechter bewertet werden können [BISSANTZ *et al.*, 2000]. Es muss also diejenige Bewertungsfunktion identifiziert werden, welche für die Bewertung des jeweiligen Bindungsmodus am besten geeignet ist. Dazu bietet sich das *Redocking* an. Dabei wird der kokristallisierte Ligand zuvor aus der Proteinstruktur entfernt und dann mit Hilfe des *Docking*-Programms wieder in selbige eingepasst. Stimmen die native Konformation des Liganden und die gedockte Konformation annä-

hernd überein, kann man davon ausgehen, dass die passende Bewertungsfunktion identifiziert wurde. Bei der hGR war die GOLDScore-Funktion in der Lage, die native Konformation des co-kristallisierten Inhibitors ziemlich genau zu reproduzieren. Dies zeigte sich auch in dem berechneten RMSD-Wert von 0,086 nm (0,86 Å); RMSD-Werte <0,2 nm (2 Å) gelten dabei als sehr gut [FERRARA *et al.*, 2004]. Die ChemScore-Funktion dagegen zeigte bei diesem Liganden deutlich schlechtere Ergebnisse. Dies kann daran liegen, dass bei dem Bindungsmodus dieser Substanz polare und hydrophile Wechselwirkungen eine größere Rolle spielen, als unpolare und hydrophobe Interaktionen. Erstere können mit der GOLDScore-Funktion besser adressiert werden, letztere mit der ChemScore-Funktion [WANG *et al.*, 2004]. Bei weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass auch mit der ChemScore-Funktion bei vielen Liganden plausible Ergebnisse erzielt werden konnten, was dadurch erklärbar ist, dass bei diesen Substanzen die hydrophoben Wechselwirkungen einen größeren Anteil an der Bindung zum Protein hatten.

Soll ein virtuelles *Screening* durchgeführt werden, ist es weiterhin von entscheidender Bedeutung, die Geschwindigkeitsparameter des Algorithmus zu optimieren. Dabei muss sichergestellt werden, dass trotz Steigerung der Geschwindigkeit noch akkurate Ergebnisse produziert werden. Dazu wurden die Platzierungen hochaktiver und schwächer aktiver Substanzen bei verschiedenen Geschwindigkeitseinstellungen überprüft und miteinander korreliert. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß, dass bei der schnellsten Einstellung deutliche Abweichungen zu der langsamsten Einstellung, welche jedoch die exaktesten Ergebnisse liefert, auftraten. Die mittlere Geschwindigkeitseinstellung erwies sich als ein guter Kompromiss zwischen Zeitaufwand und Genauigkeit der Ergebnisse. Bei diesen Experimenten zeichnete sich bereits ab, dass die ChemScore-Funktion etwas bessere Anreicherungsraten von bekannten aktiven Substanzen lieferte als die GOLDScore-Funktion. Dies konnte bei dem virtuellen *Screening* der 5450 Substanzen bestätigt werden. Nachdem die gedockten Substanzen nach den erzielten *Scoring*-Werten sortiert wurden, konnten in den oberen 10% des Datensatzes ca. 76% und in den oberen 20% sogar ca. 88% der bekannten hochaktiven Substanzen wieder gefunden werden.

Dies zeigt, dass das *Docking*-Programm, nach einer entsprechenden Optimierung, in der Lage ist, sehr hohe Anreicherungen zu erzielen und somit aktive von nicht aktiven Substanzen zu trennen.

4.1.4 *In vitro*-Test der identifizierten Substanzen

Auf Basis des erfolgreichen virtuellen *Screenings* wurden 40 Substanzen selektiert und am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. H. Schirmer) auf ihre biologische Wirksamkeit überprüft. Dabei zeigten mehrere Substanzen eine Inhibition der hGR. 5 Substanzen wiesen sogar einen IC_{50} -Wert $<40\mu\text{M}$ auf. Innerhalb dieser Substanzen konnten z. B. Benzocumarine, Benzothiazole und Dibenzazepine als neue Strukturklassen mit inhibitorischer Wirkung auf die hGR identifiziert werden. Hierbei war auffällig, dass die Substanzen, trotz ihrer strukturellen Diversität, immer ein aromatisches Ringsystem aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass die π - π -*stacking*-Interaktionen zwischen Phe78/Phe78' und dem Liganden eine sehr wichtige Rolle spielen, wie auch schon SARMA *et al.*, 2003 postulierten. Insgesamt belegen die Ergebnisse der *in vitro*-Tests sehr schön, dass es mit *in silico*-Methoden möglich ist, neuartige chemische Substanzen zu finden, die als Vorstufen zur Medikamentenentwicklung dienen können.

4.1.5 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Zur Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurde nach weiteren Substanzen mit potentiell inhibitorischer Wirkung auf die hGR gesucht. Dazu wurden sowohl Ähnlichkeits- als auch Substruktursuchen auf Basis der aktivsten Substanz (IC_{50} -Wert: $16\mu\text{M}$) aus den in 4.1.4 beschriebenen Experimenten durchgeführt. Die so bestimmten Substanzen wurden ebenfalls mittels *in vitro*-Tests und *Docking*-Versuchen untersucht. Dabei zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen den aus den gedockten Konformationen ableitbaren Interaktionen und der tatsächlichen biologischen Aktivität der Substanzen. Letztere konnte zum großen Teil sogar mit den erzielten *Scoring*-Werten korreliert werden, was dafür spricht, dass das *Docking-Setup* sehr gut für die untersuchte Bindetasche optimiert ist. So kann z. B. Substanz 6 zwei Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren des Proteins ausbilden und π - π -*stacking*-Interaktionen eingehen.

Dies resultiert in einer hohen Aktivität (IC_{50} -Wert: $17\mu\text{M}$) und in hohen *Scoring*-Werten (GOLDScore: 51,17 und ChemScore: 25,12). In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass ChemScore-Werte immer niedriger sind als GOLDScore-Werte. Substanz 7 dagegen kann keine ausgeprägten Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen und erreicht nur einen IC_{50} -Wert von $60\mu\text{M}$. Wahrscheinlich ist die polare Nitrogruppe, welche für eine Umorientierung des Moleküls in der Bindetasche sorgt, für die ungünstige Position des Moleküls verantwortlich. Dies wird von beiden *Scoring*-Funktionen erfasst und resultiert in niedrigeren Werten (GOLDScore: 37,52 und ChemScore: 23,11). Die Suche nach ähnlichen Substanzen führte auch zu einer Variation in der Strukturklasse: Bei Substanz 9 ist der Phenylring anstatt über ein Amidhydrazon über ein Oxadiazol mit dem aromatischen Ringsystem verbunden. Diese Substanz nimmt ebenso eine für Interaktionen mit dem Protein sehr günstige Position ein: Neben Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen kann sie ebenfalls hydrophobe Wechselwirkungen in Form von π - π -*stacking*-Interaktionen mit dem Protein eingehen. Dadurch erreicht die Substanz einen IC_{50} -Wert von $14,5\mu\text{M}$ und ebenfalls sehr hohe *Scoring*-Werte (GOLDScore: 70,48 und ChemScore: 30,29). Darüber hinaus ist die Substanz chemisch stabiler als die Derivate, die das Amidhydrazon als *Linker* besitzen [KOVALENKO *et al.*, 2000]. Je mehr mögliche Interaktionspunkte adressiert wurden, desto höher war bei den untersuchten Substanzen die Aktivität. Dabei scheinen halogene Substituenten am Phenylring günstiger für eine hohe Aktivität zu sein, als polare Substituenten.

Insgesamt bewegten sich die Aktivitäten der mit den Ähnlichkeits- und Substruktursuchen bestimmten Moleküle im selben Bereich wie die der mit *Docking*-Methoden gefundenen Substanzen. Bessere Aktivitäten können wahrscheinlich erzielt werden, wenn alle relevanten Interaktionsmöglichkeiten, welche die Dimer-Kavität bietet, durch einen Inhibitor adressiert werden, so auch die Wasserstoffbrückenbindungen zu His75 und His75' [SAVVIDES & KARPLUS, 1996]. Dies war bei dieser Substanzklasse nicht der Fall, wie eine Analyse der gedockten Konformationen zeigte.

Eine Möglichkeit dies zu erreichen, ist das manuelle Editieren von Pharmakophor-Modellen, bei dem Eigenschaften hinzugefügt, weggenommen

oder räumlich anders angeordnet werden können. So könnte auch die neu identifizierte Wasserstoffbrückenbindung zu Tyr407 (siehe 3.1.7) in die Modelle miteinbezogen werden. Ferner besteht die Möglichkeit, die Eigenschaften verschiedener Pharmakophor-Modelle in einem neuen Modell zu vereinigen. Eine weitere Möglichkeit, möglichst viele relevante Interaktionsmöglichkeiten zu adressieren, ist das *de novo-Design*. Bei dieser Methode werden verschiedene funktionelle Gruppen („*building blocks*“) über diverse *Linker*-Fragmente miteinander verbunden [SCHNEIDER *et al.*, 2000; BÖHM *et al.*, 2002]. Durch Austausch der funktionellen Gruppen können diejenigen identifiziert werden, welche die höchste Affinität zu dem Interaktionspartner im Protein aufweisen. Durch Selektion verschiedener *Linker* kann schließlich die für die Interaktion mit dem Protein optimale Abstandsbeziehung zwischen den funktionellen Gruppen ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode, die nicht von bekannten Inhibitoren ausgeht, ist die Möglichkeit, schnell viele strukturell diverse Substanzen zu finden, die eine große Wahrscheinlichkeit haben, mit dem Zielprotein zu interagieren. Da im Falle der hGR nun viele Interaktionspunkte in der Dimer-Kavität bekannt sind, dürfte ein gezieltes *de novo-Design* von Inhibitoren zu einer Aktivitätssteigerung derselben führen.

4.1.6 Inhibierung der pfGR durch hGR-Inhibitoren

Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten zwischen der Dimer-Kavität der hGR und der pfGR ist es möglich, Inhibitoren zu finden, die beide Enzyme hemmen. Um neben den bereits bekannten Flavin-Analoga [BECKER *et al.*, 1990] weitere Strukturen mit diesem Potential zu identifizieren, wurden die Substanzen, die mit den Ähnlichkeits- und Substruktursuchen gefunden wurden, auch auf Inhibierung der pfGR getestet und mit *Docking*-Experimenten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die meisten der untersuchten Substanzen auch die pfGR hemmten. Die erzielten Aktivitätswerte lagen dabei jedoch etwas unter den Werten für die hGR. Dies war zu erwarten, da die Kavitäten trotz ihrer Ähnlichkeiten auch einige Unterschiede aufweisen [SARMA *et al.*, 2003] und die Inhibitoren durch den Pharmakophor-*Screening*- und *Docking*-Prozess für eine Inhibierung der hGR selektiert worden waren. Neben der unterschiedlichen Geometrie der beiden Kavitäten ist vermutlich das Fehlen der beiden Phe-Reste bei

der pfGR ein entscheidender Unterschied. Dadurch können keine π - π -*stacking*-Interaktionen zwischen Ligand und Protein stattfinden. Diese Interaktionen haben jedoch einen sehr großen Anteil an dem Bindungsmechanismus der hGR-Inhibitoren. Eine Korrelation der Aktivitäten auf beiden Enzymen mit den Strukturen zeigt, dass halogene Substitutionen am Phenylring die pfGR schlechter hemmen als die hGR. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Halogene, bedingt durch ihren Platzbedarf, die Substanzen zu einer Konformation zwingen, die für weitere Interaktionen mit dem Protein eher ungünstig ist. Dieses Ergebnis stimmt mit Erkenntnissen von SARMA *et al.*, 2003 überein, wo ein Arylisoalloxazin-Derivat mit einer Trifluormethyl-Gruppe zu den schlechtesten Inhibitoren der pfGR gehörte (K_i -Wert: $>1000\mu\text{M}$), die hGR dagegen gut hemmte (K_i -Wert: $9,3\mu\text{M}$). Unpolare Substitutionen am Phenylring führen zu ähnlichen Aktivitäten bei pfGR und hGR. Sind die Substituenten jedoch polar, wird bei beiden Enzymen eine schlechte bzw. keine Inhibierung erzielt. Ähnliches konnte ebenfalls von SARMA *et al.*, 2003 für positive Ladungen der Substituenten beobachtet werden. Wie bei der hGR konnten auch bei der pfGR die gedockten Konformationen plausible Erklärungen für die gemessenen Aktivitäten liefern. Erwartungsgemäß war bei den *Docking*-Ergebnissen der pfGR jedoch keine gute Korrelation zwischen *Scoring*-Werten und Aktivitäten zu erkennen, was dadurch erklärbar ist, dass das *Docking-Setup* auf die Verhältnisse in der Dimerkavität der hGR optimiert worden war. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass es aufgrund der Unterschiede in den Kavitäten beider Enzyme relativ schwer ist, Inhibitoren zu finden, welche die hGR und die pfGR gleichzeitig mit hoher Aktivität hemmen. Da jedoch aus der Hemmung beider Enzyme eine synergistische Wirkung auf den Parasiten resultieren kann, ist dies u. U. nicht nötig. Um dennoch eine starke Inhibition beider Enzyme zu erreichen, könnten Kombinationspräparate, welche jeweils einen hochaktiven Inhibitor der hGR und der pfGR beinhalten, verwendet werden. Weiterhin ist es möglich, Substanzen zu finden, welche das aktive Zentrum der GR adressieren. Auf Sequenzebene ist dieser Bereich zwischen der hGR und der pfGR identisch, was darauf schließen lässt, dass hier der Bindungsmodus von potentiellen Inhibitoren sehr ähnlich ist

und mit einer Substanz eine starke Inhibierung beider Zielproteine erreicht werden kann. Dabei ist jedoch zu beachten, dass alle derzeit bekannten Inhibitoren kovalent in das aktive Zentrum binden und ggf. aufgrund ihrer Reaktivität noch weitere Enzyme inhibieren und so unerwünschte Nebenwirkungen verursachen können [FUKUSHIMA *et al.*, 1990].

Neben den Inhibitoren, welche das aktive Zentrum oder die Dimer-Kavität adressieren und den subversiven Substraten, gibt es noch eine weitere Möglichkeit die pfGR und hGR zu hemmen und zwar mit Hilfe von Dimerisierungsinhibitoren [NORDHOFF *et al.*, 1997]. Diese synthetischen Peptide blockieren die Dimerisierung und Faltung der GR. Aufgrund der Tatsache, dass sich die beiden aktiven Zentren der GR aus Resten beider Untereinheiten zusammensetzen, zeigen GR-Monomere keine katalytische Aktivität und werden sehr schnell proteolytisch abgebaut. Bedingt durch die Sequenzähnlichkeit zwischen beiden Enzymen ist es möglich, Peptide zu synthetisieren, die sowohl die Faltung und Dimerisierung der hGR als auch der pfGR inhibieren können [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2005]. Der stärkste Inhibitor beider Enzyme, ein Peptid aus 16 Aminosäuren, erreicht dabei einen IC₅₀-Wert von 100nm. Da Peptide einer sehr schnellen proteolytischen Degradation unterliegen, eignen sich diese nicht sehr gut als Medikamente [DE BONT *et al.*, 1999]. Insofern wäre es ideal, wenn man die Wirkung dieser Peptide durch kleine chemische Moleküle nachbilden könnte. Derartige Substanzen bezeichnet man auch als Peptidomimetika. Solche Ansätze wurden bereits erfolgreich für Blocker von spannungsabhängigen Calciumkanälen durchgeführt [TEDFORD *et al.*, 2004]. Um Peptidomimetika zu finden, welche die gleichen Eigenschaften wie die bioaktiven Peptide aufweisen, können beispielsweise *in silico*-Methoden wie Pharmakophor-Suchen verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit, die GR-Aktivität vorübergehend zu senken, ist die therapeutische RNAi (RNA *interference*) [BAIGUDE *et al.*, 2007]. Dabei bewirken kleine RNA-Fragmente (siRNA, *small interfering RNA*) die Degradation der mRNA und verhindern so die Translation des Zielproteins [HUTVAGNER & ZAMORE, 2002]. Eine vollständige Inhibierung der Translation wird jedoch meist nicht erreicht, was im Falle der hGR auch

sinnvoll erscheint. Je nach Sequenzähnlichkeit zum jeweiligen Zielprotein wäre es durch die Auswahl der RNA-Fragmente sogar denkbar, entweder die Translation von hGR und pfGR oder die Translation der pfGR alleine zu inhibieren.

4.2 Trypanothion-Reduktase

Auch die Trypanothion-Reduktase ist ein validiertes Zielprotein zur Entwicklung von Medikamenten. Wie die Glutathion-Reduktase bei dem Malariaerreger ist dieses Enzym von sehr großer Bedeutung für die Trypanosomatiden [JOCKERS-SCHERUBL *et al.*, 1989]. Die Tatsache, dass das Enzym in den Wirtsorganismen dieser Parasiten nicht vorkommt, macht es als Zielprotein sehr attraktiv, da somit eine Entwicklung speziesspezifischer Inhibitoren deutlich einfacher und das Risiko von Nebenwirkungen für den Wirtsorganismus geringer ist [KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 2003].

4.2.1 Identifizierung von TR-Inhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentielle subversive Substrate für die TR von *T. cruzi* identifiziert. Diese Substanzen werden von der TR in einem Einelektronenschritt reduziert und sorgen im weiteren Verlauf durch Superoxidradikalbildung für eine Erhöhung des oxidativen Stresses. Dabei werden sie reoxidiert und stehen wieder für eine erneute Reaktion zur Verfügung. Zusätzlich wird Trypanothion, das eigentliche Substrat, nicht mehr oder nur noch eingeschränkt reduziert. Leider ist für die subversiven Substrate weder die Bindestelle, noch der Bindungsmodus bekannt. Es ist denkbar, dass sie sowohl im aktiven Zentrum, als auch in der Dimerkavität binden [VEGA-TEIJIDO *et al.*, 2006; CENAS *et al.*, 1994]. Aus diesem Grund ist es nicht sinnvoll, Methoden wie *Docking* oder Pharmakophor-Suchen zur Identifizierung solcher Moleküle zu verwenden, da bei diesen Verfahren die Bindetasche bekannt sein muss bzw. die Substanzen die selbe Bindetasche adressieren müssen. Stattdessen wurden in dieser Arbeit Ähnlichkeits- und Substruktursuchen auf Basis der als subversive Substrate bekannten Nitrofurane und Chinone verwendet [SALMON-CHEMIN *et al.*, 2001; BLUMENSTIEL *et al.*, 1999]. Bei der Analyse dieser Strukturen fiel auf, dass neben einer reduzierbaren Gruppe auch

immer hydrophobe Komponenten vorhanden sind. Deswegen wurde versucht, diese Komponenten bei den Ähnlichkeits- und Substruktursuchen beizubehalten. Eine Klasse von subversiven Substraten, die Nitrofurane, ist aufgrund ihres mutagenen und karzinogenen Potentials in Verruf geraten und wird nur noch selten als Bestandteil von Medikamenten verwendet. In Medikamenten, die zur Behandlung Lebensmittel liefernder Tiere verwendet werden, sind Nitrofurane mittlerweile sogar verboten [http://www.bfr.bund.de/cm/208/nitrofurane_in_lebensmitteln.pdf]. Um die Verwendung dieser Substanzklasse zu umgehen und dabei aber trotzdem den „subversiven Charakter“ beizubehalten, wurden innerhalb der vorliegenden Analysen Nitroimidazole und Nitrothiophene als bioisostere Substanzen identifiziert. Diese Substanzen besitzen das Potential als subversive Substrate zu fungieren, jedoch gibt es vereinzelt Hinweise, dass die Nitroimidazole nicht oder nur abgeschwächt eine subversive Wirkung zeigen. Sie scheinen stattdessen in erster Linie die mitochondrialen Respirationsprozesse zu inhibieren und für eine Verarmung an Trypanothion zu sorgen [MAYA *et al.*, 2003]. Dadurch wird der Thiolstoffwechsel des Parasiten gestört. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 25 potentielle subversive Substrate der TR identifiziert. Um die biologische Aktivität dieser Substanzen zu überprüfen, müssen diese mittels *in vitro*-Methoden getestet werden. Entsprechende Modelle stehen am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. L. Krauth-Siegel) zur Verfügung.

In diversen Arbeiten wurde gezeigt, dass Inhibitoren, die gegen Trypanosomen entwickelt wurden, auch die sehr nah verwandten Leishmanien hemmen können [LUQUE *et al.*, 2000; STEPHENS *et al.*, 2003]. Um diesen Sachverhalt speziell für die Trypanothion-Reduktase zu überprüfen, wurden die TR von *T. cruzi* und das Enzym von *L. donovani* in einer bioinformatischen Analyse verglichen und im Anschluss ein Homologie-Modell des Leishmanien-Enzyms erstellt. Dabei zeigte sich, dass beide Enzyme auch strukturell einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen. Durch eine Analyse der beiden Ligandbindestellen konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäuren der Dimer-Kavität bis auf einen Austausch identisch und räumlich fast deckungsgleich angeordnet sind.

Ähnliches gilt für die Aminosäuren des aktiven Zentrums. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die meisten Inhibitoren, die gegen die TR von *T. cruzi* entwickelt werden, auch die TR von *L. donovani* hemmen können. Diese Theorie kann durch *in vitro*-Tests überprüft werden. So könnte beispielsweise der co-kristallisierte Inhibitor QUM (*Quinacrine Mustard*; N,N-bis(2-chloroethyl)-N'-(6-chloro-2-methoxyacridin-9-yl)pentan-1,4-diamin) aus der PDB-Struktur 1GXF (TR von *T. cruzi*) [SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004] auf Inhibierung des Leishmanien-Enzyms getestet werden. Dieser Ligand adressiert das aktive Zentrum der TR. Aufgrund der räumlichen Ausdehnung dieser Bindetasche und den gegebenen Interaktionsmöglichkeiten binden zwei Inhibitor-Moleküle je Monomer. Der K_i -Wert dieses Inhibitors liegt mit $41\mu\text{M}$ eher im mittleren Bereich. Ein entsprechendes Modell für einen *in vitro*-Test steht momentan leider noch nicht zur Verfügung.

4.3 Liponamid-Dehydrogenase

Ein weiteres Zielprotein zur Entwicklung von Antitrypanosomiasis-Medikamenten ist die Liponamid-Dehydrogenase [KRAUTH-SIEGEL & SCHONECK, 1995]. Als Bestandteil mehrerer Multienzymkomplexe spielt es eine sehr wichtige Rolle im Stoffwechsel und ist am Wirkmechanismus von Nifurtimox beteiligt, einem Medikament zur Therapie der akuten Phase der Chagas-Krankheit. Wie die Trypanothion-Reduktase und Glutathion-Reduktase besitzt auch dieses Enzym eine Dimer-Kavität, welche in der Lage ist, potentielle Inhibitoren aufzunehmen. Diese Kavität ist jedoch, im Gegensatz zu den anderen beiden hier untersuchten Zielproteinen, nicht mit den aktiven Zentren des Enzyms verbunden, sondern nur mit der Oberfläche. Da für die LipDH bis auf Carmustine, Melarsenoxid und einige subversive Substrate bis heute keine Inhibitoren bekannt sind [BLUMENSTIEL *et al.*, 1999; SALMON-CHEMIN *et al.*, 2001; KRAUTH-SIEGEL & SCHONECK, 1995], wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, erste Substanzen mit inhibitorischem Potential zu identifizieren.

4.3.1 Virtuelles Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung von LipDH-Inhibitoren

Um ein virtuelles Hochdurchsatz-Screening mit dem Linux-Cluster durchführen zu können, musste die *Hardware* zuerst für diesen Zweck validiert werden. Dies war nötig, da das *Docking*-Programm bis zu diesem Zeitpunkt unter dem IRIX-Betriebssystem auf SGI-*Hardware* verwendet wurde und ein Wechsel auf das Linux-Cluster durchaus Einfluss auf die *Docking*-Ergebnisse haben kann. Die Validierung wurde anhand verschiedener *in-house*-Datensätze durchgeführt. Dabei wurde auch die optimale Geschwindigkeitseinstellung für ein Hochdurchsatz-Screening ermittelt. Nach der Optimierung konnten mit Hilfe des Linux-Clusters durch die massive Parallelisierung in sehr viel kürzeren Zeiträumen (ca. Faktor 85) Ergebnisse erzielt werden, die qualitativ mit den Ergebnissen vergleichbar waren, die auf der zur Verfügung stehenden SGI-Umgebung erreicht wurden. Der Vergleich der *Docking*-Lösungen erfolgte über die Bestimmung von RMSD-Werten. Die Abweichung zwischen den Ergebnissen, die auf der SGI-*Hardware* und dem Linux-Cluster erzielt wurden, lag dabei unter 1 Å (0,1nm). Leider konnte im Falle der LipDH keine für das Zielprotein spezifische Optimierung des *Docking*-Algorithmus durchgeführt werden, da nur zwei Substanzen mit inhibitorischer Wirkung bekannt sind und keine Kristallstruktur mit co-kristallisiertem Inhibitor zur Verfügung steht. So konnte z. B. keine passende Bewertungsfunktion ausgewählt werden, die zum einen für eine Anreicherung von bekannten aktiven Substanzen und zum anderen für eine korrekte Platzierung der Substanzen in der Bindetasche sorgen würde, da die dafür nötigen Daten nicht verfügbar sind. Mit dem für das Hochdurchsatz-Screening optimierten *Setup* wurden *in silico* 132532 Substanzen auf eine Interaktion mit der LipDH untersucht und 16 Strukturen für einen *in vitro*-Test selektiert. Diese Tests wurden am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. L. Krauth-Siegel) durchgeführt. Unter den *Assay*-Bedingungen waren jedoch, aufgrund ihres hydrophoben Charakters, nur 5 Substanzen löslich. In den *in vitro*-Tests wiesen drei der 5 löslichen Strukturen eine biologische Aktivität auf. Eine Analyse der gedockten Konformationen zeigte, dass von den ausgewähl-

ten Substanzen vor allem die hydrophoben Aminosäuren der Bindetasche adressiert werden. Diese bietet jedoch auch viele hydrophile Interaktionsmöglichkeiten. Das lässt darauf schließen, dass mit Substanzen, die beide Interaktionstypen adressieren, evtl. höhere Aktivitäten erzielt werden können. Um solche Substanzen zu finden, könnten anhand der oben erwähnten Strukturen Pharmakophor-Modelle erstellt werden und diese manuell um hydrophile Eigenschaften erweitert werden. Darüber hinaus wären auch Ähnlichkeits- und Substruktursuchen auf Basis dieser Substanzen denkbar. Somit liefern diese Experimente erste wertvolle Hinweise für die weitere Suche nach Inhibitoren der LipDH von *T. cruzi*.

4.4 Ausblick

Die hier durchgeführte bio- und chemoinformatische Charakterisierung der GR liefert wertvolle Informationen für die zukünftige Identifizierung von Leitstrukturen, die noch bessere Inhibitionswerte aufweisen und das Potential besitzen, das Enzym des Wirtes und das Pendant im Parasiten parallel zu inhibieren. Gleichzeitig geben die Analysen Anhaltspunkte, welche zur Entwicklung spezie-spezifischer Inhibitoren genutzt werden können. Aufgrund der detaillierten Kenntnisse der Bindetaschen beider Enzyme sollte es möglich sein, Substanzen zu identifizieren, welche die pfGR stärker hemmen als die hGR. Dies wäre eine Möglichkeit, die Nebenwirkungen für den Wirt zu verringern und trotzdem eine synergistische Wirkung auf den Parasiten zu erzielen. Aufgrund der Tatsache, dass intrazelluläres GSSG, neben der enzymatischen Reduktion durch die GR, auch nichtenzymatisch durch Thioredoxin reduziert werden kann [KANZOK *et al.*, 2000], wäre auch die gleichzeitige Inhibierung der pfGR und der Thioredoxin-Reduktase des Parasiten (pfTrxR) eine attraktive Therapiemöglichkeit. Dadurch wäre ebenfalls eine synergistische Wirkung zu erwarten. Zudem sollte überprüft werden, ob in der GR noch weitere potentielle Ligandenbindungsstellen existieren, die bisher noch nicht adressiert wurden. Eine Detektion solcher Bindestellen wäre mit entsprechenden Programmen wie z. B. SiteID [<http://www.tripos.com>] durchführbar. Um die in dieser Arbeit erstellten *in silico*-Vorhersagen über Bindungsmodi zu bestätigen, sind *in vitro*-Experimente wie Röntgenstruktur-

Aufklärungen notwendig. Erste *Soaking*- und Strukturaufklärungsversuche der hGR mit einem hier identifizierten Inhibitor (Substanz 5) werden derzeit in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für medizinische Forschung (Heidelberg) und dem Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg durchgeführt. Diese Ergebnisse werden wertvolle Hinweise für die weitere experimentelle Vorgehensweise liefern. Neben den *in vitro*-Aktivitätsdaten, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, ist es sinnvoll, die Aktivität der hier gefundenen Inhibitoren im Zielorganismus zu überprüfen. Dazu müssen *in vivo*-Tests mit *P. falciparum* sowie humanen Zellen durchgeführt werden. Ein weiteres zweckmäßiges Anschlussexperiment wäre der Test der Inhibitoren auf humanen Krebszelllinien. Im Erfolgsfall könnten die Substanzen als Vorstufen für Antikrebs-Medikamente validiert werden. Da für *in vivo*-Versuche höhere Hürden als für *in vitro*-Tests zu überwinden sind (z. B. Membrangängigkeit der Substanzen), könnten diese zuerst durch *in silico*-Vorhersagen priorisiert werden. Beispielsweise könnten ADMET-Parameter bestimmt werden, womit Aussagen über die Bioverfügbarkeit und Toxizität möglich sind [NORINDER & BERGSTROM, 2006].

Ähnlich wie bei der GR, müssen auch bei der TR die subversiven Substrate, nach entsprechenden *in vitro*-Untersuchungen, mittels *in vivo*-Tests auf Aktivität im Zielorganismus getestet werden. Daraus ließen sich Informationen ableiten, die wiederum für eine *in silico*-Identifizierung von potentiell aktiveren Substanzen verwendet werden könnten. Eine Identifikation von Inhibitoren, die in das aktive Zentrum der TR binden, ist mit rein proteinstrukturbasierten Methoden aufgrund der räumlichen Ausdehnung dieser Bindetasche eher schwierig. In dieser existieren zahlreiche Interaktionsmöglichkeiten und die Liganden können viele verschiedene Bindungsmodi einnehmen. Dies zeigt auch die Kristallstruktur 1GXF, in der zwei Inhibitormoleküle in unterschiedlicher Orientierung im aktiven Zentrum liegen. Um dieses Problem zu adressieren, könnte aus den Interaktionen der beiden Inhibitormoleküle mit dem Protein ein gemeinsames Pharmakophor-Modell erstellt werden. Erste Experimente hierzu wurden bereits durchgeführt. Wenn ein *in vitro*-Modell für die TR von *L. donovani* zur Verfügung steht, würde ein Test von Inhibitoren der TR von *T.*

cruzi auf dieses Enzym eine Validierung des in dieser Arbeit erstellten Homologie-Modells ermöglichen. Aus den leichten Unterschieden zwischen den beiden Enzymen und den evtl. daraus resultierenden Aktivitätsunterschieden lassen sich u. U. Hinweise auf den Bindungsmodus von Liganden ableiten.

Auch die Substanzen, die eine Inhibierung der LipDH zeigten, können als Ausgangsstrukturen für die Suche nach weiteren Inhibitoren verwendet werden. Dabei sollten jedoch auch die hydrophilen Interaktionsmöglichkeiten der Bindetasche adressiert werden. Darüber hinaus wäre es denkbar, mit Hochdurchsatz-Methoden eine bessere Datenlage zu schaffen, die eine Optimierung des *Docking-Setups* ermöglichen würde. Dann könnte mit den hier verwendeten *in silico*-Methoden versucht werden, Liganden zu identifizieren, die eine mit den hGR-Inhibitoren vergleichbare Aktivität aufweisen.

5 Zusammenfassung

Die Methoden der Bio- und der Chemoinformatik sind heutzutage aus der modernen Wirkstoffforschung nicht mehr wegzudenken. Dies belegen zahlreiche Erfolgsbeispiele wie Gleevec® oder Tamiflu®, bei deren Entwicklung solche *in silico*-Methoden maßgeblich beteiligt waren. Da die dabei durchgeführten Berechnungen sehr ressourcenintensiv sind, werden leistungsfähige Computer benötigt. Neben den *Grid-Computing*-Systemen bieten *Linux-Cluster* eine probate Möglichkeit, die benötigten Ressourcen zur Verfügung zu stellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine *Linux-Cluster*-Umgebung für virtuelles Hochdurchsatz-*Screening* validiert und das *Setup* optimiert. Mit diesem System konnten im Anschluss sowohl Literaturdaten reproduziert, als auch neue bioaktive Inhibitoren identifiziert werden. Darüber hinaus konnte eine bemerkenswerte Geschwindigkeitssteigerung bei gleicher Qualität der Ergebnisse gegenüber der bisher verwendeten *Hardware* erzielt werden.

Tropische Infektionskrankheiten wie Malaria, Trypanosomiasis und Leishmaniose, welche durch Protozoen der Gattungen *Plasmodium sp.*, *Trypanosoma sp.* und *Leishmania sp.* hervorgerufen werden, haben massive Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen sowie auf den Wohlstand vieler Länder. Sie fordern pro Jahr mehrere Millionen Todesopfer. Da viele der zurzeit zugelassenen Medikamente für die Betroffenen nicht erschwinglich sind und sie zudem aufgrund von stärker werdenden Resistenzen immer mehr an Wirkung verlieren, ist die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung dieser Krankheiten dringend notwendig.

Die Tatsache, dass die o. g. Protozoen sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress sind, macht die Hauptkomponenten ihrer antioxidativen Netzwerke zu hervorragenden Angriffspunkten für Chemotherapeutika. Dabei sind auch die antioxidativen Netzwerke der Wirtsorganismen von besonderem Interesse, da eine Inhibierung derselben ebenfalls zu erhöhtem oxidativen Stress für den Parasiten führt. Die Hauptkomponenten dieser Netzwerke sind u. a. die Glutathion-Reduktase und die Trypanothion-Reduktase. Ein weiteres Enzym, welches kein Bestandteil dieser

Netzwerke ist, aber dennoch für die Entstehung von oxidativem Stress sorgen kann, ist die Liponamid-Dehydrogenase.

Um weitere Vorstufen für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Malaria, Trypanosomiasis und Leishmaniose bereit zu stellen, wurden in dieser Arbeit mit *in silico*-Methoden neue Inhibitoren dieser Enzyme identifiziert. Hierzu wurde ein Großteil der aus der Literatur bekannten Inhibitoren in einer Datenbank erfasst und aus diesen Liganden Pharmakophor-Modelle abgeleitet. Mit Hilfe dieser Modelle wurden im Anschluss virtuelle Substanzbibliotheken dahingehend gefiltert, dass die resultierenden Substanzen eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, mit dem Zielprotein zu interagieren. Die so erhaltenen Moleküle wurden nun unter Verwendung eines zuvor validierten und optimierten *Docking-Setups* in das Zielprotein eingepasst und die chemischen Interaktionen zwischen Protein und Ligand bewertet. Eine Auswahl an Substanzen konnte dann mittels *in vitro*-Tests auf ihre biologische Wirksamkeit überprüft werden. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität einiger Inhibitoren mit den besten aus der Literatur bekannten Substanzen vergleichbar war. Anhand dieser Daten war es möglich Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abzuleiten, die deutliche Hinweise für die Optimierung der identifizierten Inhibitoren liefern. Bei allen hier durchgeführten *Docking*-Experimenten konnte eine gute Korrelation zwischen den vorgeschlagenen Bindungsmodi und den gemessenen biologischen Aktivitäten der Inhibitoren beobachtet werden, was eine weitere Bestätigung für die Funktionalität der hier angewendeten Methode liefert. Die vorliegenden Ergebnisse stellen eine wertvolle Grundlage für die zukünftige Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria, Trypanosomiasis und Leishmaniose dar.

6 Literaturverzeichnis

- Alibu V.P., Richter C. *et al.* (2006). "The role of *Trypanosoma brucei* MRPA in melarsoprol susceptibility." *Mol Biochem Parasitol* **146** (1): 38-44.
- Aliciguzel Y. and Aslan M. (2004). "N-acetyl cysteine, L-cysteine, and beta-mercaptoethanol augment selenium-glutathione peroxidase activity in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient human erythrocytes." *Clin Exp Med* **4** (1): 50-55.
- Altschul S.F., Gish W. *et al.* (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215** (3): 403-410.
- Altschul S.F., Madden T.L. *et al.* (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25** (17): 3389-3402.
- Amusategui I., Sainz A. *et al.* (2003). "Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis." *Eur J Epidemiol* **18** (2): 147-156.
- Anastasi J. (1984). "Hemoglobin S-mediated membrane oxidant injury: protection from malaria and pathology in sickle cell disease." *Med Hypotheses* **14** (3): 311-320.
- Annamala M.K., Inampudi K.K. *et al.* (2007). "Docking of phosphonate and trehalose analog inhibitors into M. tuberculosis mycolyltransferase Ag85C: Comparison of the two scoring fitness functions GoldScore and ChemScore, in the GOLD software." *Bioinformatics* **1** (9): 339-350.
- Arvieux C. and Tribut O. (2005). "Amprenavir or fosamprenavir plus ritonavir in HIV infection: pharmacology, efficacy and tolerability profile." *Drugs* **65** (5): 633-659.

- Ayoub W.S., Geller S.A. *et al.* (2005). "Imatinib (Gleevec)-induced hepatotoxicity." *J Clin Gastroenterol* **39** (1): 75-77.
- Bahl A., Brunk B. *et al.* (2003). "PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data." *Nucleic Acids Res* **31** (1): 212-215.
- Baigude H., McCarroll J. *et al.* (2007). "Design and creation of new nanomaterials for therapeutic RNAi." *ACS Chem Biol* **2** (4): 237-241.
- Barcelo F., Ortiz-Lombardia M. *et al.* (2001). "Heterogeneous DNA binding modes of berenil." *Biochim Biophys Acta* **1519** (3): 175-184.
- Bateman A., Coin L. *et al.* (2004). "The Pfam protein families database." *Nucleic Acids Res* **32** (Database issue): D138-D141.
- Becker K., Christopherson R.I. *et al.* (1990). "Flavin analogs with antimalarial activity as glutathione reductase inhibitors." *Biochem Pharmacol* **39** (1): 59-65.
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I. *et al.* (2005). "GenBank." *Nucleic Acids Res* **33** (Database issue): D34-D38.
- Berg J.M., Tymoczko J.L. *et al.* (2003). "Biochemie." 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Berman H., Henrick K. *et al.* (2003). "Announcing the worldwide Protein Data Bank." *Nat Struct Biol* **10** (12): 980.
- Bissantz C., Folkers G. *et al.* (2000). "Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations." *J Med Chem* **43** (25): 4759-4767.
- Blumenstiel K., Schoneck R. *et al.* (1999). "Nitrofurantoin drugs as common subversive substrates of Trypanosoma cruzi lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase." *Biochem Pharmacol* **58** (11): 1791-1799.

- Boeckmann B., Bairoch A. *et al.* (2003). "The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003." *Nucleic Acids Res* **31** (1): 365-370.
- Bohme C.C., Arscott L.D. *et al.* (2000). "Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Comparison with the human enzyme." *J Biol Chem* **275** (48): 37317-37323.
- Böhm H.J., Klebe G. *et al.* (2002). "Wirkstoffdesign." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Brickmann J., Exner T. *et al.* (2000). "Molecular Graphics - Trends and Perspectives." *J Mol Mod* **6** 328-340.
- Brophy D.F., Israel D.S. *et al.* (2000). "Pharmacokinetic interaction between amprenavir and clarithromycin in healthy male volunteers." *Antimicrob Agents Chemother* **44** (4): 978-984.
- Brown N. and Lewis R.A. (2006). "Exploiting QSAR methods in lead optimization." *Curr Opin Drug Discov Devel* **9** (4): 419-424.
- Carothers D.J., Pons G. *et al.* (1989). "Dihydrolipoamide dehydrogenase: functional similarities and divergent evolution of the pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductases." *Arch Biochem Biophys* **268** (2): 409-425.
- Carter N.S. and Fairlamb A.H. (1993). "Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter." *Nature* **361** (6408): 173-176.
- Cenas N., Bironaite D. *et al.* (1994). "Chinifur, a selective inhibitor and "subversive substrate" for *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase." *Biochem Biophys Res Commun* **204** (1): 224-229.
- Chen H., Lyne P.D. *et al.* (2006). "On evaluating molecular-docking methods for pose prediction and enrichment factors." *J Chem Inf Model* **46** (1): 401-415.

- Chimelli L. and Scaravilli F. (1997). "Trypanosomiasis." *Brain Pathol* **7** (1): 599-611.
- Clark I.A. and Chaudhri G. (1988). "Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis." *Br J Haematol* **70** (1): 99-103.
- Connor R.J. (1994). "The impact of nagana." *Onderstepoort J Vet Res* **61** (4): 379-383.
- Cross G.A. (1996). "Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly." *Bioessays* **18** (4): 283-291.
- de Bont D.B., Sliedregt-Bol K.M. *et al.* (1999). "Increased stability of peptidessulfonamide peptidomimetics towards protease catalyzed degradation." *Bioorg Med Chem* **7** (6): 1043-1047.
- Deponte M., Urig S. *et al.* (2005). "Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase." *J Biol Chem* **280** (21): 20628-20637.
- Diaz de Toranzo E.G., Castro J.A. *et al.* (1988). "Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*." *Experientia* **44** (10): 880-881.
- DNDi (1)
http://www.dndi.org/cms/public_html/insidearticleListing.asp?categoryid=149&articleid=205&templateid=1
- Dobson R. (2001). "Sleeping sickness re-emerges in Africa after years of civil war." *BMJ* **322** 1382.
- Docampo R. and Stoppani A.O. (1979). "Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*." *Arch Biochem Biophys* **197** (1): 317-321.

- Dorlo T.P., Eggelte T.A. *et al.* (2006). "[Miltefosine: a new remedy for leishmaniasis]." *Ned Tijdschr Geneesk* **150** (49): 2697-2701.
- Dubois V.L., Platel D.F. *et al.* (1995). "Plasmodium berghei: implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance in vivo." *Exp Parasitol* **81** (1): 117-124.
- Dumas C., Ouellette M. *et al.* (1997). "Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages." *EMBO J* **16** (10): 2590-2598.
- Duszenko M., Ivanov I.E. *et al.* (1988). "Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei." *J Cell Biol* **106** (1): 77-86.
- Eldridge M.D., Murray C.W. *et al.* (1997). "Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes." *J Comput Aided Mol Des* **11** (5): 425-445.
- Ewing T.J., Makino S. *et al.* (2001). "DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases." *J Comput Aided Mol Des* **15** (5): 411-428.
- FAO (1)
<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/paat/disease.html>
- Farber P.M., Arscott L.D. *et al.* (1998). "Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue." *FEBS Lett* **422** (3): 311-314.
- Ferguson M.A., Duszenko M. *et al.* (1986). "Biosynthesis of Trypanosoma brucei variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor." *J Biol Chem* **261** (1): 356-362.
- Ferrara P., Gohlke H. *et al.* (2004). "Assessing scoring functions for protein-ligand interactions." *J Med Chem* **47** (12): 3032-3047.

- Fiander H. and Schneider H. (2000). "Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics." *Cancer Lett* **156** (2): 117-124.
- Fiser A. and Sali A. (2003). "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models." *Methods Enzymol* **374** 461-491.
- Forster M.J. (2002). "Molecular modelling in structural biology." *Micron* **33** (4): 365-384.
- Fournet A. and Munoz V. (2002). "Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs." *Curr Top Med Chem* **2** (11): 1215-1237.
- Fukushima K., Arai M. *et al.* (1990). "An epoxysuccinic acid derivative(loxistatin)-induced hepatic injury in rats and hamsters." *Toxicol Appl Pharmacol* **105** (1): 1-12.
- Furuya E.Y. and Lowy F.D. (2006). "Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting." *Nat Rev Microbiol* **4** (1): 36-45.
- Gallwitz H., Bonse S. *et al.* (1999). "Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and Trypanosoma cruzi trypanothione reductase: crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies." *J Med Chem* **42** (3): 364-372.
- Gao H.X. and Peng L.M. (1999). "Parameterization of the temperature dependence of the Debye-Waller factors." *Acta Crystallogr A* **55** (Pt 5): 926-932.
- Garcia D.F. (1999). "[Search of biomedical literature through Internet. The PubMed project]." *Med Clin (Barc)* **113** (2): 58-62.
- Gasteiger J. (2006). "Chemoinformatics: a new field with a long tradition." *Anal Bioanal Chem* **384** (1): 57-64.

- Ginsburg H. and Krugliak M. (1999). "Chloroquine - some open questions on its antimalarial mode of action and resistance." *Drug Resist Updat* **2** (3): 180-187.
- Goto Y., Arai-Otsuki S. *et al.* (2006). "Identification of a novel spiro-piperidine opioid receptor-like 1 antagonist class by a focused library approach featuring 3D-pharmacophore similarity." *J Med Chem* **49** (3): 847-849.
- Grant K.M., Dunion M.H. *et al.* (2004). "Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 cyclin-dependent kinase: chemical library screen and antileishmanial activity." *Antimicrob Agents Chemother* **48** (8): 3033-3042.
- Grant S., Easley C. *et al.* (2007). "Vorinostat." *Nat Rev Drug Discov* **6** (1): 21-22.
- Greenwood B.M., Bojang K. *et al.* (2005). "Malaria." *Lancet* **365** (9469): 1487-1498.
- Greer J. (1990). "Comparative modeling methods: application to the family of the mammalian serine proteases." *Proteins* **7** (4): 317-334.
- Greig N., Wyllie S. *et al.* (2006). "Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*." *Biochem J* **400** (2): 217-223.
- Grellier P., Sarlauskas J. *et al.* (2001). "Antiplasmodial activity of nitroaromatic and quinoidal compounds: redox potential vs. inhibition of erythrocyte glutathione reductase." *Arch Biochem Biophys* **393** (2): 199-206.
- Hall T.A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl Acids Symp Ser* **41** 95-98.
- Henikoff S. and Henikoff J.G. (1992). "Amino acid substitution matrices from protein blocks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (22): 10915-10919.

- Hiepe T., Lucius R. *et al.* (2005). "Allgemeine Parasitologie. Mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung." Parey bei MVS, Stuttgart
- Holmgren A. (1978). "Glutathione-dependent enzyme reactions of the phage T4 ribonucleotide reductase system." *J Biol Chem* **253** (20): 7424-7430.
- Hulo N., Bairoch A. *et al.* (2006). "The PROSITE database." *Nucleic Acids Res* **34** (Database issue): D227-D230.
- Husain S.S., Szabo I.L. *et al.* (2001). "MAPK (ERK2) kinase--a key target for NSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth." *Life Sci* **69** (25-26): 3045-3054.
- Hutvagner G. and Zamore P.D. (2002). "RNAi: nature abhors a double-strand." *Curr Opin Genet Dev* **12** (2): 225-232.
- Janeway C.A., Travers P. *et al.* (2001). "Immunobiology." Garland Science, New York, London
- Jefford C.W. (2001). "Why artemisinin and certain synthetic peroxides are potent antimalarials. Implications for the mode of action." *Curr Med Chem* **8** (15): 1803-1826.
- Jockers-Scherubl M.C., Schirmer R.H. *et al.* (1989). "Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds." *Eur J Biochem* **180** (2): 267-272.
- Jones G., Willett P. *et al.* (1995). "Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation." *J Mol Biol* **245** (1): 43-53.
- Jones P.M. and George A.M. (2005). "Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling." *Int J Parasitol* **35** (5): 555-566.

- Kamchonwongpaisan S. and Meshnick S.R. (1996). "The mode of action of the antimalarial artemisinin and its derivatives." *Gen Pharmacol* **27** (4): 587-592.
- Kanehisa M. and Goto S. (2000). "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." *Nucleic Acids Res* **28** (1): 27-30.
- Kanzok S.M., Schirmer R.H. *et al.* (2000). "The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited." *J Biol Chem* **275** (51): 40180-40186.
- Karplus P.A., Krauth-Siegel R.L. *et al.* (1988). "Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea. A crystallographic analysis." *Eur J Biochem* **171** (1-2): 193-198.
- Karplus P.A., Pai E.F. *et al.* (1989). "A crystallographic study of the glutathione binding site of glutathione reductase at 0.3-nm resolution." *Eur J Biochem* **178** (3): 693-703.
- Kempf D.J., Marsh K.C. *et al.* (1995). "ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (7): 2484-2488.
- Kitchen D.B., Decornez H. *et al.* (2004). "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications." *Nat Rev Drug Discov* **3** (11): 935-949.
- Kovalenko S.M., Bylov I.E. *et al.* (2000). "A New Pathway to 3-Hetaryl-2-oxo-2*H*-chromenes: On the Proposed Mechanisms for the Reaction of 3-Carbamoyl-2-iminochromenes with Dinucleophiles." *Molecules* **5** 1146-1165.
- Kramer B., Rarey M. *et al.* (1999). "Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking." *Proteins* **37** (2): 228-241.

- Krauth-Siegel R.L. and Schoneck R. (1995). "Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design." *FASEB J* **9** (12): 1138-1146.
- Krauth-Siegel R.L. and Coombs G.H. (1999). "Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets." *Parasitol Today* **15** (10): 404-409.
- Krauth-Siegel R.L. and Inhoff O. (2003). "Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule." *Parasitol Res* **90** Suppl 2 S77-S85.
- Krauth-Siegel R.L., Meiering S.K. *et al.* (2003). "The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania." *Biol Chem* **384** (4): 539-549.
- Krauth-Siegel R.L., Bauer H. *et al.* (2005). "Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia." *Angew Chem Int Ed Engl* **44** (5): 690-715.
- Krnajski Z., Gilberger T.W. *et al.* (2002). "Thioredoxin reductase is essential for the survival of Plasmodium falciparum erythrocytic stages." *J Biol Chem* **277** (29): 25970-25975.
- Krovat E.M., Fruhwirth K.H. *et al.* (2005). "Pharmacophore identification, in silico screening, and virtual library design for inhibitors of the human factor Xa." *J Chem Inf Model* **45** (1): 146-159.
- Kublin J.G., Dzinjalama F.K. *et al.* (2002). "Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of Plasmodium falciparum malaria." *J Infect Dis* **185** (3): 380-388.
- Labusquiere R. and Dutertre J. (1966). "[The fight against the last foci of human African trypanosomiasis due to T. gambiense]." *Med Trop (Mars)* **26** (4): 357-362.

- Legare D., Papadopoulou B. *et al.* (1997). "Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant *Leishmania*." *Exp Parasitol* **87** (3): 275-282.
- Lesk A.M. (2005). "An Introduction to Bioinformatics." Oxford University Press, Oxford, New York
- Lohrer H. and Krauth-Siegel R.L. (1990). "Purification and characterization of lipamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*." *Eur J Biochem* **194** (3): 863-869.
- Luond R.M., McKie J.H. *et al.* (1998). "Inhibitors of glutathione reductase as potential antimalarial drugs. Kinetic cooperativity and effect of dimethyl sulphoxide on inhibition kinetics." *J Enzyme Inhib* **13** (5): 327-345.
- Luque F., Fernandez-Ramos C. *et al.* (2000). "In vitro evaluation of newly synthesised [1,2,4]triazolo[1,5a]pyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* and *Phytomonas staheli*." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **126** (1): 39-44.
- Macdonald L. (2000). "New influenza drugs zanamivir (Relenza) and oseltamivir (Tamiflu): unexpected serious reactions." *CMAJ* **163** (7): 879-5.
- Mason J.S. and Beno B.R. (2000). "Library design using BCUT chemistry-space descriptors and multiple four-point pharmacophore fingerprints: simultaneous optimization and structure-based diversity." *J Mol Graph Model* **18** (4-5): 438-51, 538.
- Maya J.D., Bollo S. *et al.* (2003). "*Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives." *Biochem Pharmacol* **65** (6): 999-1006.
- McCann P.P. and Pegg A.E. (1992). "Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy." *Pharmacol Ther* **54** (2): 195-215.

- McKellar Q.A. and Jackson F. (2004). "Veterinary anthelmintics: old and new." *Trends Parasitol* **20** (10): 456-461.
- Mehlhorn H. (2001). "Encyclopedic Reference of Parasitology." *2nd Edition*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Meiering S., Inhoff O. *et al.* (2005). "Inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase revealed by virtual screening and parallel synthesis." *J Med Chem* **48** (15): 4793-4802.
- Meinke P.T. and Liberator P. (2001). "Histone deacetylase: a target for antiproliferative and antiprotozoal agents." *Curr Med Chem* **8** (2): 211-235.
- Mockenhaupt F.P., Ehrhardt S. *et al.* (2005). "Chloroquine-treatment failure in northern Ghana: roles of pfcrt T76 and pfmdr1 Y86." *Ann Trop Med Parasitol* **99** (8): 723-732.
- Monaghan R.L. and Barrett J.F. (2006). "Antibacterial drug discovery--then, now and the genomics future." *Biochem Pharmacol* **71** (7): 901-909.
- Montrichard F., Le Guen F. *et al.* (1999). "Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: Euglena gracilis Z." *FEBS Lett* **442** (1): 29-33.
- Moore S.A., Baker H.M. *et al.* (1998). "Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases." *Structure* **6** (12): 1541-1551.
- Mulder N.J., Apweiler R. *et al.* (2005). "InterPro, progress and status in 2005." *Nucleic Acids Res* **33** (Database issue): D201-D205.
- Murakami E., Ishii J. *et al.* (1989). "Blood pressure elevation caused by inhibition of brain glutathione reductase." *J Hypertens Suppl* **7** (6): S24-S25.

- Murphy S.C. and Breman J.G. (2001). "Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy." *Am J Trop Med Hyg* **64** (1-2 Suppl): 57-67.
- Navarro M. and Cross G.A. (1996). "DNA rearrangements associated with multiple consecutive directed antigenic switches in *Trypanosoma brucei*." *Mol Cell Biol* **16** (7): 3615-3625.
- Nicholas K.B., Nicholas H.B. *et al.* (1997). "GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation." *EMBNEW NEWS* **4** 14.
- Nordhoff A., Tziatzios C. *et al.* (1997). "Denaturation and reactivation of dimeric human glutathione reductase--an assay for folding inhibitors." *Eur J Biochem* **245** (2): 273-282.
- Norinder U. and Bergstrom C.A. (2006). "Prediction of ADMET Properties." *ChemMedChem* **1** (9): 920-937.
- Nunn C.M. and Neidle S. (1995). "Sequence-dependent drug binding to the minor groove of DNA: crystal structure of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG)₂ complexed with propamidine." *J Med Chem* **38** (13): 2317-2325.
- Okuda J., Hirai Y. *et al.* (1989). "Mechanism of inhibition of erythrocyte glutathione reductase by mitomycin-C." *Clin Chim Acta* **181** (1): 37-46.
- Oliveira R.B., Meneghelli U. G. *et al.* (1983). "Abnormalities of interdigestive motility of the small intestine in patients with Chagas' disease." *Dig Dis Sci* **28** (4): 294-299.
- Ozben T. (2007). "Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy." *J Pharm Sci* **96** (9): 2181-2196.
- Pai E.F. and Schulz G.E. (1983). "The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates." *J Biol Chem* **258** (3): 1752-1757.

- Parada H., Carrasco H.A. *et al.* (1997). "Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study." *Int J Cardiol* **60** (1): 49-54.
- Pineyro M.D., Pizarro J.C. *et al.* (2005). "Crystal structure of the trypanothione peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*." *J Struct Biol* **150** (1): 11-22.
- Pschyrembel W. (1998). "Klinisches Wörterbuch." 258., neu bearbeitete Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Regazzi M.B., Villani P. *et al.* (1999). "Pharmacokinetic variability and strategy for therapeutic drug monitoring of saquinavir (SQV) in HIV-1 infected individuals." *Br J Clin Pharmacol* **47** (4): 379-382.
- Richarme G. (1985). "Possible involvement of lipoic acid in binding protein-dependent transport systems in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **162** (1): 286-293.
- Roos T.C., Alam M. *et al.* (2001). "Pharmacotherapy of ectoparasitic infections." *Drugs* **61** (8): 1067-1088.
- Sachs J. and Malaney P. (2002). "The economic and social burden of malaria." *Nature* **415** (6872): 680-685.
- Sali A. and Overington J.P. (1994). "Derivation of rules for comparative protein modeling from a database of protein structure alignments." *Protein Sci* **3** (9): 1582-1596.
- Salmon-Chemin L., Buisine E. *et al.* (2001). "2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity." *J Med Chem* **44** (4): 548-565.
- Saravanamuthu A., Vickers T.J. *et al.* (2004). "Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione

- reductase: a template for drug design." *J Biol Chem* **279** (28): 29493-29500.
- Sarma G.N., Savvides S.N. *et al.* (2003). "Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development." *J Mol Biol* **328** (4): 893-907.
- Savvides S.N. and Karplus P.A. (1996). "Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthine inhibitor." *J Biol Chem* **271** (14): 8101-8107.
- Schallreuter K.U., Gleason F.K. *et al.* (1990). "The mechanism of action of the nitrosourea anti-tumor drugs on thioredoxin reductase, glutathione reductase and ribonucleotide reductase." *Biochim Biophys Acta* **1054** (1): 14-20.
- Schirmer R.H., Schollhammer T. *et al.* (1987). "Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections." *Free Radic Res Commun* **3** (1-5): 3-12.
- Schirmer R.H., Muller G. *et al.* (1995). "Disulfide-Reductase Inhibitors as Chemotherapeutic Agents: The Design of Drugs for Trypanosomiasis and Malaria." *Angew Chem Int Ed Engl* **34** 141-154.
- Schneider G., Lee M.L. *et al.* (2000). "De novo design of molecular architectures by evolutionary assembly of drug-derived building blocks." *J Comput Aided Mol Des* **14** (5): 487-494.
- Schneider G. and Bohm H.J. (2002). "Virtual screening and fast automated docking methods." *Drug Discov Today* **7** (1): 64-70.
- Schneider G. and Fechner U. (2005). "Computer-based de novo design of drug-like molecules." *Nat Rev Drug Discov* **4** (8): 649-663.
- Schoneberg I., Stark K. *et al.* (2005). "[Malaria in Germany 1993 to 2003. Data from the Robert Koch Institute on affected groups of people, countries traveled to and treatment]." *Dtsch Med Wochenschr* **130** (15): 937-941.

- Schonleben-Janás A., Kirsch P. *et al.* (1996). "Inhibition of human glutathione reductase by 10-arylisalloxazines: crystalline, kinetic, and electrochemical studies." *J Med Chem* **39** (7): 1549-54.
- Schue M., Glendinning K.J. *et al.* (2007). "Evidence for direct interactions between the mercuric ion transporter (MerT) and mercuric reductase (MerA) from the Tn501 mer operon." *Biometals* [Epub ahead of print]
- Schulz-Gasch T. and Stahl M. (2004). "Scoring functions for protein-ligand interactions: a critical perspective." *Drug Discovery Today: Technologies* **1** (3): 231-239.
- Seefeldt T., Dwivedi C. *et al.* (2005). "2-Acetylamino-3-[4-(2-acetylamino-2-carboxyethylsulfanylcarbonylamino)-phenylcarbamoylsulfanyl]propionic acid and its derivatives as a novel class of glutathione reductase inhibitors." *J Med Chem* **48** (16): 5224-5231.
- Seifert M.H., Kraus J. *et al.* (2007). "Virtual high-throughput screening of molecular databases." *Curr Opin Drug Discov Devel* **10** (3): 298-307.
- Selzer P.M., Brutsche S. *et al.* (2000). "Target-based drug discovery for the development of novel anti-infectives." *Int J Med Microbiol* **290** (2): 191-201.
- Selzer P.M., Rohwer A., Marhoefer R. (2004). "Angewandte Bioinformatik." Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Selzer P.M. (2005). "Structure-based rational drug design: Neue Wege der modernen Wirkstoffentwicklung" in Hiepe T., Lucius R., Gottstein B. (2005). "Allgemeine Parasitologie. Mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung." Parey bei MVS, Stuttgart
- Shahi S.K., Krauth-Siegel R.L. *et al.* (2002). "Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol* **43** (5): 1129-1138.

- Stahl M. and Rarey M. (2001). "Detailed analysis of scoring functions for virtual screening." *J Med Chem* **44** (7): 1035-1042.
- Steindl T.M., Schuster D. *et al.* (2006). "High-throughput structure-based pharmacophore modelling as a basis for successful parallel virtual screening." *J Comput Aided Mol Des* **20** (12): 703-715.
- Steinert P., Dittmar K. *et al.* (1999). "Cytoplasmic localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*." *Free Radic Biol Med* **26** (7-8): 844-849.
- Stephens C.E., Brun R. *et al.* (2003). "The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*." *Bioorg Med Chem Lett* **13** (12): 2065-2069.
- Tamayo E.M., Iturbe A. *et al.* (2005). "Trypanothione reductase from the human parasite *Entamoeba histolytica*: a new drug target." *Biotechnol Appl Biochem* **41** (Pt 2): 105-115.
- Tanoli Z.M., Rai M.E. *et al.* (2005). "Clinical presentation and management of visceral leishmaniasis." *J Ayub Med Coll Abbottabad* **17** (4): 51-53.
- Tartaglia L.A., Storz G. *et al.* (1990). "Alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Sequence and homology to thioredoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases." *J Biol Chem* **265** (18): 10535-10540.
- Tedford H.W., Sollod B.L. *et al.* (2004). "Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists." *Toxicon* **43** (5): 601-618.
- Thompson J.D., Higgins D.G. *et al.* (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* **22** (22): 4673-4680.

- Thornalley P.J. (1998). "Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors." *Chem Biol Interact* **111-112**: 137-151.
- Vega-Tejido M., Caracelli I. *et al.* (2006). "Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuran- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases." *J Mol Graph Model* **24** (5): 349-355.
- Vennerstrom J.L., Makler M.T. *et al.* (1995). "Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines." *Antimicrob Agents Chemother* **39** (12): 2671-2677.
- Verdonk M.L., Cole J.C. *et al.* (2003). "Improved protein-ligand docking using GOLD." *Proteins* **52** (4): 609-623.
- Voogd T.E., Vansterkenburg E.L. *et al.* (1993). "Recent research on the biological activity of suramin." *Pharmacol Rev* **45** (2): 177-203.
- Wang R., Lu Y. *et al.* (2004). "An extensive test of 14 scoring functions using the PDBbind refined set of 800 protein-ligand complexes." *J Chem Inf Comput Sci* **44** (6): 2114-2125.
- Welch W., Ruppert J. *et al.* (1996). "Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites." *Chem Biol* **3** (6): 449-462.
- WHO (1)
http://www.who.int/entity/vaccine_research/documents/en/Status_Table.pdf
- WHO (2)
http://www.who.int/malaria/rbm/Attachment/20041108/SusceptibilityPlasmodium_report.pdf

WHO (3)

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>

WHO (4)

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>

Wilbur W.J. (1985). "On the PAM matrix model of protein evolution." *Mol Biol Evol* **2** (5): 434-447.

Xia L., Bjornstedt M. *et al.* (2001). "Reduction of ubiquinone by lipamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway." *Eur J Biochem* **268** (5): 1486-1490.

Yamashita F. and Hashida M. (2004). "In silico approaches for predicting ADME properties of drugs." *Drug Metab Pharmacokinet* **19** (5): 327-338.

Yang D.I., Chen S.D. *et al.* (2005). "S-nitrosoglutathione and hypoxia-inducible factor-1 confer chemoresistance against carbamoylating cytotoxicity of BCNU in rat C6 glioma cells." *Ann N Y Acad Sci* **1042** 229-234.

Zappe H.A., Krohne-Ehrich G. *et al.* (1977). "Low resolution structure of human erythrocyte glutathione reductase." *J Mol Biol* **113** (1): 141-152.

Zhang Y., Konig I. *et al.* (1988a). "Glutathione reductase-deficient erythrocytes as host cells of malarial parasites." *Biochem Pharmacol* **37** (5): 861-865.

Zhang Y.A., Hempelmann E. *et al.* (1988b). "Glutathione reductase inhibitors as potential antimalarial drugs. Effects of nitrosoureas on *Plasmodium falciparum* in vitro." *Biochem Pharmacol* **37** (5): 855-860.

Meine akademischen Lehrer

Zoologie: A. Dorresteijn, G. Eisenbeis, A. Fischer, U. Höger,
K. Honomichl, J. Markl, Ch. Neumeyer, G. Wegener

Immunologie: A. Reske-Kunz, E. Rüde, E. Schmitt

Mikrobiologie: H. König, P. Pfeiffer, G. Uden

Genetik: T. Hankeln, W. Hennig, E. R. Schmidt, G. Technau

Botanik: W. Kadereit, H. Paulsen, G. Rothe, W. Wernicke

Biochemie: M. Duszenko, P. M. Selzer

Chemie: M. Dräger, K. Unger, W. Vogt

Physik: K. Jakobs

Lebenslauf

Name Andreas Krasky
Geburtstag 20. September 1974
Geburtsort Mainz

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

- 11/2003 - 11/2007 Promotion in Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Fakultät für Chemie und Pharmazie) in Zusammenarbeit mit der Firma Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim: „*In silico* Identifizierung neuartiger Redoxenzym-Inhibitoren zur Entwicklung von Medikamenten gegen Parasitosen und Krebs.“
Betreuer: Prof. Dr. P. M. Selzer und Prof. Dr. M. Duszenko
- 06/2005 Teilnahme am 5th *European Workshop in Drug Design*, Universität Siena, *Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico*, Prof. Dr. Maurizio Botta, Siena, Italien. Gefördert durch Boehringer Ingelheim Fonds, Intervet Innovation GmbH und Tripos *Inc.*
- 05/2004 Teilnahme am Kurzworkshop *Molecular Modeling*, Computer-Chemie-Zentrum, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- 09/2002 - 10/2003 Diplom in Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Note: 1,0
Diplomarbeit am Institut für Genetik in Zusammenarbeit mit der Firma Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim: „Bioinformatische Analyse von *Expressed Sequence Tags* aus parasitären Invertebraten.“

Betreuer: Prof. Dr. P. M. Selzer und Prof. Dr. G. Technau

10/1998 - 09/2002

Studium der Biologie (Diplom) an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
Hauptstudium: Mikrobiologie, Immunologie und Zoologie
Grundstudium: Genetik, Botanik, Mikrobiologie, Zoologie, Chemie und Physik

FORSCHUNGSSCHWERPUNKTE

Bioinformatik, Sequenz-Analysen, Komparative Genomik, Target-Identifizierung zur Entwicklung von Antiparasitika, Immunologie, Molekularbiologie, Chemoinformatik, *Molecular Modeling*, Strukturbasiertes *Drug Design*, *Pharmacophore Modeling*, *Docking*, *Homology Modeling*, *Virtual High-Throughput-Screening*, *Data Mining*

PRAKTIKA

10/2001 - 12/2002

Bioinformatisches Praktikum bei der Firma Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim in der Abteilung Drug Discovery - BioChemInformatics
Betreuer: Dr. A. Rohwer, Prof. Dr. P. M. Selzer

SONSTIGES

Rezensent für internationale wissenschaftliche Journale in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. P. M. Selzer

LEHRAKTIVITÄTEN

02/2003 - heute

„Sequenz-, Struktur-, Funktions-Analysen: Arbeitsfelder der angewandten Bioinformatik“. Theoretischer und praktischer Kurs (Vorträge

mit praktischen Übungen am Computer) für Biochemie-, Biologie- und Bioinformatikstudenten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. P. M. Selzer, Interfakultäres Institut für Biochemie, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

- 03/2004 Fakultätsmitglied bei „*The Young Parasitologists Course - A short course for graduate and undergraduate students*“. Universität Würzburg
- 10/2000 - 09/2002 Leitung von mikrobiologischen Übungen für Biologiestudenten, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
- 10/2000 - 09/2002 Leitung von Zoologietutorien für Biologiestudenten, Institut für Zoologie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

AKADEMISCHE KOLLABORATIONEN

Wissenschaftliche Kollaboration mit Prof. Dr. Luise Krauth-Siegel und Prof. Dr. Heiner Schirmer, Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg: „Bestimmung der biologischen Aktivität von *in silico*-identifizierten Redoxenzym-Inhibitoren“. Die Kollaboration wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt und ist Teil des Sonderforschungsbereichs 544: „Control of tropical infectious diseases“.

Wissenschaftliche Kollaboration mit Prof. Dr. Leopold Flohé, Institut für Biochemie, Technische Universität Braunschweig: „Machbarkeitsstudie - Virtuelles Screening zur Identifikation von Tryparedoxin-Inhibitoren“.

SCHULBILDUNG

- 06/1985 - 06/1994 Sebastian-Münster-Gymnasium, Ingelheim
06/1994 Abitur