

Dithiolproteine als Hüter des intrazellulären Redoxmilieus bei Parasiten: alte und neue Wirkstoff-Targets bei Trypanosomiasis und Malaria

R. Luise Krauth-Siegel,* Holger Bauer und R. Heiner Schirmer*

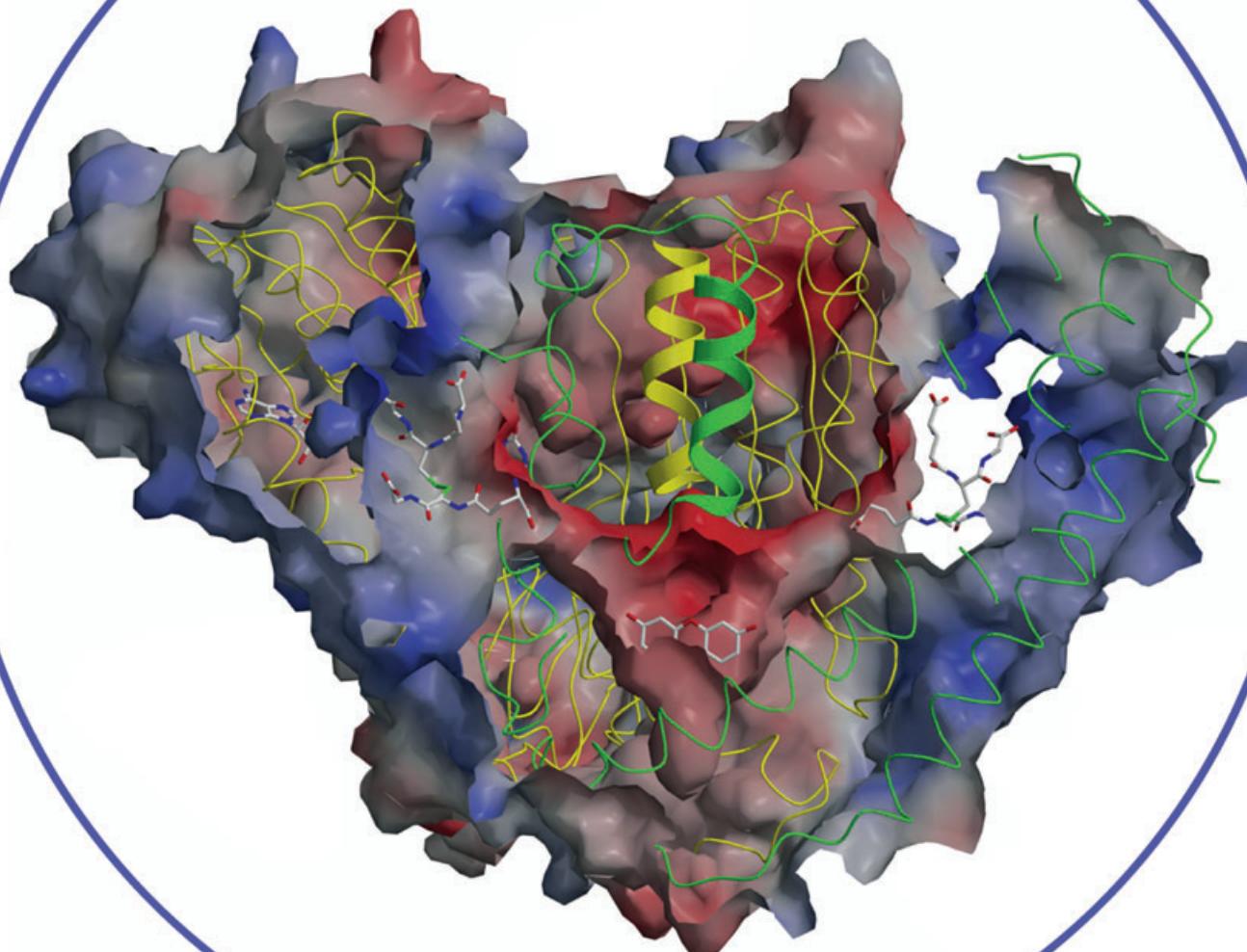
Stichwörter:

Antioxidative Proteine · Leishmaniasis ·

Medizinische Chemie · Schlaf-

krankheit · Trypanothion ·

Wirkstoffdesign



Parasitäre Erkrankungen wie *Schlafkrankheit*, *Chagas-Krankheit* oder *Malaria* gehören zu den Hauptursachen weltweiter Armut. Dringend benötigt werden antiparasitäre Medikamente, die nicht nur wirksam, sondern für die Betroffenen auch erschwinglich und verfügbar sind. Ein Ansatz bei der Suche nach neuen Wirkstoffen (und der Wiederentdeckung alter) basiert auf dem Einsatz von Enziminhibitoren, die die antioxidativen Systeme in den Pathogenen blockieren. Für Parasiten sind die antioxidativen Netzwerke essentiell, da sie vom menschlichen Wirt durch starke Oxidantien wie *Peroxynitrit*, *Hypochlorit* und *Wasserstoffperoxid* bekämpft werden. Das pathogene Schutzsystem besteht aus etwa zwanzig *Thiol*- und *Dithiolproteinen*, die das intrazelluläre Redoxmilieu bei einem Potential von etwa -250 mV puffern. Im Zentrum dieses Redoxgefüges steht bei *Trypanosomen* und *Leishmanien* das parasitenspezifische *Dithiol Trypanothion* ($N^1,N^8\text{-Bis(glutathionyl)spermidin}$). Malariaparasiten hingegen besitzen ein konservativeres System, das auf *Glutathion* und *Thioredoxin* basiert. Inhibitoren von antioxidativen Enzymen wie der *Trypanothionreduktase* sind *per se parasitizid*, darüber hinaus können sie aber auch die Entwicklung von Resistenz gegen andere antiparasitäre Wirkstoffe verzögern.

1. Gegenwärtige Chemotherapie von Trypanosomenerkrankungen

Trypanosomatiden sind parasitische Protozoen innerhalb der Ordnung Kinetoplastida, zu denen die Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei gambiense* und *T. b. rhodesiense*; siehe <http://www.who.int/tdr/diseases/tryp>), der Südamerikanischen Chagas-Krankheit (*T. cruzi*, siehe <http://www.who.int/health-topics/chagas>),^[1] der Viehseuche Nagana (*T. congolense* und *T. b. brucei*) und die diversen Formen der Leishmanien-Erkrankungen beim Menschen (*Leishmania donovani*, *L. major* und *L. tropica*) gehören.

Bei allen Formen der Trypanosomiasis und Leishmaniose sind die Möglichkeiten der Chemotherapie sehr begrenzt und äußerst unbefriedigend (Tabelle 1).^[2] Die Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit stützt sich auf insgesamt vier Medikamente, von denen zwei – Suramin und Pentamidin – nur gegen das erste Stadium der Krankheit wirksam sind, solange sich die Parasiten auf das Blut- und Lymphsystem beschränken. Die Arsenverbindung Melarsoprol wird gegen das Spätstadium der Schlafkrankheit eingesetzt, wenn die Parasiten auch das zentrale Nervensystem befallen haben. Eflornithin (DFMO), der zweite Wirkstoff, der die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, ist gegen das Spätstadium der Westafrikanischen Schlafkrankheit (*T. brucei gambiense*) wirksam, nicht aber gegen das Spätstadium der Ostafrikanischen Schlafkrankheit (*T. brucei rhodesiense*). Die einzigen klinisch verfügbaren Medikamente gegen die Chagas-Krankheit sind Nifurtimox und Benznidazol. Sie sind gegen die

Aus dem Inhalt

1. Gegenwärtige Chemotherapie von Trypanosomenerkrankungen	699
2. Neue Strategien zur Entwicklung antitypanosomaler Wirkstoffe	701
3. Der thiolabhängige Redoxstoffwechsel von Trypanosomen	702
4. Enzyme des Trypanothion-Metabolismus als potenzielle Zielmoleküle	704
5. Behandlung und Prophylaxe der Malaria – aktuelle Probleme	710
6. Das thiolabhängige Redoxnetzwerk bei <i>Plasmodium falciparum</i>	710
7. Enzyme des Thiolstoffwechsels der Plasmodien als Targets (Angriffsziele)	713
8. Ausblick auf die Wirkstoffentwicklung	717

akute Phase aktiv, in der latenten und späten chronischen Phase der Infektion hingegen ist ihre Wirksamkeit fraglich. Außerdem haben beide Verbindungen schwere Nebenwirkungen.

Für keines der verfügbaren Medikamente – außer für Eflornithin – ist der Wirkmechanismus vollständig geklärt, da die Moleküle multiple Targets zu haben scheinen. Arsenverbindungen waren die allerersten Pharmazeutika gegen die Schlafkrankheit, und Melarsoprol (MelB) ist heute noch das einzige wirksame Medikament gegen die Spätphase der Ostafrikanischen Schlafkrankheit. Es ist äußerst toxisch, und etwa 5% der Patienten sterben an einer durch das Medikament ausgelösten reaktiven Enzephalopathie.^[19] Melarsenoxid (MelOx), eine weitere Melaminophenylarsenverbindung, wird in *T. brucei* über den P2-Adenosin/Adenin-Transporter aufgenommen,^[9] der höchstwahrscheinlich mit dem TbAT1-Transporter identisch ist.^[20] Die Mechanismen für die

[*] Prof. Dr. R. L. Krauth-Siegel, Dr. H. Bauer, Prof. Dr. R. H. Schirmer
Universität Heidelberg
Biochemie-Zentrum (BZH)
Im Neuenheimer Feld 504
69120 Heidelberg
Fax: (+49) 6221-545-586
E-mail: krauth-siegel@urz.uni-heidelberg.de
heiner.schirmer@bzh.uni-heidelberg.de

Tabelle 1: Gegenwärtig eingesetzte Wirkstoffe gegen Afrikanische Trypanosomiasis und Chagas-Krankheit.

Wirkstoff	Struktur	Aufnahme	Wirkmechanismus
<i>gegen Afrikanische Trypanosomiasis</i>			
Suramin (eingeführt 1922)		rezeptorvermittelte Endocytose, z. B. im Komplex mit LDL. ^{[a],[3,4]} siehe aber auch Lit. [5]	unbekannt; das sulfonierte Naphthylamin interagiert elektrostatisch mit zahlreichen Enzymen ^[6,7]
Pentamidin (1937)		mehrere Transportproteine, ^[3,8,9] z. B. der P2-Adenin/Adenosin-Transporter	wird in den Parasiten in millimolaren Konzentrationen angereichert; bei diesen Wirkstoffspiegeln gibt es zahlreiche Targets (Proteine, Lipide, kleine Furche der DNA u. a.) ^[10-12]
Melarsoprol (MelB) (1949)		P2(TbAT1)-Adenin/Adenosin-Transporter ^[3,9]	unbekannt; bildet Komplexe mit Thiolen und Protein-thiolen ^[13]
Eflornithin (1990) (α -Difluormethylornithin)		wahrscheinlich Kombination von passiver und unterstützter Diffusion ^[3]	Suizidinhibitor der Ornithidecarboxylase ^[14]
<i>gegen Chagas-Krankheit</i>			
Nifurtimox (Lampit) (1970)		passive Diffusion	induziert erhöhten Sauerstoffverbrauch und führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid ^[15,16]
Benznidazol (Radanil) (1966)		nicht untersucht	Benznidazol-Metaboliten binden kovalent an Makromoleküle ^[17,18]

[a] LDL = Lipoprotein mit niedriger Dichte („low-density lipoprotein“).

Aufnahme der Arsenverbindungen in Parasiten und ihre Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke wurden kürzlich in einem Übersichtsartikel beschrieben.^[3] Trypanosomen, die

Arsenverbindungen exponiert werden, lysieren sehr rasch; der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist jedoch nicht bekannt.



Prof. Dr. R. Luise Krauth-Siegel studierte von 1972 bis 1979 in Heidelberg Chemie. Nach ihrer Promotion 1982 bei Heinz A. Staab am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung war sie am Institut für Biochemie II der Universität Heidelberg tätig, wo sie 1989 habilitierte. Nach einem Aufenthalt als Visiting Professor an der University of Michigan (1995) wurde sie Professorin und Gruppenleiterin am neu gegründeten Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg (BZH). Ihre aktuelle Forschung konzentriert sich auf die Enzyme des parasitenspezifischen Trypanothion-Metabolismus als Zielmoleküle für die Struktur- und Mechanismus-gestützte Wirkstoffentwicklung.



Dr. Holger Bauer studierte von 1994 bis 2000 Chemie in Karlsruhe. Er promovierte am Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg (BZH) über die Thioredoxinsysteme des Malariamoskitos und der Taubfliege. Während und nach seiner Promotion charakterisierte er bei V. Massey und C. H. Williams an der University of Michigan in Ann Arbor die Single-Turnover-Kinetik der Insekten-Thioredoxinreduktasen. Seit seiner Rückkehr an das BZH beschäftigt er sich mit der Entwicklung von Inhibitoren der Disulfidreduktasen.

Verbindungen des dreiwertigen Arsen bilden mit zahlreichen Proteinthiolen und anderen (Di)thiolen stabile Komplexe. In *T. brucei* ergeben beispielsweise Trypanothion, Dihydroliponsäure und Dihydroliponamid Addukte mit Melarsenoxid.^[21] Neben vielen anderen Enzymen inhibiert Melarsenoxid Trypanothionreduktase und Liponamiddehydrogenase irreversibel durch Wechselwirkung mit den vicinalen Cysteinen im aktiven Zentrum. Affinitätschromatographie an einem Melarsoprol-Analog ergab, dass aus einem *T. brucei*-Extrakt das Glycolyseenzym Glycerin-3-phosphatdehydrogenase spezifisch an die Säule bindet.^[13]

Eflornithin (DFMO, Tabelle 1), ursprünglich als Krebsmedikament entwickelt, ist der einzige aktuelle Wirkstoff gegen die Westafrikanische Schlafkrankheit. Es ist ein Suizidinhibitor der Ornithindecarboxylase, die in den meisten Organismen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Polyamin-Biosynthese katalysiert. Interessanterweise resultiert die Spezifität von DFMO gegen *T. brucei gambiense* ausschließlich aus der unterschiedlichen In-vivo-Halbwertszeit des Wirts- und Parasitenproteins.^[14,22] Während das Säugerenzym in Minuten umgesetzt wird, hat Ornithindecarboxylase aus *T. brucei gambiense* eine Halbwertszeit von über 18 h. Das Versagen von DFMO bei der Behandlung der Ostafrikanischen Schlafkrankheit ist auf die kürzere Halbwertszeit des Enzyms aus *T. brucei rhodesiense* und dessen höhere Basalaktivität im Vergleich zu *T. b. gambiense* zurückzuführen.^[23] Obwohl das Primärtarget klar definiert ist, ist die Kette zellpathologischer Ereignisse, die letztendlich zum cytostatischen Effekt von DFMO führt, noch nicht vollständig bekannt. Behandlung von *T. brucei* mit DFMO erhöht die intrazellulären Spiegel an Ornithin, S-Adenosylmethionin und decarboxyliertem S-Adenosylmethionin,^[24] während die Konzentrationen an Putrescin, Spermidin und schließlich auch an Trypanothion, dem parasitenspezifischen Bis(glutathionyl)spermidin, sinken (Abbildung 1a).^[25,26] Ferner bewirkt DFMO eine Arretierung des Zellzyklus.^[27]

Die beiden Medikamente gegen die Chagas-Krankheit sind die Nitroaromatene Nifurtimox und Benznidazol (siehe die Übersicht in Lit. [28]). In *T. cruzi* verursacht Nifurtimox einen erhöhten O₂-Verbrauch und die Freisetzung von Wasserstoffperoxid in das Kulturmedium.^[15] Die Reaktionssequenz beginnt mit einer Einelektronenreduktion der Nitrogruppe durch ein Flavoenzym unter Bildung des Radikalansions (nachgewiesen durch Elektronenspinresonanz, ESR).^[16]



Prof. Dr. R. Heiner Schirmer studierte Medizin und Philosophie in Heidelberg und Basel und erhielt 1966 den medizinischen Doktorgrad. Nach klinischer Tätigkeit in Stuttgart und Karlsruhe und einem Postdoc-Aufenthalt an der Dartmouth Medical School, New Hampshire, wurde er 1969 Gruppenleiter in der Abteilung Biophysik des Max-Planck-Instituts für Medizinische Forschung. Er habilitierte 1975 und wurde 1980 als Professor für Biochemie an die Universität Heidelberg berufen. Seit 1976 ist er Bicentennial Lecturer in Boston und Philadelphia. Im Jahre 2002 erhielt er den Dream Action Award des Niederländischen Chemiekonzerns DSM für seine Studien zur Biochemie und Chemotherapie der Malaria.

Die nachfolgende Reaktion mit molekularem Sauerstoff führt zu Superoxid-Anionen, die unter Dismutation Wasserstoffperoxid produzieren. Benznidazol in Konzentrationen, die das Wachstum von *T. cruzi* hemmen, erzeugt hingegen kein Superoxid und Wasserstoffperoxid,^[29] sondern wird zu Metaboliten biotransformiert, die kovalent an DNA, Lipide und Proteine des Parasiten binden.^[17,18]

Wahrscheinlich ist gerade der Mangel an Spezifität bei den alten Trypanosomen-Medikamenten der Hauptgrund für ihre lang andauernde Zuverlässigkeit und die relativ langsame Resistenzentwicklung. Dennoch sind heute bis zu 20% der behandelten Patienten resistent gegen Melarsoprol.^[19]

2. Neue Strategien zur Entwicklung antitrypanosomaler Wirkstoffe

Derzeit befinden sich nur sehr wenige Wirkstoffe gegen Trypanosomenerkrankungen in der klinischen Testung. Einer davon ist Megazol, ein 5-Nitroimidazol, das bereits 1968 synthetisiert, aber aufgrund eines positiven Ames-Tests zunächst verworfen wurde. Wenn man bedenkt, dass viele Krebsmedikamente trotz hoher Toxizität und Mutagenität zugelassen werden, erscheinen die Auflagen für Megazol bizarr; die medizinisch-ethischen Kriterien, die für eine arsenrefraktäre Schlafkrankheit gelten, sind denen einer schwer behandelbaren Krebserkrankung gleichzusetzen.^[19]

Seit sich die pharmazeutische Industrie de facto von allen Aktivitäten zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen Tropenkrankheiten zurückgezogen hat, beschränken sich fast alle Anstrengungen auf den öffentlichen Sektor. Ein Weg zu neuen antiparasitären Medikamenten ist nach wie vor die Aufklärung der Wirkprinzipien von Pflanzen, die traditionell gegen Parasiteninfektionen verwendet werden (siehe Übersicht in Lit. [30]). Ein weiterer Ansatz betrifft Medikamente, die bereits zur Behandlung anderer Erkrankungen zugelassen sind. Diese haben den Vorteil, dass sie schon einen großen Teil der sehr teuren klinischen Prüfungen hinter sich haben, die zur Markteinführung eines neuen Wirkstoffs zwingend sind. Als aktuelle Beispiele seien Aminobisphosphonate genannt, die zur Behandlung von Osteoporose und anderen Knochenerkrankungen eingesetzt werden,^[31,32] sowie Imidazol- und Triazol-Derivate, die als Antimykotika Verwendung finden.^[33,34]

Trypanosomen zweigten sehr früh vom gemeinsamen Stammbaum der Eukaryoten ab, sodass sich ihr zellbiologisches Repertoire in vielerlei Hinsicht von dem der Säugetiere unterscheidet. Folglich können parasitenspezifische Prozesse selektive Ziele für das Wirkstoffdesign bieten. Die Genomprojekte werden in naher Zukunft eine Vielzahl spezieseigener Stoffwechselwege eröffnen, wie das Beispiel von *P. falciparum* eindrucksvoll zeigt.^[35] Die entsprechenden Genomsequenzen von *Trypanosoma brucei* und *Leishmania major* sollen 2005 vorliegen.

Ein einfacher Unterschied zwischen Wirt und Parasit ist jedoch nicht ausreichend, um ein Enzym als Zielmolekül zu definieren. Ein wichtiger Schritt auf dem Wege der rationalen Entwicklung von Chemotherapeutika ist die Validierung der Zielstruktur. Die älteste Methode, um zu ermitteln, ob ein

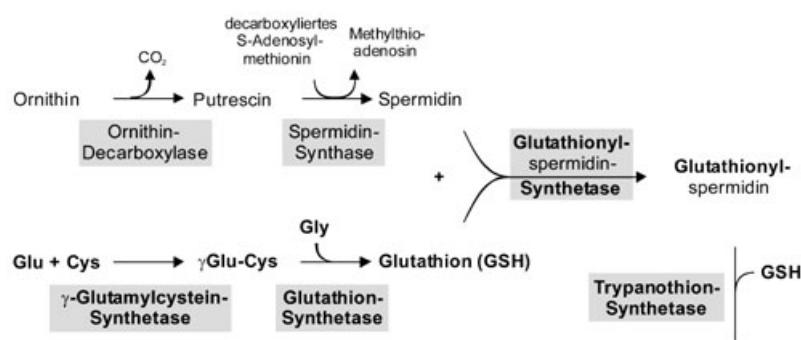
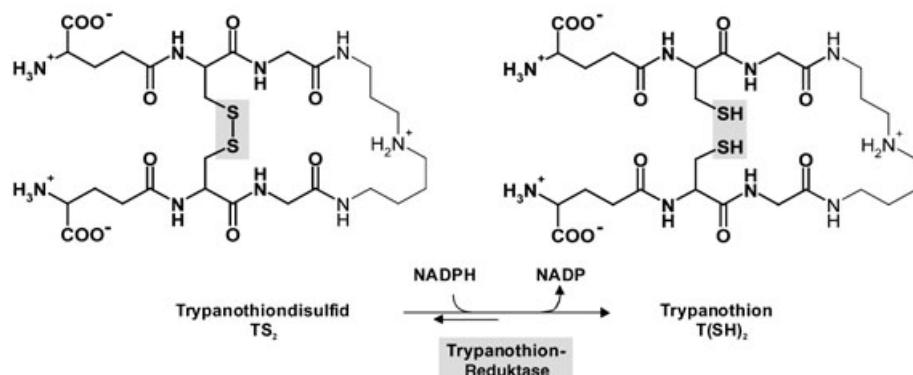
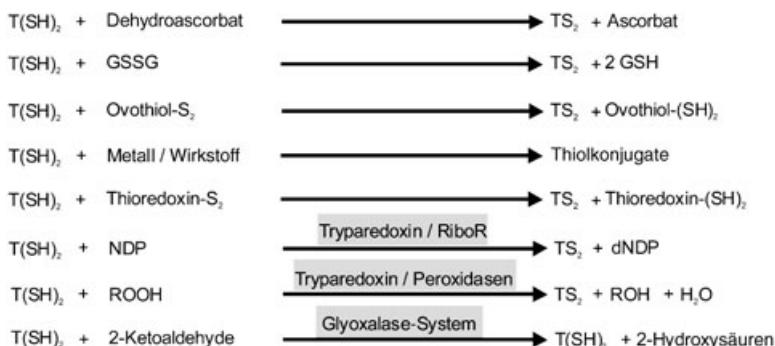
a) **Synthese von $T(SH)_2$**

 b) **Reduktion von TS_2**

 c) **Reaktionen mit Beteiligung von $T(SH)_2$**


Abbildung 1. Trypanothion-Stoffwechsel der Trypanosomatiden. a) Spermidin und Glutathion (fett), die beiden Bestandteile des Trypanothions ($T(SH)_2$), werden getrennt synthetisiert und dann zum Bis(glutathionyl)spermidin Trypanothion kondensiert. b) Trypanothion wird durch NADPH und das Flavoenzym Trypanothionreduktase in reduziertem Zustand gehalten. c) Trypanothion kann spontan Dehydroascorbat sowie die Disulfide von Glutathion, Ovothiol A und parasitarem Thioredoxin reduzieren. Es ist an der Synthese von DNA-Bausteinen beteiligt sowie an der Entgiftung von Metallen und Wirkstoffen, Hydroperoxiden, Peroxynitrit und Ketoaldehyden. Die Reaktionsfolge $T(SH)_2 + ONOO^- \rightarrow TS_2 + NO_2^- + H_2O$ verläuft analog zur Reduktion von Hydroperoxid. NDP = Nucleosiddiphosphat, dNDP = Desoxynucleosiddiphosphat, RiboR = Ribonucleotidreduktase.

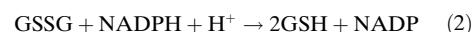
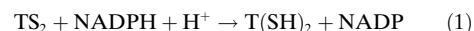
Enzym essentiell für einen Organismus ist, basiert auf dem Einsatz hochspezifischer Inhibitoren. Solche Wirkstoffe sind allerdings selten verfügbar, weshalb in der Regel gentechnische Methoden wie Gendeletion oder der spezifische Abbau einer bestimmten mRNA (durch RNA-Interferenz) zum Einsatz kommen.^[36,37] Selbst wenn ein Enzym gezeigt

wurde, dass es für den Parasiten essentiell ist, kann es nicht notwendigerweise als geeignetes Targetmolekül betrachtet werden. Im Falle eines hoch exprimierten Proteins ist es beispielsweise schwierig, die erforderlichen hohen Wirkstoffkonzentrationen eines reversiblen Inhibitoren in der Zelle zu erreichen und aufrechtzuerhalten. Ein anderer wichtiger Aspekt ist die Halbwertszeit des Zielenzymes, da die rasche De-novo-Synthese des Targetproteins den Effekt eines irreversiblen Inhibitoren aufheben würde.

3. Der thiolabhängige Redoxstoffwechsel von Trypanosomen

3.1. Vorkommen und Biosynthese des Trypanothions

Trypanosomatiden unterscheiden sich von nahezu allen anderen Eukaryoten und Prokaryoten durch ihren spezifischen Redoxstoffwechsel, der auf dem Thiol-Polyamin-Konjugat Trypanothion und dem Flavoenzym Trypanothionreduktase basiert (Abbildung 1 und 2).^[38] Das Trypanothion-System [Gl. (1)] ersetzt in diesen Parasiten nicht nur das Glutathion/Glutathionreduktase-Paar [Gl. (2)], sondern wahrscheinlich auch die Funktion der Thioredoxinreduktase (Abbildung 2 b).^[39]



Nicht zu den Kinetoplastida gehörende Organismen, die über einen Trypanothion-Stoffwechsel verfügen, sind *Entamoeba histolytica*, der Erreger der Amöben-Ruhr (GenBank acc. AF503571),^[40] und *Euglena gracilis*, dem offenbar sowohl Trypanothionreduktase als auch Glutathionreduktase zur Verfügung stehen.^[41]

Trypanothion wird durch Konjugation des Polyamins Spermidin mit dem Tripeptid Glutathion synthetisiert (Abbildung 1 a). Der erste Schritt der Glutathion-Biosynthese wird durch γ -Glutamylcystein-Synthetase katalysiert, ein für *T. brucei* essentielles Enzym.^[42] Das entstandene γ -Glutamylcystein wird dann mit Glycin zu Glutathion verknüpft. Die hierfür benötigte Glutathion-Synthetase ist bis jetzt bei noch keinem Trypanosomatiden charakterisiert

worden, es findet sich aber ein mutmaßliches Gen auf Chromosom 14 bei *L. major* (Acc. AL356246). Für Spermidin gibt es bei Trypanosomatiden keinen einheitlichen Syntheseweg. Epimastigote *T. cruzi*-Zellen sind unfähig, Putrescin de-

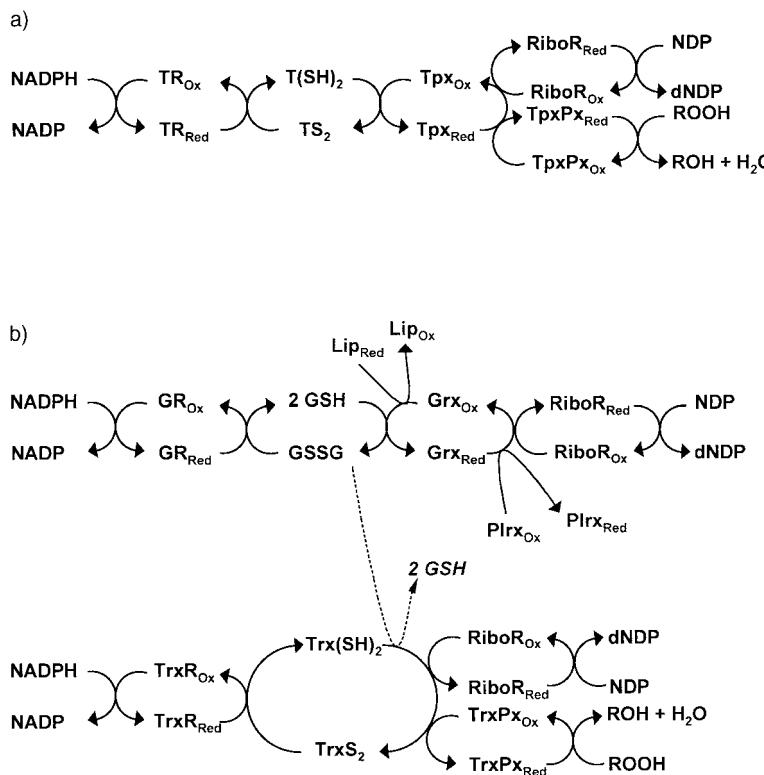


Abbildung 2. Dithiolgestützte Redoxsysteme in Trypanosomen und Plasmodien. a) In Trypanosomen überträgt eine Kaskade aus Trypanothionreduktase (TR), Trypanothion ($T(SH)_2$) und Tryparedoxin (Tpx) Elektronen vom NADPH auf Ribonukleotidreduktase (RiboR), die die Reduktion von Nucleosiddiphosphaten (NDP) zu Desoxy-nucleosiddiphosphaten (dNDP) katalysiert, sowie auf Tryparedoxinperoxidases (TpxPx), die Hydroperoxide entgiften. b) In *P. falciparum* kommen zwei Systeme vor: Das Glutathion-System, bestehend aus Glutathionreduktase (GR), Glutathion (GSH) und Glutaredoxin (Grx), überträgt Elektronen auf die Ribonukleotidreduktase entweder auf direktem Weg oder mithilfe von Plasmoredoxin (Plrx). Glutaredoxin kann auch durch Liponamid (Lip) reduziert werden. Das zweite System setzt sich aus Thioredoxinreduktase (TrxR) und Thioredoxin (Trx) zusammen. Es liefert Reduktionsäquivalente für die Synthese von DNA-Bausteinen und ist Elektronendonator für Trx-abhängige Peroxidasen (TrxPx). Die beiden Systeme sind in Kontakt, da Glutathiondisulfid (GSSG) durch Thioredoxin reduziert werden kann (gestrichelte Linie). Alle drei Dithiolproteine (Glutaredoxin, Plasmoredoxin und Thioredoxin) können als Thioltransferasen fungieren, die Proteine vom oxidierten in den reduzierten Zustand überführen. Das tiefgestellte „Ox“ kennzeichnet die Disulfidform, das tiefgestellte „Red“ die Dithiolform eines Proteins.

novo zu bilden, sie nehmen Polyamine aus dem Medium auf und können diese zu Spermidin umwandeln.^[43,44] Es darf als sehr wahrscheinlich angenommen werden, dass dies auch für die Säuger-Stadien des Parasiten zutrifft. Die intrazellulären Amastigoten von *T. cruzi* vermehren sich im Cytosol der Wirtszelle und sollten somit unmittelbaren Zugriff auf Polyamine haben. Im Unterschied dazu synthetisieren die extrazellulär lebenden Afrikanischen Trypanosomen das Spermidin endogen aus Ornithin (Abbildung 1a).

Die Biosynthese des Trypanothions beginnt mit der Bildung von Monoglutathionylspermidin, das anschließend mit einem zweiten Glutathionmolekül zu Trypanothion reagiert. Wie in Abbildung 1a dargestellt, werden im Insekten-parasiten *Critidia fasciculata* die beiden aufeinander folgenden Schritte durch unterschiedliche Synthetasen kataly-

siert.^[45] In *T. brucei* und in *T. cruzi* ist hingegen ein einziges Polypeptid für beide ATP-abhängigen Reaktionen zuständig.^[46,47] Die *T. cruzi*-Synthetase akzeptiert auch andere Polyamine als Substrate, was unter Bedingungen einer limitierenden Versorgung mit Spermidin von Bedeutung sein kann.^[47,48]

3.2. Vergleich von Trypanothion und Glutathion

Trypanothion ist auch in Abwesenheit von Enzymkatalysatoren ein effizientes Reduktionsmittel für Dehydroascorbat, Glutathiondisulfid und die Disulfidform von Ovothiol A (Abbildung 1c). (Dieses Mercaptohistidin, das bei verschiedenen Trypanosomatiden vorkommt,^[49-51] ist ein effektiver Radikalfänger und katalysiert zudem den Abbau von cytotoxischen Nitrosothiolen wie Nitrosoglutathion (GSNO) und Bis(nitroso)trypanothion ($[T(SNO)_2]$).^[52] Das Redoxpotential von Trypanothion (-242 mV)^[53] ist dem von Glutathion ähnlich und kommt demnach nicht als Ursache für die höhere Reaktivität von Trypanothion infrage. Ein wesentlicher Unterschied ist hingegen, dass Trypanothion ein Dithiol ist und daher als Reduktionspartner von Disulfiden kinetisch bevorzugt ist.^[54] Ein weiterer Unterschied betrifft die pK_s -Werte. Die Thiolgruppen des Trypanothions haben niedrige pK_s -Werte von 7.4,^[55] was offensichtlich der positiv geladenen Aminogruppe in der Spermidinbrücke zuzuschreiben ist. Hingegen liegt der pK_s -Wert des Glutathions im Bereich von 8.7 bis 9.2. Der für Trypanothion bestimmte pK_s -Wert fällt mit dem intrazellulären pH-Wert der Parasiten zusammen.^[56] Dies trägt mit Sicherheit zur Reaktivität bei, da die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung für Dithiol-Disulfid-Austausche ein Optimum erreichen, wenn der pK_s -Wert der beteiligten Thiole dem pH-Wert der umgebenden Lösung entspricht.^[54]

Trypanothionabhängige Reduktionen werden in Gegenwart von Tryparedoxin, einem kleinen parasitenspezifischen Dithiolprotein, stark beschleunigt. Das Trypanothion/Tryparedoxin-Paar spielt eine zentrale Rolle in den parasitenspezifischen Kaskaden, die die Reduktion von Hydroperoxiden^[57-59] und Ribonukleotiden^[60] katalysieren (Abbildung 2a). Darauf hinaus ist Trypanothion wahrscheinlich das physiologische Reduktionsmittel des Thioredoxindisulfids. Eine spezifische Thioredoxinreduktase, wie sie bei allen anderen bekannten Organismen vorkommt (Abbildung 1c), wurde bei Kinetoplastida bisher nicht nachgewiesen.^[39]

3.3. Trypanothion und Medikamentenresistenz

Das Ausschleusen oder die Sequestrierung von Wirkstoff-Thiol-Konjugaten ist ein wichtiger Mechanismus der Medi-

kamentenresistenz. So ist bei Leishmanien, die gegen Verbindungen mit dreiwertigem Arsen oder Antimon resistent sind, häufig das PGPA-Gen (P-Glycoprotein-ähnliches Protein A) amplifiziert.^[61,62] Dieser ATP-abhängige Transporter (ABC, „ATP-binding cassette“) kann bei anderen Organismen Arsenit-Glutathion-Konjugate durch die Zellmembran translozieren.^[63] Da Trypanothion in *L. tarentolae* Addukte mit Arsenit und Antimonit bildet,^[64,65] gilt es als wahrscheinlich, dass diese Addukte durch PGPA transportiert werden. In den Blutstromformen von *T. brucei* führt die Überexpression eines Transporters („multidrug resistance-associated protein A“), der zum PGPA aus *L. tarentolae* eng verwandt ist, zu einem 10fachen Anstieg des IC₅₀-Wertes für Melarsoprol.^[66]

3.4. Trypanothionabhängige Entgiftung von Hydroperoxiden

Trypanosomen tolerieren nur niedrige Hydroperoxidspiegel,^[67] wahrscheinlich, weil sie ohne die Enzyme Katalase und Selenocystein-haltige Glutathionperoxidase auskommen müssen. Bislang wurden drei Klassen von Peroxidasen in Trypanosomatiden charakterisiert, und in jedem Fall ist Trypanothion das elektronenliefernde Substrat für die Peroxidreduktion. Vertreter der ersten Klasse ist ein 2-Cys-Peroxiredoxin-ähnliches Enzym (Abbildung 2a).^[57,59,68] Die Mitglieder der zweiten Klasse sind strukturell den Glutathionperoxidasesen verwandt, enthalten jedoch anstelle des Selenocysteins ein katalytisches Cystein.^[69,70] Sie zeigen sehr geringe Aktivität mit Glutathion als reduzierendem Substrat, hingegen hohe Aktivität mit dem Trypanothion/Tryparedoxin-System.^[70] Beide Peroxidasetypen – das cytosolische Peroxiredoxin-ähnliche Enzym und die mit Glutathionperoxidase verwandten Enzyme – scheinen für das Überleben von *T. brucei* essentiell zu sein.^[71] Eine dritte Klasse von Peroxidasen bildet ein von Ascorbat abhängiges Häm-Protein, das sich im endoplasmatischen Reticulum von *T. cruzi* findet und das in ähnlicher Form auch in Pflanzen vorkommt.^[72] Das bei der Reaktion gebildete Dehydroascorbat wird anschließend durch Trypanothion reduziert (Abbildung 1c). Keine der beschriebenen trypanosomalen Peroxidasen reicht im Hinblick auf katalytische Effizienz an die klassischen Selenocystein-haltigen Glutathionperoxidasesen heran. Dieses Defizit wird zumindest zum Teil durch die hohe zelluläre Konzentration dieser Enzyme kompensiert.^[59] Eine Erklärung für die geringe katalytische Wirkung gegen das Substrat H₂O₂ könnte sein, dass die Enzyme zusätzliche physiologische Funktionen haben und deshalb nicht als Peroxidasen perfektioniert sind.^[73]

3.5. Trypanothionabhängige Reduktionen von Peroxynitrit

Peroxynitrit (ONOO[–]), das Reaktionsprodukt aus dem Superoxidradikal und Stickstoffmonoxid, ist nicht nur ein Tyrosin nitrierendes Agens, sondern auch ein starkes Oxidationsmittel, das maßgeblich zur Kompetenz humaner Makrophagen und anderer Zellen des Immunsystems gegen Pathogene beiträgt. Behandlung von *T. cruzi*-Zellen mit Peroxyni-

trit führt zu einer raschen Oxidation von Trypanothion zu Trypanothiondisulfid.^[74] Im Unterschied dazu bildet Glutathion, das in *T. cruzi* in weit niedrigerer Konzentration als Trypanothion vorliegt, bei Peroxynitrit-Exposition bevorzugt gemischte Disulfide mit proteineigenen Cysteinen.

Peroxynitrit kann T(SH)₂ direkt oxidiert, T(SH)₂ kann aber auch sekundär in Reaktionen zwischen Peroxynitrit mit Tryparedoxinperoxidase und Tryparedoxin verbraucht werden (Abbildungen 1c und 2a). Ferner können durch Peroxynitrit generierte Carbonat- und Stickstoffdioxidradikale Einelektronenoxidationen vermitteln. Im Falle von T(SH)₂ wird das Thiylradikal zu einem intermediären Disulfidradikal und letztendlich zum Disulfid oxidiert. Im Falle von Glutathion kann das Thiylradikal entweder mit Proteinthiolen (PSH) gemischte Disulfide (PSSG) bilden (siehe Tabelle 3 in Abschnitt 6), oder es reagiert mit molekularem Sauerstoff und geht dabei in höhere Oxidationsstufen des Schwefels über. Diese Befunde untermauern, dass T(SH)₂ und trypanothionabhängige antioxidative Systeme eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung von Peroxynitrit innehaben und so das Überleben der Trypanosomen in dem von Makrophagen generierten oxidierenden Mikromilieu erleichtern.^[74]

3.6. Entgiftung von Ketoaldehyden

Das ubiquitäre Glyoxalase-System mit den Enzymen Glyoxalase I und II katalysiert die glutathionabhängige Dismutation von α -Ketoaldehyden zu den entsprechenden α -Hydroxysäuren. Das wichtigste physiologische Substrat ist Methylglyoxal, das als unvermeidliches Nebenprodukt der Glycolyse gebildet wird. *T. brucei* enthält eine Glyoxalase II, die eine hohe Präferenz für Trypanothionthioester gegenüber Glutathionthioestern als Substraten zeigt (Abbildung 1c).^[75] Folglich wird bei Trypanosomatiden Glutathion auch beim Glyoxalase-System durch Trypanothion ersetzt.

4. Enzyme des Trypanothion-Metabolismus als potenzielle Zielmoleküle

Die Empfindlichkeit von Trypanosomatiden gegen oxidative Stress sowie das Fehlen von Trypanothion im Säugervirt machen die Enzyme des Trypanothion-Metabolismus zu attraktiven Zielmolekülen für das Wirkstoffdesign.^[2,76–79] Der erste Hinweis, dass Störungen des Redoxmetabolismus in Trypanosomen für die Medikamentenentwicklung genutzt werden können, ergab sich aus Untersuchungen mit Buthioninsulfoximin (BSO), einem Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase (Abbildung 1a). BSO heilt mit *T. brucei* infizierte Mäuse^[80] und verringert die Infektiosität von *L.-donovani*-Amastigoten.^[81] Wie bereits beschrieben, ist Difluormethylornithin (DFMO, Tabelle 1) ein Suizidinhibitor der Ornithin-decarboxylase und senkt die zelluläre Konzentration von Trypanothion.

Von den an der Trypanothionsynthese beteiligten Enzymen könnten sich Glutathionylperoxidase und Trypanothion-Synthetase als attraktive Zielmoleküle der Wirkstoffentwicklung erweisen, da sie beim Menschen und

anderen Säugern nicht vorkommen. Wie oben beschrieben (Abbildung 1a), katalysiert in *T. cruzi* und *T. brucei* ein einzelnes Polypeptid beide Syntheseschritte.^[46,47,82] Bisher wurden für Inhibitorstudien die Glutathionylspermidin-Synthetasen (GspS) von *E. coli* und *C. fasciculata* herangezogen. Ein Phosphinat-Substratanalog erwies sich als effizienter, extrem langsam abdissoziierender Inhibitor des *E. coli*-Enzyms mit einem K_i -Wert von 3.2 μM und einem K_i^* -Wert von 7.8 nM.^[83] Derivate des Peptids γ -Glu-Leu-X (mit X als nucleophiler Gruppe) sind Mischtyp-Inhibitoren der Glutathionylspermidin-Synthetase von *C. fasciculata*, wobei die effizientesten Verbindungen K_i - und K_i^* -Werte im unteren mikromolaren Bereich haben.^[84] Der Umstand, dass die Synthese von Trypanothion bei Trypanosomen und *C. fasciculata* nicht identisch ist, wirft jedoch die Frage auf, ob die Crithidien-Enzyme geeignete Modelle für das Wirkstoffdesign sind.

4.1. Inhibitoren der Trypanothionreduktase

Trypanothionreduktase ist das am intensivsten untersuchte Enzym des Trypanothion-Redoxmetabolismus. Es ist das Schlüsselenzym in der antioxidativen Abwehr der Parasiten,

es kommt im Säugerwirt nicht vor, und es ist für alle bislang charakterisierten Trypanosomatiden essentiell (zur Übersicht siehe Lit. [85]). Trypanothionreduktase gehört zur Familie der FAD-abhängigen Disulfidreduktasen, die u.a. Glutathionreduktase, Liponamiddehydrogenase und Thioredoxinreduktase einschließt (Abbildung 3).^[86] Der katalytische Mechanismus der Trypanothionreduktase entspricht in fast allen Teilschritten dem der Glutathionreduktase (Abbildung 2 und 3 sowie Abschnitt 7.3).^[87,88] Der Hauptunterschied zwischen den beiden Disulfidreduktasen besteht in ihrer Spezifität für ihr jeweiliges Disulfid-Substrat. Darüber hinaus ist die Disulfid-Bindungsstelle der Trypanothionreduktase mit Abmessungen von $22 \times 20 \times 28 \text{ \AA}^3$ wesentlich geräumiger als die der Glutathionreduktase. Die dreidimensionale Struktur der Trypanothionreduktase ist in freier Form^[92–94] sowie als binärer Komplex mit NADPH,^[94] Glutathionylspermidin,^[95] Trypanothion^[96] und dem kompetitiven Inhibitor Mepacrin^[91] bekannt (Abbildung 4, Tabelle 2).

Während der letzten 15 Jahre hatten zahlreiche Studien zum Ziel, Inhibitoren der Trypanothionreduktase als Leitstrukturen für antiparasitäre Wirkstoffe zu entwickeln (Übersichten in Lit. [76,85,116–118]). Die meisten Ansätze konzentrierten sich dabei auf Verbindungen, die das Parasiten-enzym hemmen, nicht aber die Human-Glutathionreduktase

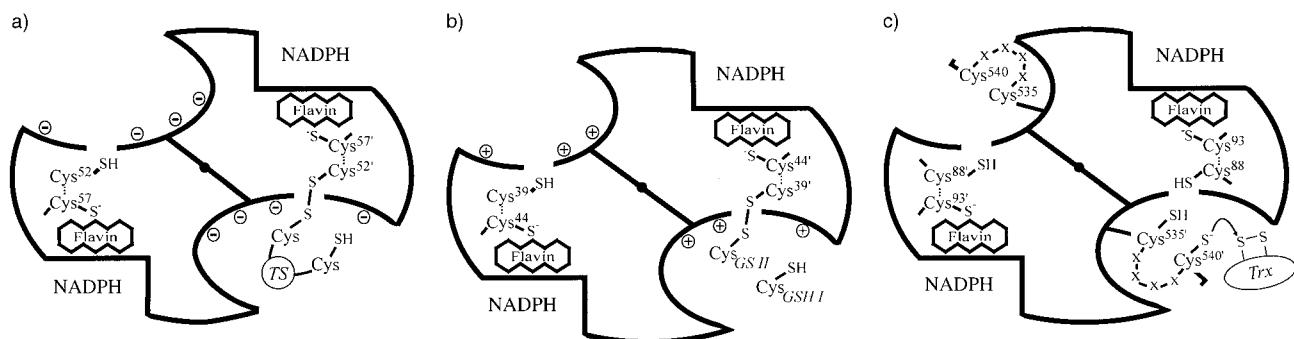


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Trypanothionreduktase aus *T. cruzi* sowie der Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase aus *P. falciparum*. Jedes dieser homodimeren Enzyme hat zwei identische aktive Zentren. Die Kontaktfläche zwischen den beiden Monomeren ist als diagonale Linie mit einem ausgefüllten Kreis im Zentrum dargestellt, der die zweizählige Symmetriechse kennzeichnet. In einer der beiden Untereinheiten sind die Reste mit gestrichenen Ziffern nummeriert. a) In Trypanothionreduktase fließen die Elektronen vom NADPH über den Flavirring zum redoxaktiven Disulfid Cys 57/Cys 52. In der gebildeten Dithiolform interagiert das Thiolat 57 mit dem Flavin; Cys 52 hingegen greift die Disulfidbrücke des Trypanothiondisulfids unter Bildung eines gemischten Disulfids zwischen Enzym und Substrat an. Dieses wird dann von Cys 57 attackiert, und unter Wiederherstellung der intramolekularen Disulfidbrücke wird das Produkt, reduziertes Trypanothion, freigesetzt. Trypanothionreduktase akzeptiert nur positiv geladene Glutathionylspermidin-Konjugate als Substrate, wogegen Glutathionreduktasen für Glutathiondisulfid spezifisch sind, dessen Nettoladung -2 beträgt. Diese Spezifität ist hauptsächlich dem Austausch von fünf Resten zuzuschreiben, die das aktive Zentrum des Trypanosomenenzym im Vergleich zur GSSG-Bindungsstelle in der Glutathionreduktase hydrophober und zugleich negativ geladen machen (Abbildung 3a,b und 4).^[90] Außerdem ist das aktive Zentrum der Trypanothionreduktase geräumiger als das der Glutathionreduktase. Weder Trypanothionreduktase in *T. cruzi* noch Glutathionreduktase in *P. falciparum* haben ein weiteres C-terminales Redoxzentrum, wie es bei Thioredoxinreduktase in *P. falciparum* der Fall ist (Abbildung 3c). Vielmehr werden ihre Disulfidsubstrate an einer Position gebunden, die der Subregion um Cys 535' und Cys 540' bei Thioredoxinreduktase entspricht. b) In Glutathionreduktase fließen die Elektronen vom NADPH zum Flavin und von dort zur Disulfidbrücke zwischen Cys 44 und Cys 39. Das entstehende Dithiol besteht aus dem mit dem Flavin interagierenden Thiolat 44 und dem Austausch-Thiol 39, das das Substrat GSSG angreift. Dies führt zur Freisetzung eines GSH-Moleküls, während das zweite Glutathion als gemischtes Disulfid an Cys 39 gebunden bleibt. Dieses Intermediat, das glutathionlierte Enzym, ist hier dargestellt. Im abschließenden Schritt des katalytischen Zyklus wird die Disulfidbrücke des aktiven Zentrums (Cys 39/Cys 44) wieder geschlossen und das zweite GSH freigesetzt. c) In der Thioredoxinreduktase liegen im Ausgangszustand die vier katalytisch aktiven Cysteine in Form von zwei Disulfiden vor. Nach Bindung von NADPH fließen Elektronen über das Flavin zum Disulfid Cys 93/Cys 88. Die dabei entstehenden Thiole reduzieren das Disulfid zwischen Cys 535' und Cys 540', und von dort gelangen die Reduktionsäquivalente zur Disulfidbrücke des Substrats Thioredoxin. Die Abbildung zeigt das gemischte Disulfid zwischen Enzym und Substrat. In diesem Stadium kann ein zweites NADPH das Disulfid Cys 93/Cys 88 reduzieren. Ein nucleophiler Angriff von Cys 535' auf das gemischte Disulfid führt zur Freisetzung des Produkts Trx(SH)₂ und zur Wiederherstellung der Disulfidbrücke zwischen den C-terminalen Cysteinen 535' und 540'. In allen nachfolgenden katalytischen Zyklen wird nur noch ein NADPH oxidiert.^[89,152]

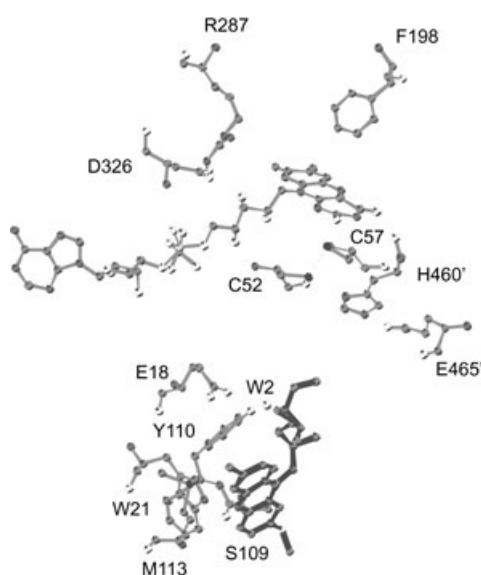


Abbildung 4. Bindung des Inhibitors Mepacrin im aktiven Zentrum der Trypanothionreduktase in *T. cruzi*. Der Flavinring des FAD bildet den Mittelpunkt des aktiven Zentrums. Die gestrichelte Linie markiert das redoxaktive Dithiol/Disulfid. Die Reste His 460' und Glu 465' werden von der zweiten Untereinheit des homodimeren Enzyms beigesteuert. Mepacrin (fette Linien) bindet mit seinem Acridinring dicht an die von Trp 21 und Met 113 gebildete hydrophobe Wand, während die Alkylamino-kette, vermittelt über ein Wassermolekül W2, an Glu 18 fixiert ist. Die fünf Aminosäurereste der Trypanothion-Bindungsstelle, die sich in Trypanothionreduktase und Glutathionreduktase unterscheiden, sind Glu 18 (Ala 34 in Human-Glutathionreduktase), Trp 21 (Arg 37), Ser 109 (Ile 113), Met 113 (Asn 117) und Ala 342 (Arg 347).^[91]

als das nächstverwandte Wirtsenzym. Begrenzender Faktor beim Hochdurchsatz-Screening nach möglichen Inhibitoren der Trypanothionreduktase war bisher der hohe Preis des Trypanothiondisulfids. Ein vor kurzem entwickelter Assay, der DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoësäure) zur Aufrechterhaltung einer konstanten Disulfid-Substratkonzentration enthält, sollte nunmehr kinetische Studien bei Trypanothion-Konzentrationen um 1 μM ermöglichen.^[119]

4.1.1. Polyamine als Inhibitoren

Die meisten der bisher untersuchten Hemmstoffe der Trypanothionreduktase sind reversible Liganden (Tabelle 2). Kukoamin A, ein natürlich vorkommendes Sperminderivat aus der Wurzelrinde von *Lycium chinense*, ist ein Mischtyp-Inhibitor des Parasitenenzymes.^[97] Mehrere von Spermin und Spermidin abgeleitete Verbindungen wurden synthetisiert. In vielen Fällen waren die Sperminderivate signifikant wirksamer als die entsprechenden Spermidine, dabei erhielt man hochaffine Liganden mit K_i -Werten im submikromolaren Bereich.^[105] Das Screening einer Bibliothek von Spermidin-Peptid-Konjugaten lieferte einige hoch wirksame nichtkompetitive Inhibitoren. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen von *N*-(3-Phenylpropyl)-substituierten Sperminen und Spermidinen lieferten *N*¹,*N*¹,*N*⁴,*N*⁸,*N*¹²-Penta(3-phenylpropyl)spermin (Tabelle 2) als den effektivsten kompetitiven Inhibitor der Trypanothionreduktase aus *T. cruzi*.^[99] Die Verbindungen

dieser Serie waren stark trypanozid, ließen aber keine klare Korrelation zwischen Enzyminhibition und antiparasitärer Aktivität erkennen.

4.1.2. Tricyclische Verbindungen

Das Acridinderivat Mepacrin (Chinacrin) (Tabelle 2 und Abbildung 4) wirkt stark trypanozid gegen *T. cruzi* und kann z. B. die Übertragung der Chagas-Krankheit durch Bluttransfusionen verhindern.^[120] Mepacrin war die erste tricyclische Verbindung, die als kompetitiver Inhibitor der Trypanothionreduktase in *T. cruzi* identifiziert wurde, die Human-Glutathionreduktase aber nicht hemmt.^[100] Der Acridinring wird im aktiven Zentrum nahe der aus Trp 21 und Met 113 gebildeten hydrophoben Wand gebunden, wobei die Alkylamino-Seitenkette in Richtung von Glu 18 zeigt. Spezifische Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen des Wirkstoffs und dem Enzym betreffen jene Aminosäuren, die in humaner Glutathionreduktase nicht konserviert sind (Abbildung 4).^[91] Detaillierte kinetische Analysen ergaben, dass Trypanothionreduktase mehr als ein Molekül des kompetitiv inhibierenden 9-Aminoacridins gleichzeitig binden kann. Im Unterschied dazu wirken strukturell verwandte 9-Thioacridine als Mischtyp-Inhibitoren.^[100] Sulfonamid- und Harnstoffderivate des Mepacrins mit einer aromatischen Gruppe in der N9-Seitenkette hemmen das Enzym mit 10fach niedrigeren IC_{50} -Werten als Mepacrin und sind gegen Zellkulturen von *L. donovani* und *T. brucei* aktiv.^[121]

Phenothiazine, Imipramin und andere tricyclische Antidepressiva sind ebenfalls kompetitive Inhibitoren der Trypanothionreduktase mit Hemmkonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich.^[101] Die Verbindungen wurden in das aktive Zentrum der Trypanothionreduktase modelliert, wobei sich der Ring an die hydrophobe Wand aus Trp 21 und Met 113 schmiegt und die Aminopropylkette in Richtung von Glu 465' und Glu 466' zeigt, die von der anderen Untereinheit des Proteins beigesteuert werden. Eine zweite hydrophobe Region, die von Phe 395', Pro 397' und Leu 398' gebildet wird und Z-Zentrum genannt wird, soll ebenfalls in der Lage sein, hydrophobe Liganden zu binden.^[102,122] Die auffälligste Diskrepanz zwischen den theoretischen Bindungsstudien („docking studies“) mit tricyclischen Antidepressiva und der kristallographischen Analyse des Trypanothionreduktase-Mepacrin-Konjugats betrifft die Bindungsart der Aminoalkyl-Seitenkette der Inhibitoren. Nur der „Rigid-Body-Docking“-Ansatz von Horvath (1997)^[123] beinhaltet eine mögliche Wechselwirkung mit Glu 18, wie sie im Komplex der Trypanothionreduktase mit Mepacrin beobachtet wurde. Da Glu 465' und Glu 466' – anders als Glu 18 – in der Glutathionreduktase des Wirts konserviert sind, ist es nicht klar, wie eine Wechselwirkung mit diesen Resten zur selektiven Bindung der negativ geladenen Liganden beim Parasitenenzym beiträgt. Die Entdeckung, dass 9-Aminoacridine kompetitive Hemmstoffe sind, bei denen mehr als ein Inhibitormolekül gleichzeitig an das Enzym binden kann, lässt den Schluss zu, dass beide Bindungszentren besetzt sein könnten.^[100] Eine andere Möglichkeit ist, dass als zweite Bindungsstelle die Höhle an der zweizähligen Achse des homodimeren Proteins fungiert. Die Bindung von Dinitrophenylglutathion in Gluta-

Tabelle 2: Inhibitoren der Trypanothionreduktase als Leitstrukturen für die Entwicklung antiparasitärer Wirkstoffe.

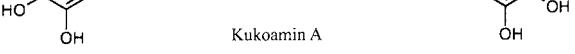
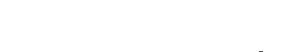
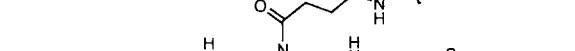
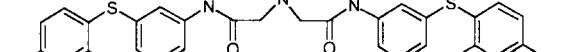
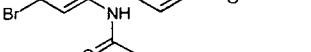
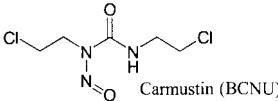
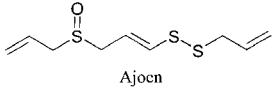
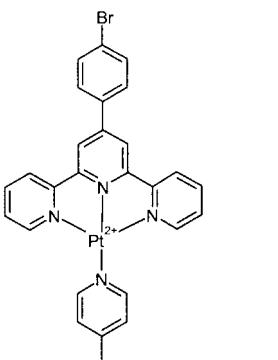
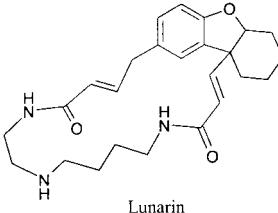
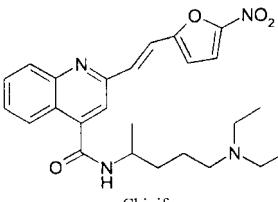
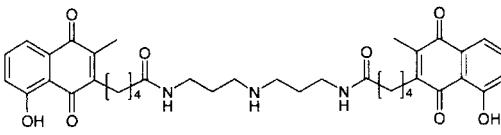
Inhibitortyp	Beispiele	Wirkmechanismus
reversible Inhibitoren		kompetitive, nichtkompetitive, unkompetitive und Mischtyp-Inhibition
Polyamine	 Kukoamin A	Mischtyp, $K_i = 1.8 \mu\text{M}$, $K'_i = 13 \mu\text{M}$ ^[97]
	H-Trp-Arg-Spermidin-Arg(Pmc)-Trp-H	nichtkompetitiv, $K_i = 100 \text{ nM}$ ^[98]
	 $N^1,N^1,N^1,N^1,N^1,N^{12}$ -Penta-(3-phenylpropyl)spermin	kompetitiv, $K_i = 151 \text{ nM}$ ^[99]
tricyclische Verbindungen	 Mepacrin	Mepacrin und andere 9-Aminoacridine wirken kompetitiv ($K_i = 5\text{--}45 \mu\text{M}$), wobei mehr als ein Inhibitormolekül gleichzeitig binden kann; 9-Thioacridine sind Mischtyp-Inhibitoren, $K_i = 21\text{--}37 \mu\text{M}$, $K'_i = 67\text{--}83 \mu\text{M}$ ^[91,100]
	 	kompetitiv, $K_i = 120 \text{ nM}$ ^[101,102] andere Phenothiazine sind kompetitive Inhibitoren mit K_i -Werten im unteren mikromolaren Bereich ^[101,102]
	 	Mischtyp, $IC_{50} = 200 \text{ nM}$ ^[103,104] andere Aminodiphenylsulfide (offene Phenothiazine) sind Mischtyp- oder kompetitive Inhibitoren ($IC_{50} = 0.3\text{--}3 \mu\text{M}$) ^[103\text{--}105]
	 Cepharanthin	Mischtyp, $K_i = 7.6 \mu\text{M}$, $K'_i = 51.6 \mu\text{M}$ ^[30]

Tabelle 2: (Fortsetzung)

Inhibitortyp	Beispiele	Wirkmechanismus
irreversible Inhibitoren		zeitabhängige Inaktivierung des reduzierten Enzyms
		Carbamoylierung von Cys 52 ^[106,107]
		Modifikation von Cys 52 ^[108]
		wahrscheinlich Bindung an Cys 52 nach Austausch des vierten Liganden ^[109]
		$K_i = 144 \mu\text{M}$; $k_{\text{inact}} = 0.116 \text{ min}^{-1}$ ^[96,110]
subversive Substrate („Turncoat-Inhibitoren“)		inhibieren die physiologische Reduktion des Trypanothionidisulfids und fungieren selbst als Substrat, das NADPH-abhängig reduziert wird
		nichtkompetitiv, $K_i = 4.5 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 3 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_m = 3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[111] Nitrofurane werden durch das Enzym zum Nitroanionradikal reduziert, das mit molekularem Sauerstoff unter Superoxid-Bildung reagiert, wobei das Nitrofuran regeneriert wird ^[111-114]
		$IC_{50} = 450 \text{ nM}$, $K_m = 28 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[115] Naphthochinone werden zum Semichinonradikal reduziert, das mit O_2 unter Rückbildung des Chinons Superoxid-Radikale erzeugt ^[112,113,115]

thionreduktase-Kristallen dient hierfür als Beispiel. Das Substratanalogon mit einer den 9-Aminoacridinen sehr ähnlichen Inhibitionsskinetik verursacht eine Zunahme der Elektronendichte an der GSSG-Bindungsstelle, aber auch einen gewissen Elektronendichteanstieg an der zweizähligen Achse.^[124]

Substituierte Benzyl[3-(2-chlorphenothiazin-10-yl)propyl]dimethylammoniumsalze (Tabelle 2) wurden synthetisiert, um eine permanente positive Ladung in Inhibitormoleküle einzuführen. Die quaternären Arylalkylammonium-

chlorpromazine waren kompetitive Inhibitoren gegen Trypanothionidisulfid. Der stärkste Hemmstoff dieser Serie hatte einen K_i -Wert von 120 nM, was 100fach niedriger ist als der von Chlorpromazin.^[102]

4.1.3. Aminodiphenylsulfide

Durch Öffnung des zentralen Ringes von Phenothiazinen wurden 2-Aminodiphenylsulfide erhalten, die beinahe genauso wirksame Inhibitoren wie ihre konformativ fixierten

Ausgangsverbindungen sind. Die Verbrückung zweier 2-Aminodiphenylsulfide mit einer Spermin-Brücke führte zu einem kompetitiven Inhibitor mit einem K_i -Wert von 400 nm.^[105] Bei Bis(2-aminodiphenylsulfiden) mit einer sekundären Aminogruppe in der Brücke konnte eine dritte ausladende Seitenkette eingeführt werden.^[104] Das wirksamste Derivat hatte einen IC_{50} -Wert von 200 nm in Gegenwart von 57 μ M Trypanothiondisulfid (Tabelle 2). Die weitere Zunahme der Bindungsstärke macht deutlich, dass das aktive Zentrum von Trypanothionreduktase auch extrem sperrige Liganden mühelos aufnehmen kann.

4.1.4. Irreversible Inhibitoren

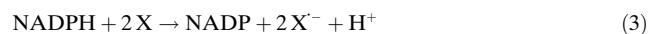
Kovalente Inhibitoren haben den Vorteil, dass Substratakkumulation die Hemmung nicht aufheben kann. Das Nitrosoharnstoff-Medikament Carmustin (BCNU, Tabelle 2) ist ein irreversibler Hemmstoff der Trypanothionreduktase, inaktiviert aber auch die menschliche Glutathionreduktase. BCNU wirkt synkatalytisch, indem es im aktiven Zentrum beider Enzyme das Flavin-ferne Cystein carbamoyliert, das erst nach Reduktion durch NADPH zugänglich wird.^[106,125] Ajoen (4,5,9-Trithiadodeca-1,6,11-trien-9-oxid, Tabelle 2), ein spontanes Abbauprodukt von Allicin, der Hauptschwefelkomponente des Knoblauchs, ist für seine fungizide, antivirale, antitypanosomale und antiplasmatische Aktivität bekannt. Ajoen ist ein subversives Substrat und kovalenter Inhibitor beider Reduktasen; zudem zeigen die modifizierten Enzyme eine erhöhte NADPH-Oxidaseaktivität.^[108] (2,2':6',2''-Terpyridin)platin(II)-Komplexe (Tabelle 2) sind irreversible Liganden der Trypanothionreduktase von *T. cruzi*, nicht aber der Human-Glutathionreduktase.^[109] Die Organometallkomplexe werden wahrscheinlich im aktiven Zentrum durch Koordination des Platins an Cys52 gebunden, nachdem der vierte Ligand ersetzt wurde. Auch in diesem Falle ist die Inaktivierung des Enzyms von einer Zunahme der NADPH-Oxidaseaktivität begleitet. Die Blockierung dieses redoxaktiven Cysteinrestes, der unter physiologischen Bedingungen mit dem Disulfid-Substrat interagiert, verschiebt offensichtlich die Elektronendichte im reduzierten Enzym zum Flavin und verstärkt dadurch die direkte Reduktion von molekularem Sauerstoff durch den Isoalloxazin-Ring. Unerwarteterweise behalten Chimärenliganden bestehend aus (2,2':6',2''-Terpyridin)platin(II)-Komplexen und 9-Aminoacridinen nicht den irreversiblen Hemmtyp bei, sondern wirken als effektive Mischtyp-Inhibitoren.^[126] Diese Befunde unterstreichen einmal mehr die Schwierigkeiten von Struktur-Aktivitäts-Voraussagen bei Inhibitoren der Trypanothionreduktase: Das geräumige aktive Zentrum lässt offenbar viele Bindungsmöglichkeiten zu.

4.1.5. Subversive Substrate

Ein subversives Agens – auch als subversives Substrat, subversiver Inhibitor oder Turncoat-Inhibitor bezeichnet – ist ein Molekül, das eine antioxidative Disulfidreduktase zu einem prooxidativen Enzym umfunktioniert.

Nitrofurane und Naphthochinone wirken als subversive Substrate der Trypanothionreduktase und anderer Flavoen-

zyme.^[111–115] Ein typisches subversives Substrat (X) wird durch das Enzym in einem Enelektronenschritt zum entsprechenden Radikal reduziert [Gl. (3)], das dann spontan mit molekularem Sauerstoff unter Bildung des Superoxidradikals reagiert [Gl. (4)]:



Im Falle der Trypanothionreduktase verursacht dieser Prozess eine eingeschränkte Reduktion des Trypanothiondisulfids, die Verschwendug von NADPH und O_2 sowie ein niedrigeres zelluläres Thiol/Disulfid-Verhältnis. Da die Reaktion der radikalischen Zwischenstufe mit molekularem Sauerstoff das subversive Substrat regeneriert, wirken die Verbindungen als Katalysatoren von oxidativem Stress. Aus diesem Grunde ist von diesen Substanzen ein starker Einfluss auf den Redoxstoffwechsel des Parasiten zu erwarten.^[107] In einer vergleichenden Studie wurden antimikrobielle Nitrofurane auf ihre Fähigkeit hin untersucht, einerseits Trypanothionreduktase und Liponamiddehydrogenase aus *T. cruzi* sowie Glutathionreduktase und Liponamiddehydrogenase aus Säugern zu inhibieren und/oder andererseits als subversive Substrate zu fungieren.^[114] Die Verbindungen waren mäßig gute Inhibitoren der humanen Glutathionreduktase und der Trypanothionreduktase aus *T. cruzi*, nicht aber der Liponamiddehydrogenasen. Demgegenüber zeigte die Liponamiddehydrogenase aus dem Parasiten die höchsten Aktivitäten bei der Reduktion von Nitrofuranen. Chinifur, ein Nitrofuranerivat mit Aminoalkyl-Seitenkette (Tabelle 2), ist Inhibitor und subversives Substrat der Trypanothionreduktase,^[111] interagiert aber nur sehr schwach mit Liponamiddehydrogenase.^[114] Trypanothionreduktase scheint nicht an der Nifurtimox-Resistenz beteiligt zu sein, da sensitive und resistente *T. cruzi*-Stämme identische mRNA-Spiegel für Trypanothionreduktase zeigen.^[127] Im Unterschied zu Nitrofuranen wirken 5-Nitroimidazole wie Megazol (das zurzeit als Wirkstoff gegen die Chagas-Krankheit reevaluiert wird) nicht als subversive Redoxpendler; sie verursachen vielmehr eine Verarmung an Trypanothion und stören so den Thiolstoffwechsel des Parasiten.^[128]

Naphthochinone wie Menadion, Plumbagin und Lapachol zeigen signifikante trypanozide Aktivitäten und wechselwirken mit Trypanothionreduktase, Liponamiddehydrogenase und humaner Glutathionreduktase. Bei der Trypanothionreduktase fungieren Menadion, Plumbagin und andere 1,4-Naphthochinone sowohl als Inhibitoren wie auch als (subversive) Substrate.^[112–115] Schon seit langem ist bekannt, dass Liponamiddehydrogenase Chinone zu reduzieren vermag. In der Tat wurde das Enzym aus Hefe ursprünglich als Menadionreduktase beschrieben. Bei der Liponamiddehydrogenase aus *Mycobacterium tuberculosis* wird die Reduktion von Chinon durch das vierlektronenreduzierte Enzym (EH_4) katalysiert, bei dem sowohl der Flavinring als auch die redoxaktiven Cysteine in reduziertem Zustand vorliegen. EH_2 , das das Flavin in oxidierteter Form enthält, ist hingegen das katalytische Intermediat für die Reduktion des Disulfids, bei der Reduktion von Chinon ist es aber unwirksam.^[129] Für

die Human-Glutathionreduktase sind 1,4-Naphthochinone hauptsächlich reversible Inhibitoren^[112–114] und schwache subversive Substrate.^[130] Um trypanozide 1,4-Naphthochinone mit Spezifität für Trypanothionreduktase aus *T. cruzi* zu erhalten, wurden Serien von Menadion-, Plumbagin- und Juglon-Derivaten synthetisiert. Die wirksamsten Derivate enthielten zwei 1,4-Naphthochinon-Einheiten, die durch eine Polyamin-Brücke verknüpft sind (Tabelle 2). Insgesamt zeigen die Daten, dass für eine starke trypanozide Wirkung die Hemmung der Trypanothionreduktase nicht ausreicht, sondern dass die Kombination der Eigenschaften subversiver Redoxpendler und Inhibitoren der TS_2 -Reduktion entscheidend ist.^[115]

Ein Warburg-Ferment (Altes gelbes Ferment, „old yellow enzyme“) aus *T. cruzi*, eine weitere flavinabhängige Oxidoreduktase, katalysiert ebenfalls Einelektronenreduktionen von Naphthochinonen zum Semichinonradikal.^[131] Ihm wird eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von Chinon-Wirkstoffen unter anaeroben Bedingungen zugesprochen. Bis jetzt ist für keines der Flavoenzyme das Bindungszentrum eines subversiven Inhibitors strukturell bekannt. Die Kristallstruktur der Human-Glutathionreduktase mit gebundenem Menadion, einem unkompetitiven Inhibitor^[132] und (schwachen) subversiven Substrat,^[115] zeigte die höchste Elektronendichte an der zweizähligen Achse und zusätzlich schwache Belegungen an den Bindungszentren für NADPH und Glutathiondisulfid.^[133] Nach diesem Befund darf man vermuten, dass es sich bei einer der Bindungsstellen für Naphthochinone um die Höhle an der zweizähligen Achse der Trypanothionreduktase handelt. Modellierungsstudien deuten an, dass diese Stelle im Parasitenenzym eine Präferenz für positiv geladene Liganden hat.^[115] Chimären-Verbindungen bestehend aus einem Naphthochinon und einem Dimerisierungsinhibitor sind von zukünftigem Interesse. Agentien, die gegen das dimerisierende Helixpaar an der zweizähligen Molekülachse gerichtet sind und zur Denaturierung des Enzyms führen (siehe Tabelle 6), werden in Abschnitt 7.3.3 diskutiert.

5. Behandlung und Prophylaxe der Malaria – aktuelle Probleme

Malaria ist eine der größten Bedrohungen für die Gesundheit, aber auch für die wirtschaftliche und gesellschaftliche Entwicklung der Menschheit. Etwa 40% der Weltbevölkerung ist durch Malaria gefährdet, und jährlich werden 300–500 Millionen Krankheitsfälle registriert. Alle 15 Sekunden stirbt ein Kind in Afrika an Malaria oder trägt dauerhafte neurologische Schäden davon.^[134] Malariaerreger wie *Plasmodium falciparum* durchlaufen verkettete Fortpflanzungszyklen in Menschen und blutsaugenden Anophelesmücken. Zur eigentlichen Erkrankung beim Menschen kommt es, wenn sich die Erreger in den Erythrocyten, den roten Blutzellen, vermehren (siehe <http://sites.huji.ac.il/malaria>). Deshalb sind die meisten Medikamente gegen dieses Parasitenstadium gerichtet.^[107, 135] Die Erfolge der Vergangenheit und neuere Entwicklungen bei der Suche nach Antimalaria-Wirkstoffen wurden vor kurzem von Ridley und Wiesner zusammenfassend behandelt.^[136, 137] Was dringend benötigt

wird, sind preiswerte Pharmaka gegen die unkomplizierte Malaria bei Kindern. In vielen afrikanischen Ländern und auch in zahlreichen anderen Regionen rund um den Globus haben die 10-Cent-Medikamente Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin ihre Wirksamkeit verloren, da sich Resistenz gegen diese Wirkstoffe rapide ausbreiten. Es gibt bislang keine Antwort darauf, wie die Standardtherapie gegen Malaria in ein paar Jahren aussehen könnte.^[138] Standardtherapie impliziert, dass die Medikation zur Verfügung steht und für die Betroffenen, in der Regel sehr arme Menschen, erschwinglich ist.

6. Das thiolabhängige Redoxnetzwerk bei *Plasmodium falciparum*

Parasitierte rote Blutkörperchen sind hohen Flüssen reaktiver Sauerstoffspezies ausgesetzt, und zusätzliche Pro-Oxidantien oder Anti-Antioxidantien hemmen effektiv das Parasitenwachstum.^[77, 139–143] Ähnlich wie in Trypanosomen kommen die klassischen antioxidativen Enzyme Katalase und Selenocystein-haltige Glutathionperoxidase in *P. falciparum* nicht vor, was die Plasmodien besonders anfällig gegen oxidativen Stress macht. Der Thiol-Redoxstoffwechsel ist an der Pathogenese der Malaria beteiligt und spielt auch eine große Rolle bei der Medikamentenresistenz des Parasiten. Folglich ist das Netzwerk von Thiolen und Thiolproteinen (Abbildung 2b) ein vielversprechendes Angriffsziel für die Wirkstoffentwicklung gegen Malaria.^[77, 107, 144, 145] Die Schlüsselenzyme, die die Reduktionsäquivalente des NADPH in das antioxidative Netzwerk einspeisen, sind Thioredoxinreduktase und Glutathionreduktase (Abbildung 3). Wie durch biochemische Untersuchungen und Genomanalyse nachgewiesen wurde, kommen Trypanothionreduktase und ihr Substrat Trypanothion (Abbildung 1a und 3a) in *Plasmodium falciparum* und seinen Wirten nicht vor.^[35] Die parasitäre Thioredoxinreduktase zeigt eine breite Substratspezifität, die allerdings Glutathiondisulfid (GSSG) nicht mit einschließt.^[146] Das Hauptsubstrat ist die Disulfidform des 12-kDa-Proteins Thioredoxin (TrxS₂) [Gl. (5)]:



Zellbiologische Reaktionen, die auf Thioredoxin oder Glutathion basieren, sind in Abbildung 2b bzw. Tabelle 3 aufgeführt. Das Thioredoxinsystem^[149–151] umfasst Thioredoxinreduktase, Thioredoxin^[146, 152–154] und thioredoxinabhängige Peroxidasen.^[155–157] Zum Glutathionsystem gehören zwei Synthetasen, die das Tripeptid Glutathion aus den einzelnen Aminosäuren aufbauen,^[158, 159] weiterhin Glutathionreduktase,^[160, 161] Glutathion selbst, Glutathion-S-Transferase^[162, 163] und Glutaredoxine.^[164, 165] Das kürzlich entdeckte Redoxprotein Plasmoredoxin ist eines der Bindeglieder zwischen dem Glutathion- und Thioredoxinsystem.^[141]

Die meisten thioredoxin- und glutathionabhängigen Prozesse können als Abwehrreaktionen gegen reaktive Sauerstoffspezies und andere Formen von chemischem Stress zusammengefasst werden (Tabellen 3 und 4). Aus zellpathologischer Sicht ist es nicht gerechtfertigt, nur das direkte

Tabelle 3: Thiolabhängige Abwehrreaktionen in *Plasmodium falciparum* gegen chemischen Stress.

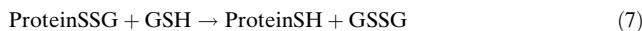
Abwehrkategorie ^[a]	Reaktion(en) ^[b]	beteiligte Enzyme ^[148]
AM	$\text{TrxS}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{NADP}$	Thioredoxinreduktase
AM	$\text{Glu} + \text{Cys} + \text{Gly} + 2\text{ATP} \rightarrow \text{GSH} + 2\text{AMP} + 4\text{P}_i$	γ -Glutamylcystein-Synthetase plus Glutathion-Synthetase plus Pyrophosphatase
AM	$\text{GSSG} + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}$	Glutathionreduktase
P	$\text{ProteinSH} + \text{GSSG} \rightarrow \text{ProteinSSG} + \text{GSH}$	1-Cysteinglutaredoxin
P	$\text{Protein}(\text{SH})_2 + \text{GSSG} \rightarrow \text{ProteinS}_2 + 2\text{GSH}$	Glutaredoxin
P	$\text{ProteinSOH} + \text{GSH} \rightarrow \text{ProteinSSG} + \text{H}_2\text{O}$	
P	$\text{CoenzymA-SOH} + \text{GSH} \rightarrow \text{CoenzymA-SSG} + \text{H}_2\text{O}$	
I	$\text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{ROOH} \rightarrow \text{TrxS}_2 + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$	Peroxiredoxine, Glutathionperoxidase-ähnliche Thioredoxin-peroxidasen
I	$\text{GSH} + 2\text{-Ketoaldehyd} \rightarrow \text{GSH} + 2\text{-Hydroxsäure}$	
I	$\text{GSH} + \text{Wirkstoff} \rightarrow \text{Wirkstoffkonjugat mit Glutathion}$	Glyoxalase I und Glyoxalase II
I	$\text{GSH} + \text{rns} \rightarrow \text{GSNO}$	Glutathion-S-Transferase
I	$\text{GSNO} + \text{R}^{\cdot} \rightarrow \text{RSG} + \text{NO}$	
I	$\text{R}^{\cdot} + 2\text{GSH} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{RH} + \text{GSSG} + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}_2$ als Summe der folgenden Reaktionssequenz: $\text{R}^{\cdot} + \text{GSH} \rightarrow \text{RH} + \text{GS}^{\cdot}$ $\text{GS}^{\cdot} + \text{GS}^{\cdot} \rightarrow \text{GSSG}^{\cdot}$ $\text{GSSG}^{\cdot} + \text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + \text{O}_2^{\cdot}$ $\text{O}_2^{\cdot} + \text{H}^+ \rightarrow \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2$	Superoxiddismutase sowie Glutathionreduktase und Thioredoxinperoxidase zur Reduktion von GSSG und H_2O_2
I	GSSG -Transport aus dem Parasiten heraus als weiterer Mechanismus, das GSH/GSSG -Verhältnis hoch zu halten	Transportsysteme in den Membranen
R	$\text{ProteinSSG} + \text{GSH} \rightarrow \text{ProteinSH} + \text{GSSG}$	1-Cysteinglutaredoxin
R	$\text{ProteinS}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{Protein}(\text{SH})_2 + \text{GSSG}$	Glutaredoxin
R	$\text{ProteinS}_2 + \text{Trx}(\text{SH})_2 \rightarrow \text{Protein}(\text{SH})_2 + \text{TrxS}_2$	

[a] Klassifizierung nach biologischen Aspekten: AM, Abwehr-Mobilisierung im Parasiten; P, Prävention von Primär- und Sekundärschäden für den Parasiten; I, Intervention, d. h. Abfangen toxischer Verbindungen; R, Reparaturprozesse.^[147] [b] Eine nicht aufgeführte Reaktion, die für die Entgiftung von Peroxynitrit wahrscheinlich wesentlich ist ($\text{GSH} + \text{ProteinSH} + \text{ONOO}^{\cdot} \rightarrow \text{ProteinSSG} + \text{NO}_2^{\cdot} + \text{H}_2\text{O}$),^[74] muss für *P. falciparum* noch verifiziert werden. Viele der aufgeführten Reaktionen führen zu Signalen, die zellbiologische Antworten wie die Synthese spezifischer Proteine oder Membranlipide im Parasiten auslösen können. R^{\cdot} kennzeichnet ein Radikal in einem (Makro)molekül; rns, reaktive Stickstoffspezies; ROOH, organisches Hydroperoxid oder H_2O_2 .

Abfangen einer schädlichen Verbindung als Abwehrreaktion zu bezeichnen. Tabelle 3 umfasst deshalb auch Verbindungen und Reaktionen, die Abwehrmobilisierung, Verhütung weiteren Schadens und Reparaturprozesse repräsentieren.^[147] Die meisten dieser spontanen oder enzymkatalysierten Reaktionen stellen keine chemischen Gleichgewichte dar, d. h., Hin- und Rückreaktion können in Raum und Zeit getrennt sein. Wenn beispielsweise der Parasit einer Anflutung von Oxidantien ausgesetzt ist, bilden sich Disulfide zwischen Proteinsulfenaten und Glutathion [Gl. (6)].



Dadurch werden die Cysteinreste vor einer in vivo irreversiblen Oxidation zum Sulfinat geschützt. Außerdem verhindert diese Reaktion einen Glutathionverlust der Zelle in Form von GSSG. Ist die oxidative Stresssituation vorbei, müssen die gemischten Disulfide wieder reduziert werden, um die funktionellen Thiol-Proteine zu rekonstituieren [Gl. (7)]:



Das Stress-Relikt Glutathiondisulfid wird letzten Endes durch Glutathionreduktase reduziert [Gl. (2)].

6.1. Glutathionspezies in *Plasmodium falciparum*

Die meisten biochemisch-pharmakologischen Untersuchungen an Malaria-Parasiten wurden am Trophozoit Stadium in menschlichen Erythrozyten durchgeführt. Als relevante Glutathionspezies^[148] des Parasiten fanden sich das Thiol GSH (etwa 2 mM), das Thiolat-Ion GS^{\cdot} (etwa 30 μM , wenn ein pK_s -Wert von 9.2 für die Thiolgruppe unter physiologischen Bedingungen angenommen wird) und Glutathiondisulfid (etwa 10 μM). Ein hohes GSH/GSSG-Verhältnis ist essentiell für die intrazelluläre Redoxhomöostase (siehe Anhang und Lit. [167]). S-Glutathionylierte Proteine (ProteinSSG, auch als gemischte Disulfide bezeichnet) können in einer Gesamtkonzentration von 100 μM bis 1 mM vorkommen (Tabelle 3). Das Thiylradikal GS^{\cdot} und das Glutathiondisulfidradikal GSSG^{\cdot} sind Intermediate in Reaktionsfolgen, die zum Abbruch radikalischer Kettenreaktionen führen.^[168,169]

6.2. Wechselwirkungen zwischen Glutathion- und Thioredoxinsystem

Intrazelluläres GSSG wird enzymatisch durch die Glutathionreduktase [Gl. (2)] und nichtenzymatisch durch Thioredoxin reduziert [Gl. (8)].^[146,148]



Tabelle 4: Chemischer Stress gegen die Parasitenzelle.^[a]

zellschädigende Prozesse	Anmerkung
ProteinSH + ONOOH + O ₂ → ProteinSO ₂ H + HNO ₂ + H ₂ O	Bildung von ProteinSO ₂ H ist im Parasiten und Wirt irreversibel
ProteinSH + ros → ProteinSOH + H ₂ O	reversible Bildung von Sulfensäure
Protein(SH) ₂ + ros → ProteinS ₂	reversible Bildung von Disulfid
ProteinSOH + ros → ProteinSO ₂ H + H ₂ O	irreversible Bildung von Sulfinsäure
Protein-SCH ₃ + ros → Protein-SOCH ₃	Bildung von Methioninsulfoxid (und Methioninsulfon)
ProteinSH + rns → ProteinSNO + H ₂ O	Nitrosylierung von Thiol
Protein + rns → nitriertes Protein	irreversible Bildung von Nitrotyrosin
Membranlipid + ros → Membranlipid-Peroxide	(= ROOH in Tabelle 3)
DNA + Methylglyoxal → Basen-Mutationen in der DNA	
DNA + R [•] → Strangbrüche, Basen-Mutationen in der DNA	

[a] Zu den Verbindungen, die den Parasiten *in vivo* unter Stress setzen, gehören reaktive Sauerstoffspezies (ros) wie H₂O₂, reaktive Stickstoffspezies (rns) wie Stickstoffmonoxid oder Peroxynitrit, heteroaromatische Verbindungen, Methylglyoxal als Nebenprodukt der Glycolyse^[166] sowie organische Radikale aus eisenkatalysierten Reaktionen.

Eine hohe stationäre Konzentration an Trx(SH)₂ und somit ein hohes Trx(SH)₂/TrxS₂-Verhältnis wird durch die Thioredoxinreduktase aufrechterhalten [Gl. (5)]. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Reaktion (8) beträgt 650 M⁻¹ s⁻¹, was Reaktionsgeschwindigkeiten erlaubt, die den metabolischen Anforderungen gerecht werden. Die Rückreaktion kann unter In-vivo-Bedingungen wahrscheinlich vernachlässigt werden.

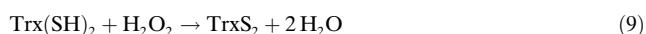
Es sei erwähnt, dass bei schnell steigenden GSSG-Konzentrationen die chemische Reaktion [Gl. (8)] anpassungsfähiger ist als die enzymkatalysierte [Gl. (2)]: Bei Konzentrationen von 250 μM GSSG kann Glutathionreduktase die Geschwindigkeit der GSSG-Reduktion nur noch um 25% erhöhen, da das Enzym bereits weitgehend mit Substrat gesättigt ist. Im Unterschied dazu bleibt die Trx(SH)₂-vermittelte Reaktion proportional zur GSSG-Konzentration, die unter extremen oxidativen Bedingungen 3 mM erreichen kann. Dies ist nicht nur bei Parasiten, sondern auch bei Hefe-Mutanten und Lymphozyten von AIDS-Patienten beobachtet worden (siehe dazu Lit. [146]).

Die Reduktion von GSSG durch Trx(SH)₂ ist wahrscheinlich besonders wichtig für Stadien von *P. falciparum*, die – wie die Merozoiten – zwar Glutathion, aber praktisch keine Glutathionreduktase enthalten.^[170] Chemische und funktionelle Interaktionen zwischen dem Glutathion- und dem Thioredoxinsystem finden auch auf der Ebene der Glutaredoxine und Thioredoxine statt (Abbildung 2b).^[164] Da die

GSSG-Reduktion durch das Thioredoxinsystem bei mehreren physiologischen, pharmakologischen und pathologischen Zuständen eine Rolle spielt, wäre es von Interesse, einen pharmazeutischen Wirkstoff zu entwickeln, der sowohl Thioredoxinreduktase als auch Glutathionreduktase hemmt. Diese mechanistisch und strukturell eng verwandten Enzyme werden in Abschnitt 7 als Zielmoleküle diskutiert.

6.3. Thioredoxinabhängige Hydroperoxid-Entgiftung

H₂O₂ ist das Hauptoxidans, dem Blutparasiten ausgesetzt sind. In *P. falciparum* wird das H₂O₂ hauptsächlich durch Thioredoxin reduziert [Gl. (9)]:



Diese Reaktion wird in *P. falciparum* durch ein ganzes Arsenal von Thioredoxinperoxidases katalysiert. Im Unterschied zu Sägerzellen hat der Parasit nämlich eine nur sehr geringe Glutathionperoxidase-Aktivität. Wie Flohé und Mitarbeiter berichteten, zeigt ein Enzym, das strukturell den Säger-Glutathionperoxidases ähnelt, eine 1000fach höhere katalytische Kompetenz mit Trx(SH)₂ als mit GSH.^[148, 171] Ein wichtiger Aspekt ist, dass die meisten Thioredoxinperoxidases durch hohe Peroxidkonzentrationen oder -flüsse^[150, 156] inaktiviert werden und auf diese Weise als Schleusentor für H₂O₂ fungieren.^[172]

Unter Berücksichtigung dieses Umstands schlagen wir folgendes Funktionsmodell für die beiden antioxidativen Systeme in *P. falciparum* vor: Der basale Peroxid-Fluss wird durch das Thioredoxinsystem kontrolliert. Unter diesen Bedingungen sollte die GSSG-Konzentration nicht ansteigen. In Situationen vorübergehender Peroxid-Exposition, z.B. bei einer plötzlichen Attacke menschlicher Abwehrzellen mit Oxidantien auf den parasitierten Erythrozyten, fällt das Thioredoxinsystem aus, das Glutathionsystem springt ein und bildet GSSG, das durch Glutathionylierung von SH-Gruppen in Coenzymen und Proteinen wichtige Funktionsträger der Zelle vor irreversiblen Oxidationen schützt (Tabelle 3). Auch der Wirtserthrozyt trägt wahrscheinlich wesentlich zur Entgiftung der im Parasiten entstehenden Oxidantien bei.^[148] H₂O₂ diffundiert leicht durch biologische Membranen, und die Erythrozyten sind mit H₂O₂-abbauenden Enzymen wie Katalase und Glutathionperoxidase exzellent ausgestattet. Nach Ginsburg und Atama kann der Parasit den Erythrozyten sogar mit zusätzlichem Glutathion versorgen, um die Wirtszelle gegen oxidative Angriffe zu stabilisieren. Die quantitativen Aspekte dieses Vorgangs müssen aber noch bestätigt werden.^[167]

6.4. Folgen einer partiellen Inhibition von Thioredoxinreduktase *in vivo*

Wie im Folgenden erläutert, kann die partielle Hemmung eines Enzyms die zellbiochemische Integrität auch dadurch zerstören, dass die stationäre Konzentration des Substrats auf toxische Spiegel ansteigt, während das Enzym noch immer

seine metabolische Funktion zu erfüllen scheint. Der grundsätzliche Punkt ist, dass der Substratumsatz durch ein Enzym in vivo oft extern bestimmt wird, nämlich durch die Geschwindigkeit, mit der dieses Substrat metabolisch generiert wird. Nehmen wir die Thioredoxinreduktase aus *P. falciparum* als Beispiel: Die zelluläre H_2O_2 -Produktion, und somit der H_2O_2 -Fluss, liegt in den meisten Zellen in der Größenordnung von $50 \mu\text{M min}^{-1}$.^[54] Dies führt zur Bildung von $50 \mu\text{M}$ oxidiertem Thioredoxin pro Minute, das anschließend durch Thioredoxinreduktase reduziert werden muss [Gl. (5)]. Die entscheidende Frage ist nun, bei welchem Substrat-Spiegel [S] das Enzym die Reduktion einer bestimmten Menge an Thioredoxin pro Zeit-Einheit bewältigt. Zur Beantwortung dieser Frage ziehen wir die Michaelis-Menten-Gleichung heran. Auflösen nach der Substratkonzentration ergibt Gleichung (10):

$$[S] = K_M (V_{\max}/v - 1)^{-1} = K_M (k_{\text{cat}} [E_t]/v - 1)^{-1} \quad (10)$$

Zur Berechnung von $[S] = 2.0 \mu\text{M}$ wurden die folgenden Werte eingesetzt: $K_M = 10.4 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}} = 3100 \text{ min}^{-1}$, TrxS_2 -Fluss $= v = 50 \mu\text{M min}^{-1}$ und Thioredoxinreduktase-Konzentration $[E_t] = 0.1 \mu\text{M}$.^[146] Wird das Enzym nun durch Wirkstoffe wie Carmustin oder CDE4 (Tabelle 5) kovalent inaktiviert, fällt die Konzentration an funktionellem Enzym unter $0.02 \mu\text{M}$. Setzen wir diesen Wert in Gleichung (10) ein, steigt der Wert für $[S] = [\text{TrxS}_2]$ auf $>40 \mu\text{M}$, da sich der H_2O_2 -Fluss ja nicht ändert. Nahezu das gesamte Thioredoxin liegt also in oxidiertem Form vor, und andere $\text{Trx}(\text{SH})_2$ -abhängige Prozesse können nicht mehr stattfinden. Darüber hinaus würden die hohen TrxS_2 -Konzentrationen zur nichtphysiologischen Oxidation von Protein- und Coenzymthiolen durch Dithiol/Disulfid-Austauschreaktionen führen.

Der Effekt, dass die Substratkonzentration toxische Werte erreicht, obwohl das partiell inhibierte Enzym noch seiner zellbiologischen Funktion nachkommt, wurde auch für die Glutathionreduktase beschrieben.^[54, 181]

7. Enzyme des Thiolstoffwechsels der Plasmodien als Targets (Angriffsziele)

7.1. Thioredoxinreduktase als validiertes Zielmolekül

Die dimere Thioredoxinreduktase (Abbildung 3c und Gleichung (5)) ist ein beispielhaftes Zielmolekül für die moderne Wirkstoffentwicklung gegen Malaria. Das Gen

wurde im Genom von *P. falciparum* identifiziert, kloniert und als rekombinantes aktives Flavoenzym exprimiert.^[152, 182–184]

Tabelle 5: Inhibitoren der Disulfidreduktasen von *P. falciparum* als Leitstrukturen.

Verbindungen	Strukturformel	Wirkmechanismus ^[a]
CDE4, eine ungesättigte Mannich-Base		irreversible Inhibition der Thioredoxinreduktase durch kovalente Bindung an das C-terminale Redoxzentrum ^[173]
Divicin (aus <i>Vicia faba</i>), ein Redoxpendler		das Addukt mit Glutathion ist ein Substrat und kompetitiver Inhibitor der Human-GR ^[174]
Isoalloxazine		nichtkompetitive Inhibition der GR; $K_i = 1.9 \mu\text{M}$ für $X = \text{Pentafluorophenyl}$ und $R = \text{Methyl}$ ^[161, 175]
JD145, ein Naphthazarin-Derivat		kompetitive Inhibition der TrxR ($K_i = 0.5 \mu\text{M}$); das Human-Ortholog wird mit einem K_i von 5 nm inhibiert ^[144]
Peptid K16	Sequenz CDEMLQGFAVAVKMGA	Dimerisierungs- und Faltungsinhibitor der GR und der Human-GR ($IC_{50} = 100 \text{ nM}$) ^[161]
M5, ein saures Menadion-Derivat		reversible Inhibition von GR ^[176]
M5Q-Ester, ein doppelköpfiges Prodrug		das Prodrug-Hybrid wird in vivo hydrolysiert und setzt M5 als GR-Inhibitor sowie ein parasitotoxisches 4-Anilinchinolin-Derivat frei ^[176]
Menadion		reversibler Inhibitor und subversives Substrat von TrxR und GR (Eubel, Merkle und Schirmer, unveröffentlicht); unkompetitiver Inhibitor der Human-GR ^[114, 132]
Methylenblau		nichtkompetitiver Inhibitor und subversives Substrat von GR und TrxR ^[160, 161, 177, 178]
Nitrosoharnstoffe, z. B. Carmustin		irreversible Inaktivierung der Disulfidreduktasen; Carmustin wirkt synkatalytisch durch Carbamoylierung eines Cysteinrests im aktiven Zentrum der NADPH-reduzierten Enzyme ^[106, 125]
Peroxynitrit	ONOO [–]	inaktivierende Nitrierung von Tyr86 und Tyr94 im aktiven Zentrum der GR; darüber hinaus ist ONOO [–] Substrat für GR und Bisnitro-GR ^[179]
pyrogene Verbindungen oder Fieber	Destabilisierung der NADPH-reduzierten GR ^[180]	

[a] TrxR und GR bezeichnen hier die Thioredoxinreduktase und Glutathionreduktase des Erregers.

Anschließend bewiesen Müller und Mitarbeiter durch Genablation und Gensubstitution, dass Thioredoxinreduktase für die Blutstadien von *P. falciparum* ein überlebenswichtiges Enzym ist,^[153,154] und validierten Thioredoxinreduktase somit als Target. Der katalytische Mechanismus des Enzyms wurde von Williams und Mitarbeitern durch Single-Turnover-Kinetik und Flavin-Absorptionsspektroskopie aufgeklärt.^[152] Die Katalyse der Thioredoxinreduktase aus *P. falciparum* schließt neben dem Flavin zwei weitere redoxaktive Dithiole ein: Eines wird von Cys88, dem Austausch-Thiol, und Cys93, dem mit dem Flavinring interagierenden Thiol, gebildet. Das zweite Dithiol, nahe am C-Terminus der anderen Untereinheit gelegen, besteht aus Cys535' und Cys540' (Abbildung 3c). Die beiden Cystein-Paare sind über einen Redoxprozess miteinander verbunden. Ein Schlüssel-Intermediat der Katalyse ist ein Charge-Transfer-Komplex (bestehend aus dem Thiolat von Cys93 als Donor und dem Flavin als Acceptor), der durch eine Absorption im langwelligen Bereich bei 540 nm gekennzeichnet ist.^[183,184]

Ein Hochdurchsatz-Screening an 350000 Verbindungen der Pfizer-Substanzenbank ergab 30 Inhibitoren der Thioredoxinreduktase als Treffer. Die verwirrende chemische Vielfalt unter diesen Verbindungen wurde von Davioud-Charvet et al. aufgelöst, die feststellten, dass es sich bei fast allen wirksamen Inhibitoren um typische Mannich-Basen handelte. Für eine dieser Verbindungen, CDE4 (Tabelle 5), wurde der Inhibitionsmechanismus näher untersucht: Eine komplexe Reaktionsfolge endet in der Bisalkylierung der vicinalen Thiole Cys535' und Cys540' im C-terminalen Redoxzentrum der Thioredoxinreduktase.^[173]

7.1.1. Die C-terminalen Redoxzentren der Thioredoxinreduktasen als Targets

Strukturelle und mechanistische Vergleiche zwischen den Thioredoxinreduktasen des Malariaystems (Malaria-Parasit, menschlicher Wirt und Insekten-Vektor) zeigen, dass sich diese orthologen Enzyme zwar insgesamt sehr ähnlich sind, sich aber in ihren C-terminalen Redoxzentren unterscheiden. Dieses Zentrum wird im Humanenzym durch die Aminosäuresequenz Gly-Cys-Ser-Gly gebildet,^[185] beim Enzym des Moskitos *Anopheles gambiae* ist es Thr-Cys-Cys-Ser^[186] und im *P.falciparum*-Enzym Gly-Cys-Gly-Gly-Lys-Cys-Gly.^[184] Diese chemischen Unterschiede machen diese Zentren zu molekularen Zielstrukturen für die Entwicklung selektiver Inhibitoren der jeweiligen Thioredoxinreduktase in menschlichen (Krebs)zellen, in Malaria-Parasiten und in krankheitsübertragenden Insekten.

7.2. Zielstrukturen im Glutathion-Stoffwechsel des Parasiten

Die beiden Synthetasen, die das Tripeptid Glutathion aus seinen einzelnen Aminosäuren aufbauen – γ -Glutamylcystein-Synthetase^[158] und Glutathion-Synthetase,^[159] – sind vielversprechende Zielmoleküle im Glutathionmetabolismus des Parasiten. Des Weiteren enthält *P. falciparum* zwar nur eine einzige Glutathion-S-Transferase, aber in sehr hoher Konzentration. Das Enzym entgiftet endogen anfallende Sub-

stanzen wie freies Häm oder pathologisch veränderte Membrankomponenten sowie bestimmte Antimalariamedikamente und andere Xenobiotika.^[162,187] Die Kristallstruktur dieses pharmakologisch wichtigen Proteins wurde vor kurzem aufgeklärt.^[163] Weitere interessante Zielmoleküle sind die Glyoxalasen I und II, die Methylglyoxal, ein toxisches Nebenprodukt des intensiven Glucose-Stoffwechsels im Parasiten, entsorgen.^[166] Gleches gilt für die Glutathionreduktase, ein Enzym, das hauptsächlich für die Pufferung des Redoxpotentials im cytosolischen Raum zuständig ist, indem es ein hohes GSH/GSSH-Verhältnis und indirekt eine hohe GSH-Konzentration aufrechterhält. Das vom Glutathionpuffer bestimmte Redoxmilieu des Zellinnern, eine wohlregulierte biochemische Größe, wird im Anhang näher beschrieben.

7.3. Glutathionreduktase aus *Plasmodium falciparum* als Target

Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase haben insgesamt sehr ähnliche Strukturen und Mechanismen, sind aber hochspezifisch bezüglich ihres jeweiligen Disulfid-Substrats. Der wichtigste Strukturunterschied ist ein zusätzliches C-terminales Redoxzentrum in der Thioredoxinreduktase, das in der Glutathionreduktase nicht vorkommt (Abbildungen 3b,c). Die Struktur der Glutathionreduktase aus *P. falciparum* wurde vor kurzem aufgeklärt und mit Human-Glutathionreduktase verglichen.^[161] So wird es nunmehr möglich sein, spezifische Inhibitoren des Parasitenenzymes als potenzielle Antimalaria-Wirkstoffe zu entwerfen oder bereits vorhandene zu verbessern. Diese Verbindungen sind zudem nützlich für Untersuchungen zur Rolle des Enzyms im Parasiten-Stoffwechsel und bei der Entstehung von Mehrfachresistenzen („multidrug resistance“).

Das homodimere Flavoenzym aus Malariaerreger entält in jeder Zentraldomäne ein Insert von 33 Aminosäuren, das bei anderen Glutathionreduktasen nicht vorkommt.^[188,189] Weitere interessante Zielstrukturen im Parasitenenzym sind das aktive Zentrum, insbesondere die Reste Cys39 und Cys44, die parallelen Helices H11 und H11' an der Grenzfläche der Untereinheiten sowie die Wandungen der zentralen Höhlung zwischen den Untereinheiten (Abbildung 5). Inhibitoren der *P.falciparum*-Glutathionreduktase sind in Tabelle 5 aufgeführt; darin ebenfalls beschrieben sind natürliche Abwehrmechanismen des menschlichen Wirts, z.B. Produktion von Peroxynitrit oder Fieber, die die Funktion des Parasitenenzymes beeinträchtigt.

Um die Wirkungen der einzelnen Inhibitoren zu verstehen, müssen wir zunächst den katalytischen Mechanismus und die im Parasiten vorkommenden Redoxformen des Enzyms betrachten. Während der Katalyse fließen Elektronen vom NADPH zum Flavin und dann vom reduzierten Flavin zum Disulfid Cys39/Cys44. Eines der Cysteine des naszierenden Dithiols, nämlich Cys39, reagiert mit GSSG und bildet glutathionlierte Glutathionreduktase (das gemischte Disulfid EnzymSSG in Abbildung 3b) während das erste GSH freigesetzt wird. Das Thiolat 44 attackiert anschließend das gemischte Disulfid, und unter Rekonstitution des Disulfids zwischen Cys39 und Cys44 wird das zweite GSH freigesetzt.^[191] Der jetzt vorliegende Grundzustand des

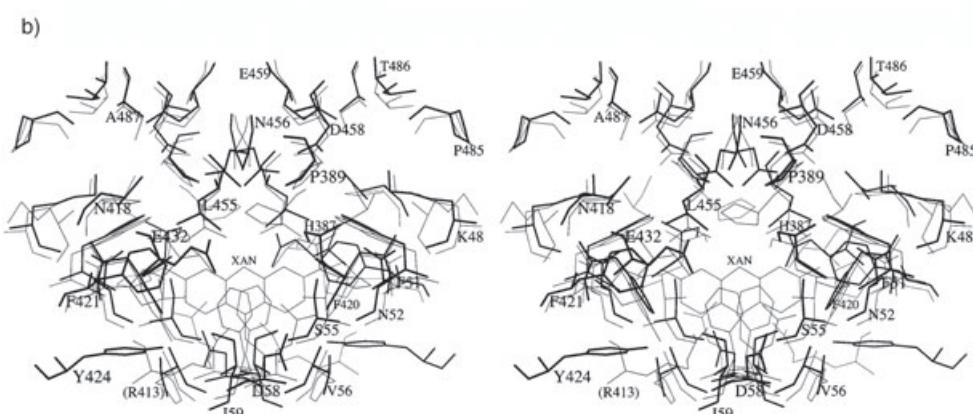
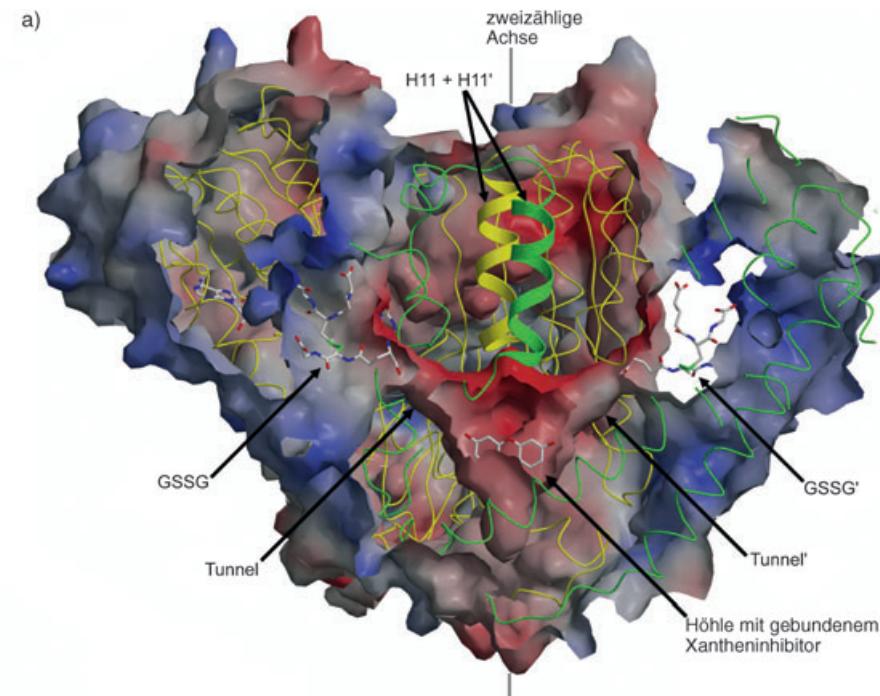


Abbildung 5. Die Zentralhöhle und die Dimerisierungshelices in der Human-Glutathionreduktase. a) Abbildung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche des Proteins; die Frontpartie ist weggeklappt, um den Blick auf die Höhle und die Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten freizugeben. Die Helices H11 und H11', deren Wechselwirkung durch Dimerisierungsinhibitoren beeinträchtigt werden kann, sind als Bänder dargestellt. Stabmodelle des GSSG und des Xantens, eines tricyclischen kompetitiven Inhibitoren, zeigen die entsprechenden Bindungsstellen an. Man beachte die Tunnel, die die Höhle mit den beiden GSSG-Bindungszentren verbinden. Die Kristallstruktur der Glutathionreduktase aus *Plasmodium falciparum* ist ähnlich; allerdings sind hier noch keine Enzym-Substrat-Komplexe strukturell aufgeklärt worden. b) Stereobild, das die Aminosäurereste zeigt, die die Höhlen auskleiden. Die Reste des *P.falciparum*-Enzyms (dicke Linien) sind in einer der beiden symmetrischen Untereinheiten mit Zahlen gekennzeichnet. Bei den Resten der Human-Glutathionreduktase (dünne Linien, Proteindatenbankeintrag 3GRS) trägt nur Arg 413 eine Nummerierung. Ein in der Höhle gebundener Inhibitor (XAN, aus Proteindatenbankeintrag 1XAN) ist als Referenz gezeigt. Der tricyclische Xanten-Ring liegt wie bei einem Sandwich zwischen den Phenylalaninen 78 und 78' der Human-GR (nach Lit. [161, 190]).

Enzyms wird E_{ox} genannt. Das im Verlauf der Katalyse entstehende zweielektronenreduzierte Enzym, EH_2 , enthält einen Charge-Transfer-Komplex aus dem Thiolat-Anion des Cys 44 und dem Flavin.^[160, 188] Eine vierelektronenreduzierte Enzymspezies EH_4 , bei der sowohl die Cysteine des aktiven Zentrums als auch das Flavin in reduzierter Form vorliegen,

7.3.1. Inhibitoren greifen unterschiedliche Redoxformen der Glutathionreduktase an

Peroxynitrit als Tyrosin-nitrierendes Agens und sperrige Heteroarene, die in der Höhle zwischen den Untereinheiten binden, interagieren mit allen oben beschriebenen Redox-

ist eine instabile und katalytisch inaktive Reserve-Form des Enzyms. EH_4 und ebenso das glutathionyierte Enzym treten in relevanten Konzentrationen wahrscheinlich nur im Parasiten, nicht aber in menschlichen Zellen auf und kommen daher als Targets für redoxzustandspezifische Inhibitoren in Betracht.^[191]

Die Farbe von Glutathionreduktase-Lösungen oder Kristallen des Enzyms zeigt die unterschiedlichen Redoxformen an: E_{ox} ist gelb, EH_2 orange, der EH_2 -NADPH-Komplex rot und EH_4 schwach gelblich. Dies ist auch die Basis für die Verwendung mikroinjizierter Glutathionreduktase-Kristalle als Sonden für die Bestimmung des Redoxpotentials subzellulärer Kompartimente.^[192]

Bei den für Malaria charakteristischen Fieberschüben wird ein hoher Prozentsatz der Parasiten eliminiert.^[193] Dies entspricht Beobachtungen an Zellkulturen, wonach sich die Plasmodien bei 37°C in 4 Tagen um mehr als 1000% Prozent vermehren, während bei 40°C ihre Zahl auf 20% sinkt. Die Thermolabilität der EH_2 -NADPH-Form der Glutathionreduktase könnte zu diesem Verhalten beitragen, da das Enzym bei 40°C rasch inaktiviert wird.^[180] Auf jeden Fall muss bei pharmakologischen und pathophysiologischen Untersuchungen an Plasmodien beachtet werden, dass das labile EH_2 -NADPH, und nicht das stabile E_{ox} , die vorherrschende physiologische Form der Disulfidreduktase ist.^[148, 191]

formen des Enzyms (Tabelle 5). Im Unterschied dazu greifen Nitrosoharnstoffe als carbamoylierende und alkylierende Substanzen nur Glutathionreduktase-Formen mit einem freien Thiol an Cys39 an, d.h. nur die Spezies EH₂ und EH₄. Sie reagieren nicht mit E_{ox} oder mit dem glutathionierten Enzym. Dimer-dissoziierende Wirkstoffe, z.B. das Peptid K16, oder Temperaturerhöhung von 37°C auf 40°C inaktivieren offenbar nur die labilen Formen EH₂·NADPH und EH₄ durch Denaturierung. K16 interferiert zudem mit dem Faltungsprozess der beiden Polypeptidketten.^[161,180] Menadion, ein unkompetitiver subversiver Inhibitor (Tabelle 5 sowie Eubel und Schirmer, unveröffentlicht), bindet wahrscheinlich nur an Enzym-Substrat-Komplexe, nicht aber an freies Enzym.

7.3.2. Peroxynitrit modifiziert das GSSG-Zentrum

Die GSSG-Bindungsstelle ist positiv geladen und zieht das Peroxynitrit elektrostatisch an.^[179] Peroxynitrit bewirkt die spezifische Nitrierung zweier Tyrosine im aktiven Zentrum und inaktiviert auf diese Weise das Enzym. Darüber hinaus oxidiert Peroxynitrit das Dithiol Cys39/Cys44 des aktiven Zentrums zum Disulfid, das dann wieder durch NADPH reduziert werden kann. Als Bilanz ergibt sich die enzymkatalysierte Reaktion (11).



Folglich kann Glutathionreduktase in *P. falciparum* als Peroxynitrit-Reduktase wirken, was sogar noch für das bisnitrierte Enzym zutrifft, das das natürliche Substrat Glutathiondisulfid nicht mehr umzusetzen vermag. Daher wirkt Peroxynitrit nicht nur als kovalent modifizierender Inhibitor, sondern auch als Substrat (Tabelle 5).

Das saure Naphthochinon M5 hemmt Glutathionreduktase durch Bindung an das GSSG-Zentrum,^[176] aber wahrscheinlich auch noch an eine zweite Stelle. Da M5 bei pH 7 überwiegend negativ geladen ist, ist es von seinem im Innern des Parasiten gelegenen Target durch impermeable Membranen getrennt. Ein eleganter Weg, dieses Problem zu umgehen, war die Einführung eines doppelköpfigen Prodrugs. Das M5-Molekül wurde über eine in vivo labile Esterbrücke mit einem 4-Aminochinolin-Derivat bekannter Antimalaria-Aktivität verknüpft (Tabelle 5). Die Chinolin-Einheit dirigiert das Prodrug zu seinem Primärziel, der Fressvakuole des Parasiten, wo die Esterbindung gespalten wird, sodass zwei aktive Wirkstoffe vor Ort freigesetzt werden. Die Wirksamkeit des Prodrug-Hybrids wurde an Parasiten-Kulturen und im Maus-Modell nachgewiesen.^[176]

7.3.3. Helix-11-Analoga als Dimerisierungsinhibitoren

Das Paar paralleler Helices (H11/H11') im Zentrum der Kontaktfläche der Protein-Untereinheiten (Abbildung 5a, Tabelle 6) ist der Dimerisierungs- und Faltungskern der Glutathionreduktase.^[161,194] Nur dimere Glutathionreduktase hat Enzymaktivität, da sich jedes aktive Zentrum aus Resten beider Untereinheiten zusammensetzt.

Tabelle 6: Sequenzen der Helix11 (und 11') in Thioredoxinreduktasen, Glutathionreduktasen und Trypanothionreduktasen aus unterschiedlichen Organismen.^[a]

Enzym	Aminosäuresequenz	Organismus
Thioredoxinreduktase	NAGEVITQGMALAI RLK	<i>Plasmodium falciparum</i>
	NAGEVITQGF AAAI KCG	<i>Homo sapiens sapiens</i>
	AAGEVITQGF AAAI KCGL	<i>Anopheles gambiae</i>
	NAGEVITQGF GI A K CG	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Wurm)
Glutathionreduktase	NADE I VQGF AV ALKMN	<i>Plasmodium falciparum</i>
	GCDEM I QGF AV AVKMG	<i>Homo sapiens sapiens</i>
	NAAE V I Q GYAVAF RVG	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	GMDEM I QGF AV ALKMG	<i>Escherichia coli</i>
	GCDEM I QGF AV AIKMG	<i>Haemophilus influenza</i>
	SSAE I QGF GV AIKMG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)
Trypanothionreduktase	DAAE I MQGIAIA ALK CG	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Pflanze)
	GAPEI I IQAVGV C RLN	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
	SSPEI I IQAVG I CMKLN	<i>Trypanosoma congoense</i>
	NAPEI I IQGVG I CLKLN	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	SAPEI I IQSVG I CMKMG	<i>Leishmania donovani</i>
	SSPEI I IQSVA I CLKMG	<i>Critchidia fasciculata</i>

[a] In Thioredoxinreduktase aus *P. falciparum* umfasst die Helix die Reste 481 bis 496, in Glutathionreduktase aus *P. falciparum* die Reste 456–471 und in Trypanothionreduktase aus *T. cruzi* die Reste 431 bis 446.

Synthetische Peptide, die die Helix 11 der Human-Glutathionreduktase imitieren, wurden als Inhibitoren getestet. Nur das 16-mere Peptid K16_{hGR} (Tabelle 6) blockierte die Dimerisierung und Faltung bei Human- und *P. falciparum*-Glutathionreduktase. Die IC₅₀-Werte lagen jeweils bei 100 nm. Die Übereinstimmung der IC₅₀-Werte – trotz des Unterschieds in fünf von sechzehn Aminosäuren – lässt sich aus den beiden Enzymstrukturen erklären. Im Unterschied dazu wurde Human-Thioredoxinreduktase, deren Helix-11-Sequenz sich in acht von sechzehn Positionen von der Human-Glutathionreduktase unterscheidet, durch K16_{hGR} viel schwächer inhibiert (IC₅₀ 12 μM).^[161]

Diese Ergebnisse empfehlen das Peptid K16_{hGR} als Leitstruktur für die Studie von Faltungs- und Dimerisierungsprozessen bei FAD-abhängigen Disulfidreduktasen (Tabelle 6). Spezifität für ein individuelles Enzym, z.B. für *T. cruzi*-Trypanothionreduktase oder *P. falciparum*-Thioredoxinreduktase, kann durch systematische Mutation der Peptidsequenz erreicht werden. Darüber hinaus bietet sich die

K16_{hGR}-Struktur für die Entwicklung von Peptidmimetika als Faltungsinhibitoren oder Dimer-dissoziierenden Wirkstoffen an (G. Haberhauer, persönliche Mitteilung). Solche Inhibitoren sollten schon in katalytischen Mengen wirksam sein, da die entstehenden Protein-Monomere denaturieren und in vivo rasch abgebaut werden, wobei das dissoziierende Agens wieder freigesetzt wird.

Das Konzept denaturierungsinduzierender Wirkstoffe wird durch Untersuchungen an rekombinant hergestellten Glutathionreduktase-Mutanten untermauert, die jeweils zwei ausgetauschte Aminosäuren im Helix-11-Bereich enthalten (G446E/F447P bei Human- und G463E/F464P bei *P.falciparum*-Glutathionreduktase). Diese Mutanten verhalten sich in allen gemessenen Parametern wie denaturierte Proteine und sind insbesondere gegen proteolytischen Abbau äußerst anfällig.^[161,194]

7.3.4. Wirkstoffbindung in der zentralen Höhle

Eine weitere Region der Glutathionreduktase, die sich für das Wirkstoffdesign anbietet, ist die Wand der Höhle an der Dimergrenze. Der Vergleich von Parasiten- und Human-Enzym in diesem Bereich zeigt, dass nur neun von 21 Aminosäureresten konserviert sind. In dieser „Wirkstoff-Falle“ (Tricyclen-Zentrum) werden zahlreiche sperrige Heteroarene wie Xanthen- oder Phenylisoalloxazin-Derivate gebunden (siehe Übersicht in Lit. [161]). Ein physiologischer Ligand für dieses Zentrum ist unbekannt. Die hier gebundenen Substanzen wirken als nichtkompetitive, unkompetitive oder als Mischtyp-Inhibitoren. Eine sinnvolle Hypothese ist, dass diese Liganden die Positionen der Helices 37–62 und 37'–62' verschieben. Diese rigiden Helices bilden einerseits einen Teil der Höhlenwand, andererseits tragen sie aber auch die Cysteine des aktiven Zentrums. Die Kristallstruktur der Human-Glutathionreduktase lässt beim Vergleich von freiem Enzym und einem Enzym-Inhibitor-Komplex allerdings keine deutliche Verschiebung dieser Helices erkennen.^[133]

Ein Vergleich der zentralen Höhlen bei *P.falciparum*- und Human-Glutathionreduktase ist in Abbildung 5b dargestellt. Die Höhlen haben ein ähnliches Volumen von etwa 450 Å³, unterscheiden sich aber in ihren Formen und chemischen Charakteristiken. Am auffälligsten ist, dass der obere Teil der Höhlung beim Parasitenenzym viel weniger Raum bietet als bei der Human-Glutathionreduktase. Die Nettoladungen an den Höhlenwänden sind ebenfalls sehr unterschiedlich. Sie sind negativ im Human-Enzym und eher neutral im *P.falciparum*-Protein.^[161] Kristallographische Daten liegen für zwei 3-Carboxymethyl-10-arylisalloxazine vor, nämlich das 4'-Chlor-Derivat und das 3',5'-Dichlor-Derivat. Beide binden in der Zentralhöhle der Human-Glutathionreduktase, nicht aber an den Bindungszentren des FAD oder der Substrate; dies impliziert, dass die Arylisalloxazine mit einer Stöchiometrie von 0.5 mol Inhibitor pro mol Untereinheit der Glutathionreduktase gebunden werden. Für etwa 25 weitere Arylisalloxazine mit sehr unterschiedlichen Substituenten sind die Inhibitorkonstanten für das Human- und das *P.falciparum*-Enzym bestimmt worden.^[161,175] Anhand dieser Daten sollte es mit Molecular

Modeling möglich sein, das Bindungszentrum für die Arylisalloxazine in der notwendigen atomaren Auflösung strukturell zu charakterisieren. Diese nichtkompetitiven Inhibitoren haben günstige Eigenschaften (Effektivität gegen Plasmodien *in vitro* und *in vivo*, niedrige Toxizität und geringe Produktionskosten), was sie zu vielversprechenden Wirkstoffkandidaten gegen Malaria macht.^[144,175]

7.3.5. Methylenblau als Inhibitor der Glutathionreduktase aus *P.falciparum*

Die vielversprechendste tricyclische Verbindung ist das Phenothiazinderivat Methylenblau, das als nichtkompetitiver Inhibitor die Glutathionreduktase aus *P.falciparum* deutlich inhibiert, das menschliche Enzym in therapeutischen Konzentrationen dagegen nicht.^[160,161] Methylenblau, das in der Vergangenheit bereits als Malariamittel verwendet wurde,^[195,196] ist heute ein Standardmedikament gegen Metahämoglobinämie und gegen Ifosfamid-assoziierte Neurotoxizität.^[178]

Methylenblau besitzt als Malariamedikament eine Reihe günstiger Eigenschaften. Es hat multiple Targets in *P.falciparum*, von denen zwei – (Met)hämoglobin und β-Hämatin – nicht durch das Genom des Parasiten kontrolliert sind.^[178,197,198] Dies macht eine rasche Resistenzentwicklung gegen Methylenblau unwahrscheinlich. Darüber hinaus trägt es als subversiver Inhibitor von Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase zur Glutathion-Verarmung im Parasiten bei (Eubel, Merkle und Schirmer, unveröffentlicht). Ein solcher Abfall des Glutathionspiegels sensibilisiert den Parasiten für Chloroquin,^[145] das für die Therapie wertvollste aller Malariamedikamente. Man darf also hoffen, dass die Wirkstoffkombination Methylenblau/Chloroquin (BlueCQ^[178]) beim einzelnen Patienten Synergien zeigt und auf epidemiologischer Ebene die Ausbreitung chloroquinresistenter Malariaerreger verlangsamt.^[199] Andere klinisch relevante Eigenschaften von Methylenblau einschließlich der blauen Färbung des Urins wurden an anderer Stelle diskutiert.^[178] Klinische Studien mit BlueCQ zur Behandlung der Malaria bei Kindern werden zurzeit in Burkina Faso im Distrikt Nouna durchgeführt (Olaf Müller, persönliche Mitteilung).

8. Ausblick auf die Wirkstoffentwicklung

Biochemische Unterschiede im Redoxstoffwechsel von Wirt und Parasit liefern interessante Ausgangspunkte für die Entwicklung spezifischer Wirkstoffe.^[107,148] Markante Beispiele sind das Trypanothion-System bei Trypanosomen, der Mangel an Katalase und Glutathionperoxidase in Trypanosomen und *P.falciparum* oder das Vorkommen eines einzigartigen Proteins wie Plasmoredoxin in Malariaerreger.^[141] Aber auch subtilere Verschiedenheiten – wie sie sich in den nur wenig konservierten Wandstrukturen der zentralen Höhle von Human-Glutathionreduktase und trypanosomaler Trypanothionreduktase oder in der unterschiedlichen Chemie der C-terminalen Redoxzentren bei Human- und *P.falciparum*-Thioredoxinreduktase zeigen – sind richtungsweisend für die zukünftige Wirkstoffentwicklung.

Gleichzeitig gibt es aber überzeugende Argumente dafür, die Human-Glutathionreduktase der parasitisierten Erythrozyten als Target nicht außer Acht zu lassen.^[77,200] Klinische und epidemiologische Beobachtungen sowie pharmakologische Studien zeigen nämlich, dass eine niedrige Aktivität der Human-Glutathionreduktase – und dieser niedrige Enzymspiegel ist üblicherweise auf Erythrozyten beschränkt – die Erythrozytenfunktion nicht signifikant beeinflusst, wohl aber einen Schutz gegen Malaria bietet.^[143,181,201] Ein weiterer Aspekt ist, dass die Entwicklung einer Resistenz gegen Wirkstoffe sehr unwahrscheinlich ist, wenn ein Wirtsenzym als pharmakologisches Target gewählt wird.^[135–137]

Im Falle von Trypanosomen-Infektionen ist das am intensivsten untersuchte Target die Trypanothionreduktase, wobei allerdings die extreme Geräumigkeit des aktiven Zentrums die Formulierung quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen für Liganden erschwert. Eine Reihe allgemeiner Aspekte sollte beachtet werden, bevor ein Enzym als potenzielles Zielmolekül ausgewählt wird. Um einen letalen Effekt auf die Erreger zu erreichen, ist es oft notwendig, die Enzymaktivität fast vollständig zu unterdrücken. Bei den *T. brucei*-Blutstromformen muss beispielsweise die Trypanothionreduktase zu mehr als 95 % gehemmt werden, um einen Wachstumsstop und erhöhte Sensibilität gegen oxidative Stress hervorzurufen.^[202] Für die Entwicklung eines reversiblen Liganden des Enzyms E kann das Massenwirkungsgesetz ($K_{diss} = [E][I]/[EI] = k_{diss}/k_{ass}$) als Richtlinie dienen, um die erforderliche Konzentration an freiem Wirkstoff abzuschätzen. 95 % Inhibition ist erst bei $[I] = 20K_{diss}$ erreicht. Reversibel bindende Inhibitoren sollten demnach ein K_{diss} von < 10 nm haben; anderenfalls muss die Wirkstoffkonzentration sehr hoch sein, um den inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex in vivo aufrechtzuerhalten.^[107]

Die meisten irreversiblen Inhibitoren wirken durch kovalente Modifikation von essentiellen Aminosäureresten eines Proteins. Liganden, die reversibel an das Enzym binden, aber sehr langsam abdissoziieren, wirken ebenfalls wie irreversible Inhibitoren. Eine Geschwindigkeitskonstante $k_{diss} < 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ bedeutet beispielsweise, dass der Enzym-Inhibitor-Komplex eine Halbwertszeit von mehr als 19 Stunden hat. Liganden, die einen langsam Konformationswechsel nach der Bindung induzieren („tight binding inhibitors“), sind als potenzielle Wirkstoffe ebenfalls vielversprechend.^[203]

Bei irreversibler Inhibition ist die In-vivo-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Zielenzyms ein wichtiger Parameter. Beträgt $t_{1/2}$ des Enzyms nur wenige Minuten, lässt sich die Enzymaktivität unter Therapiebedingungen nicht nachhaltig ausschalten. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Hemmung bestimmter Ornithindecarboxylasen durch Eflornithin (siehe Abschnitt 1). Für keines der Flavoenzyme der Parasiten, die hier diskutiert wurden, ist die In-vivo-Halbwertszeit bekannt. Da sie aber Haushaltseenzyme sind, ist die Annahme berechtigt, dass ihr Umsatz in vivo langsam ist.

Als äußerst interessante Wirkstoffe gelten subversive Substrate (Sabotage-Inhibitoren) der Disulfidreduktasen. Für eine Serie von Naphthochinonen wurde eine Korrelation zwischen ihrer Aktivität als subversivem Substrat der Trypanothionreduktase und ihrer trypanoziden Wirkung nachgewiesen.^[115] Die multiplen Effekte solcher subversiver

Agentien – Inhibition der $\text{T}(\text{SH})_2$ -Regeneration, Erniedrigung des $\text{T}(\text{SH})_2/\text{TS}_2$ -Verhältnisses, Verschwendungen von NADPH und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies – sollten einen großen Einfluss auf das Redoxmilieu im Parasiten haben. Darüber hinaus fungieren subversive Inhibitoren als Katalysatoren und können daher auch in substöchiometrischen Konzentrationen wirksam sein.^[107]

Anhang: Zur intrazellulären Redoxhomöostase

Das reduzierende Milieu als chemisches Fossil. Das reduzierende Milieu im Zellinnern ist eine gut regulierte biochemische Größe. Das hohe $2\text{GSH}/\text{GSSG}$ -Verhältnis von etwa 100 unterscheidet sich wahrscheinlich nicht von den Dithiol/Disulfid-Verhältnissen urzeitlicher Zellen, wie sie in der reduzierenden Atmosphäre vor 2 Milliarden Jahren existierten.^[204] Thiolfunktionen in Proteinen und Coenzymen sind unabdingbar für das zelluläre Leben und müssen massiv geschützt werden. Ohne redoxpuffernde Mechanismen kommt es zur irreversiblen Autoxidation intrazellulärer Thiole, wobei Sulfinate und Sulfonate zu den vorherrschenden Schwefelverbindungen werden.

Redoxmilieu. Schafer und Buettner definieren das gepufferte Redoxmilieu („redox environment“) in einem Zellkompartiment gemäß Gleichung (12) (E_i ist das Redoxpotential eines gegebenen Redoxsystems).^[205]

$$\text{Redoxmilieu} = \sum E_i [\text{reduzierende Spezies}] \quad (12)$$

In cytosolischen Bereichen vieler Organismen einschließlich *P. falciparum* sind die biologisch relevanten Spezies: NADPH, reduziertes Thioredoxin, GSH und Ascorbat (Abbildung 6). Die GSH-Konzentration (1–10 mM) liegt viel höher als die von NADPH (100 μM) und Thioredoxin ($\leq 50 \mu\text{M}$); dies bedeutet, dass Glutathion der Hauptredoxpuffer in den Parasiten ist – wie übrigens in den meisten bekannten Organismen.

Der Beitrag von GSH wäre $(2.5 \text{ mM})(-240 \text{ mV}) = -600 \text{ mV mm}$ und damit um Größenordnungen höher als für irgendein anderes Redoxsystem, mit dem es verknüpft ist. Das Glutathionsystem hat den zusätzlichen biologischen Vorteil, dass es dank der Glutathionreduktase-katalysierten Reaktion unmittelbar das NADPH als Elektronenquelle verwenden kann [Gl. (2)].^[161,181] Im Cytosol von *P. falciparum*-Trophozoiten hält diese Reaktion einen $2[\text{GSH}]/\text{GSSG}$ -Quotienten von 120:1 aufrecht.^[167] Indirekt fördert die Glutathionreduktase also GSH-abhängige Reaktionen und hemmt Prozesse, bei denen GSSG das Substrat ist. Die einzigen Proteine, die ihre Elektronen direkt von NADPH beziehen, sind die Thioredoxine – in einer von Thioredoxin-reduktase katalysierten Reaktion [Gl. (5)].^[86,140,206]

Potentielle elektrische Energie des Glutathionsystems. Man kann das reduzierende Milieu auch bezogen auf die potentielle Energie beschreiben. Die Energie pro Volumeneinheit wird durch Gleichung (13) beschrieben und hat die Einheiten Joule Liter $^{-1}$ oder Volt Coulomb Liter $^{-1}$.

$$\Delta G/V = -\Delta E Q/V = -n \Delta E F/V \quad (13)$$

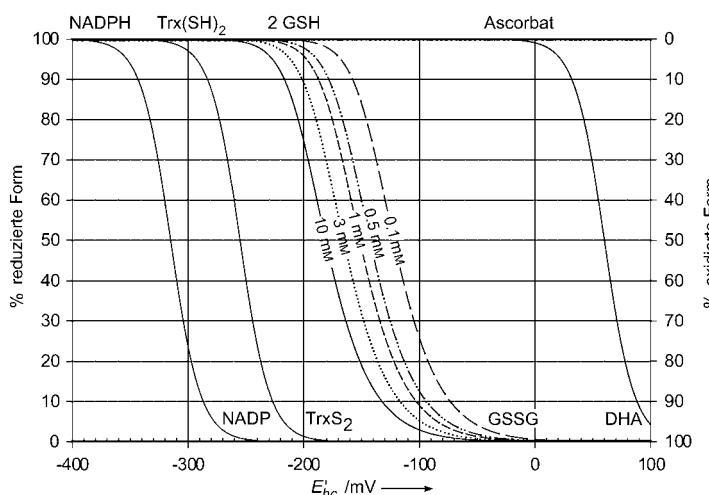


Abbildung 6. Redoxsysteme in Trophozoiten aus *P. falciparum*. Das Diagramm wurde mit der Nernst-Gleichung für unterschiedliche Redoxsysteme erstellt. Mit Ausnahme des Glutathionsystems basieren die Kurven auf der Gleichung $E'_{hc} = E^\circ + 29.6 \lg([{\text{oxidierte Form}}]/[{\text{reduzierte Form}}])$. Bei 25 °C und pH 7.0 beträgt $E^\circ = -315$ mV für NADP/NADPH, -255 mV für *P. falciparum*-Thioredoxin (TrxS₂/Trx(SH)₂)^[146] und $+80$ mV für Dehydroascorbat/Ascorbat.^[209] Im Falle des Glutathion-Redoxsystems hängt das Redoxpotential aber nicht nur vom GSSG/GSH-Verhältnis ab, sondern auch von der GSH-Konzentration. Die entsprechenden Kurven für unterschiedliche Glutathion-Konzentrationen (10, 3, 1, 0.5 und 0.1 mM GSH) wurden mit den Gleichungen $E'_{hc} = -240 - 29.6 \lg([{\text{GSH}}]/[{\text{GSSG}}]) - 29.6 \lg[{\text{GSH}}]$ mV und $[\text{Gesamtglutathion}] = [G] = 2[\text{GSSG}] + [\text{GSH}]$ berechnet. Wenn diese Gleichungen angewendet werden, müssen [GSSG] und [GSH] in molaren (nicht millimolaren!) Einheiten eingesetzt werden.

Da n die Stoffmenge an Elektronen ist, die vom GSH übertragen werden können, ersetzen wir n/V durch $2c$ [Gl. (14)]:

$$\Delta G/V = -n/V \Delta E F = -2c F \Delta E \quad (14)$$

c steht für die GSH-Konzentration, F ist die Faraday-Konstante ($96\,500 \text{ Cmol}^{-1}$) und ΔE die Potentialdifferenz zwischen dem Glutathion-Redoxsystem und dem Redoxsystem, mit dem es interagiert. ΔG ist somit der Energiebeitrag, mit dem das Glutathionsystem das reduzierende Milieu stabilisiert. Ein Arbeitsbeispiel: Wenn es zu einem spontanen Potentialanstieg eines assoziierten Redoxsystems um 0.03 V kommt, dann beträgt die Reduktionsenergie pro Volumen: $\Delta G/V = -2 \times 2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 96\,500 \text{ Cmol}^{-1} \times 0.03 \text{ V} = -15 \text{ JL}^{-1}$. Dies entspricht der Hydrolyseenergie von 0.5 mmol ATP pro Liter.

Die Nernst-Gleichung für das GSSG/2 GSH-System. Das intrazelluläre Redoxpotential E' , das durch das Glutathion-System aufrechterhalten wird, kann mit der Nernst-Gleichung abgeschätzt werden. Das Standard-Redoxpotential E° des GSSG/2 GSH-Systems bei pH 7.0, physiologischer Ionenstärke und 25 °C wurde zu -240 mV bestimmt.^[86,205] Die Nernst-Gleichung des Halbzellenpotentials für das GSSG/2 GSH-System ist durch Gleichung (15) gegeben.

$$E' \text{ (in mV)} = -240 - 59.1/2 \lg([{\text{GSH}}]^2/[{\text{GSSG}}]) \quad (15)$$

Durch Anwendung der Logarithmenregeln erhalten wir die handlicheren Formen (16) und 17.

$$E' \text{ (in mV)} = -240 - 29.6 \lg([{\text{GSH}}]/[{\text{GSSG}}]) - 29.6 \lg[{\text{GSH}}] \quad (16)$$

$$E' \text{ (in mV)} = -240 + 29.6 \lg[{\text{GSSG}}] - 59.1 \lg[{\text{GSH}}] \quad (17)$$

Setzen wir die für Trophozoiten aus *P. falciparum* gefundenen Werte ein (2.39 mM GSH, 8.4 μM GSSG),^[167] erhalten wir als Redoxpotential $E' = -240 + 29.6 \lg[8.4 \times 10^{-6}] - 59.1 \lg[2.39 \times 10^{-3}] = -235$ mV. Für quasi-physiologische Bedingungen (pH 7.2 und 37 °C) lässt sich ein Wert von -265 mV abschätzen.^[207]

Gleichung (15) enthält den quadratischen Term $[{\text{GSH}}]^2$. Ein quadratischer Term in einer biochemischen Gleichung hat oft eine biologische Bedeutung; in der Tat könnte der $[{\text{GSH}}]^2$ -Term dazu beigetragen haben, das Glutathionsystem als Hauptredoxpuffer im Laufe der Evolution zu etablieren. Der quadratische Term impliziert, dass das Redoxpotential E' nicht nur vom Verhältnis $[{\text{reduzierte Form}}]/[{\text{oxidierte Form}}]$ abhängt, wie es bei den Redoxpaaren NADPH/NADP oder Trx(SH)₂/TrxS₂ der Fall ist, sondern auch von der absoluten Konzentration des GSH (siehe Gleichung (16) und Abbildung 6). Ein Sinken der GSH-Konzentration von 2 mM auf 100 μM führt zu einem Anstieg von E' um etwa 40 mV, auch wenn das $[{\text{GSH}}]/[{\text{GSSG}}]$ -Verhältnis gleich bleibt. Solche drastischen Veränderungen der GSH-Konzentration kommen vor, wenn sich Zellen in eine sporenhähnliche Ruheform begeben oder wenn das Enzym Glutathionreduktase insuffizient wird, beispielsweise bei plötzlichem Stress der Zellen durch Oxidantien oder Enzyminhibitoren.^[146,170,208]

Proteinthiole als Nanoschalter. Welche biologische Funktion hat ein Redoxmilieu mit regulierbarem Redoxpotential? Betrachten wir ein Cystein-Paar mit dem Redoxpotential E° . Es befindet sich ganz überwiegend im Protein(SH)₂-Zustand, solange das umgebende Redoxpotential E' mehr als 30 mV unter dem E° -Wert liegt, hingegen hauptsächlich in der ProteinS₂-Form, wenn das Redoxpotential E' 30 mV höher als E° ist.^[205] Protein(SH)₂ und ProteinS₂ können als ineinander überführbare Redoxformen des Proteins angesehen werden oder, wenn man das Protein als Nanoschalter betrachtet, als zwei Positionen dieses Schalters.

Dieser Schaltreffekt lässt sich durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung für das Protein(SH)₂/ProteinS₂-Paar illustrieren [Gl. (18); E° und E' in mV]:

$$10^{(E' - E^\circ)/29.6} = [\text{ProteinS}_2]/[\text{Protein(SH)}_2] \quad (18)$$

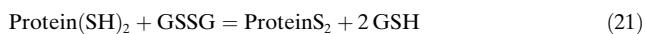
Die äquivalenten Gleichungen (19) und (20) für H⁺- und Ca²⁺-kontrollierte Schalter lauten:

$$10^{(pH - pK_a)} = [A^-]/[HA] \quad (19)$$

$$10^{(pCa - pK_a)} = [\text{freies Protein}]/[\text{Ca}^{2+}\text{-Protein}] \quad (20)$$

In jedem Fall bestimmt eine biologisch kontrollierte Größe (Redoxmilieu, pH, pCa) die alternativen Schalterpositionen, also Protein(SH)₂/ProteinS₂, A⁻/HA oder freies Protein/Ca²⁺-Protein-Komplex.

Zwei häufige Typen der gegenseitigen Umwandlung von Redoxformen sind in den Gleichungen (21) und (22) gezeigt.



Gleichung (21) bezieht sich auf vicinale Cys-Reste, die sich auch in verschiedenen Untereinheiten eines Proteinkomplexes befinden können, während Reaktion (22) für isolierte Thiolgruppen gilt. Die Reaktionen scheinen selektiv zu sein, sodass nur bestimmte Cystein-Reste betroffen sind. Hin- und Rückreaktion können jeweils durch unterschiedliche Glutaredoxine gesteuert sein.^[148] Studien zur In-vivo-Proteinglutathionylierung sind erst seit kurzem möglich, wobei zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie die wichtigsten analytischen Werkzeuge sind.

Zu prüfen ist mit diesen Methoden, ob auch die Phasen von Parasitenwachstum und Differenzierung sowie die pathophysiologische Wechselwirkungen zwischen Wirtszelle und Parasit durch Redox-Nanoschalter und damit durch das Glutathion-abhängige Redoxmilieu gesteuert werden.^[206,210] In Säugerzellen variiert das Redoxpotential des GSSG/2GSH-Paars mit dem zellbiologischen Status. Werte um -240 mV, -210 mV und -170 mV korrelieren dabei mit den Phasen Zellwachstum, Zelldifferenzierung und programmierter Zelltod (Apoptose). Bei nekrotischen Zellen ist das Redoxpotential sogar höher als -150 mV.^[205]

In Analogie zu reversibel phosphorylierbaren proteinständigen OH-Gruppen kann man somit reversibel oxidierbare proteinständige SH-Gruppen als Nanoschalter für biologische Prozesse betrachten.^[211,212] Ein spezifisches Disulfid, ein Sulfenat oder die S-Glutathionylierung eines Proteins können darüber hinaus Hysterese-Verhalten zeigen, was signalisiert, dass die Zelle unter oxidativem Stress gestanden hat. Dies ist z.B. der Fall, wenn ein Thiol oder Dithiol eines Transkriptionsfaktors oxidiert wurde. Wie lange ein Protein nach einer transienten Stressexposition in der oxidierten Form vorliegt, hängt unter anderem davon ab, ob es ein Substrat von Glutaredoxinen oder Thioredoxinen ist oder nicht (Abbildung 2b). Auf diese Weise kann die Sulfenat-Bildung mit anschließender Glutathionylierung und Deglutathionylierung das Grundmuster der Redoxkontrolle modifizieren und zusätzlich kinetisch-regulatorische Elemente einführen.^[210,213]

Addendum (15. November 2004)

Während der Drucklegung dieses Aufsatzes sind relevante Publikationen zu antioxidativen Systemen erschienen. Ein neues proteingestütztes Verfahren ermöglicht die direkte Beobachtung der Disulfidbildung und damit die dynamische Erfassung des 2[GSH]/[GSSG]-Quotienten im Cytosol (siehe

Abschnitt 6.1).^[214] Das antioxidative Proteinnetzwerk in *P. falciparum* (siehe Abschnitt 6) wurde durch Transcriptom-Analyse untersucht.^[215] Eine wichtige Entdeckung ist die reversible Cysteinsulfat-Bildung bei Peroxiredoxinen,^[216,217] die den Schleusentor-Mechanismus bei extrem hoher Peroxid-Belastung erklären kann (siehe Abschnitt 6.3). Eine Matrix für das Wirkstoff-Design, die zwei interagierende Bindungszentren des Mepacrins in der Trypanothionreduktase repräsentiert (Abschnitt 4.1.2),^[218] und die unkompetitive Inhibition von Glutathionreduktase durch Naphthochinone^[219] ergeben neue Ansatzpunkte für Disulfidreduktasen als Targets in einzelligen Parasiten. Weitere Fortschritte in der Chemie und Pharmakologie von Disulfidreduktasen (Abschnitte 4.1 und 7) sind in einer Übersicht von Argyrou und Blanchard zusammengestellt.^[220] Erste klinische Ergebnisse über Methylenblau als Bestandteil der Antimalaria-Kombination BlueCQ wurden vor kurzem veröffentlicht.^[221] Zurzeit laufen in Burkina Faso klinische Studien zur Dosis-Optimierung.

Unsere Arbeiten werden durch den Sonderforschungsbereich 544 „Kontrolle tropischer Infektionskrankheiten“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (PrB3 an L.K.S. und PrB2 an R.H.S.). Holger Bauer (Arbeitsgruppe Davioud-Charvet) ist Mitarbeiter im Gemeinschaftsprojekt „Neue Chemie“ des CNRS und der DFG.

Eingegangen am 24. Oktober 2003,
veränderte Fassung am 4. Juni 2004

- [1] M. H. Gelb, W. G. Hol, *Science* **2002**, *297*, 343–344.
- [2] J. Keiser, A. Stich, C. Burri, *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 42–49.
- [3] H. P. de Koning, *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31*, 512–522.
- [4] E. L. Vansterkenburg, I. Coppens, J. Wilting, O. J. Bos, M. J. Fischer, L. H. Janssen, F. R. Opperdoes, *Acta Trop.* **1993**, *54*, 237–250.
- [5] A. Pal, B. S. Hall, M. C. Field, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *122*, 217–221.
- [6] X. G. Gao, G. Garza-Ramos, E. Saavedra-Lira, N. Cabrera, M. T. De Gomez-Puyou, R. Perez-Montfort, A. Gomez-Puyou, *Biochem. J.* **1998**, *332*, 91–96.
- [7] R. J. Burchmore, P. O. Ogbunude, B. Enanga, M. P. Barrett, *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 256–267.
- [8] H. P. de Koning, S. M. Jarvis, *Acta Trop.* **2001**, *80*, 245–250.
- [9] N. S. Carter, A. H. Fairlamb, *Nature* **1993**, *361*, 173–176.
- [10] M. P. Barrett, A. H. Fairlamb, *Parasitol. Today* **1999**, *15*, 136–140.
- [11] A. C. Coelho, S. M. Beverley, P. C. Cotrim, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *130*, 83–90.
- [12] B. Nguyen, M. P. Lee, D. Hamelberg, A. Joubert, C. Bailly, R. Brun, S. Neidle, W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13680–13681.
- [13] H. Denise, C. Giroud, M. P. Barrett, T. Baltz, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 339–346.
- [14] M. A. Phillips, P. Coffino, C. C. Wang, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8721–8727.
- [15] R. Docampo, A. O. Stoppani, *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *197*, 317–321.
- [16] L. J. Nunez-Vergara, M. E. Ortiz, S. Bollo, J. A. Squella, *Chem.-Biol. Interact.* **1997**, *106*, 1–14.
- [17] M. Masana, E. G. de Toranzo, J. A. Castro, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 1041–1045.

- [18] E. G. Diaz de Toranzo, J. A. Castro, B. M. Franke de Cazzulo, J. J. Cazzulo, *Experientia* **1988**, *44*, 880–881.
- [19] M. P. Barrett, *Lancet* **1999**, *353*, 1113–1114.
- [20] P. Mäser, C. Sütterlin, A. Kralli, R. Kaminsky, *Science* **1999**, *285*, 242–244.
- [21] A. H. Fairlamb, N. S. Carter, M. Cunningham, K. Smith, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**, *53*, 213–222.
- [22] N. V. Grishin, A. L. Osterman, H. B. Brooks, M. A. Phillips, E. J. Goldsmith, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15174–15184.
- [23] M. Iten, H. Mett, A. Evans, J. C. Enyaru, R. Brun, R. Kaminsky, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1922–1925.
- [24] T. L. Byers, T. L. Bush, P. P. McCann, A. J. Bitonti, *Biochem. J.* **1991**, *274*, 527–533.
- [25] C. J. Bacchi, J. Garofalo, D. Mockenhaupt, P. P. McCann, K. A. Diekema, A. E. Pegg, H. C. Nathan, E. A. Mullaney, L. Chunosoff, A. Sjoerdsma, S. H. Hutner, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1983**, *7*, 209–225.
- [26] A. H. Fairlamb, G. B. Henderson, C. J. Bacchi, A. Cerami, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1987**, *24*, 185–191.
- [27] F. Li, S. B. Hua, C. C. Wang, K. M. Gottesdiener, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *78*, 227–236.
- [28] H. Cerecetto, M. Gonzalez, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1187–1213.
- [29] S. N. Moreno, R. Docampo, R. P. Mason, W. Leon, A. O. Stoppani, *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 585–591.
- [30] A. Fournet, V. Munoz, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1215–1237.
- [31] R. Docampo, S. N. Moreno, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2001**, *1*, 51–61.
- [32] M. B. Martin, J. S. Grimley, J. C. Lewis, H. T. Heath III, B. N. Bailey, H. Kendrick, V. Yardley, A. Caldera, R. Lira, J. A. Urbina, S. N. Moreno, R. Docampo, S. L. Croft, E. Oldfield, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 909–916.
- [33] R. Docampo, *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1157–1164.
- [34] J. A. Urbina, *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 287–295.
- [35] M. J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M. S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser, B. Barrell, *Nature* **2002**, *419*, 498–511.
- [36] G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244–251.
- [37] A. M. Denli, G. J. Hannon, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 196–201.
- [38] A. H. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B. T. Chait, A. Cerami, *Science* **1985**, *237*, 1485–1487.
- [39] H. Schmidt, R. L. Krauth-Siegel, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46329–46336.
- [40] E. M. Tamayo, A. Iturbe, E. Hernández, G. Hurtado, M. L. Gutiérrez-X., J. L. Rosales, M. Woolery, R. N. Ondarza, *Bio-technol. Appl. Biochem.*, im Druck.
- [41] F. Montrichard, F. Le Guen, D. L. Laval-Martin, E. Davioud-Charvet, *FEBS Lett.* **1999**, *442*, 29–33.
- [42] T. T. Huynh, V. T. Huynh, M. A. Harmon, M. A. Phillips, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39794–39800.
- [43] M. R. Ariyanayagam, A. H. Fairlamb, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *84*, 111–121.
- [44] K. J. Hunter, S. A. Le Quesne, A. H. Fairlamb, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1019–1027.
- [45] S. L. Oza, M. R. Ariyanayagam, A. H. Fairlamb, *Biochem. J.* **2002**, *364*, 679–686.
- [46] M. Comini, U. Menge, L. Flohé, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 653–656.
- [47] S. L. Oza, E. Tetaud, M. R. Ariyanayagam, S. S. Warnon, A. H. Fairlamb, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35853–35861.
- [48] M. R. Ariyanayagam, S. L. Oza, A. Mehlert, A. H. Fairlamb, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27612–27619.
- [49] H. S. Spies, D. J. Steenkamp, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 203–213.
- [50] D. J. Steenkamp, H. S. Spies, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *223*, 43–50.
- [51] M. R. Ariyanayagam, A. H. Fairlamb, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *115*, 189–198.
- [52] R. N. Vogt, D. J. Steenkamp, *Biochem. J.* **2003**, *371*, 49–59.
- [53] A. H. Fairlamb, A. Cerami, *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 695–729.
- [54] H. F. Gilbert, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1990**, *63*, 69–172.
- [55] M. Moutiez, D. Meziane-Sherif, M. Aumercier, C. Sergheraert, A. Tartar, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2641–2644.
- [56] C. Fraser-L'Hostis, F. Defrise-Quertain, D. Coral, J. Deshusses, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1039–1046.
- [57] L. Flohé, P. Steinert, H. J. Hecht, B. Hofmann, *Methods Enzymol.* **2002**, *347*, 244–258.
- [58] H. Budde, L. Flohé, H. J. Hecht, B. Hofmann, M. Stehr, J. Wissing, H. Lunsdorf, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 619–633.
- [59] E. Nogoceke, D. U. Gommel, M. Kiess, H. M. Kalisz, L. Flohé, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 827–836.
- [60] M. Dormeyer, N. Reckenfelderbäumer, H. Lüdemann, R. L. Krauth-Siegel, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10602–10606.
- [61] M. Ouellette, E. Hettema, D. Wust, F. Fase-Fowler, P. Borst, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1009–1016.
- [62] D. Légaré, B. Papadopoulou, G. Roy, R. Mukhopadhyay, A. Haimeur, S. Dey, K. Grondin, C. Brochu, B. P. Rosen, M. Ouellette, *Exp. Parasitol.* **1997**, *87*, 275–282.
- [63] D. Légaré, D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou, M. Ouellette, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26301–26307.
- [64] S. Yan, F. Li, K. Ding, H. Sun, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 689–697.
- [65] R. Mukhopadhyay, S. Dey, N. Xu, D. Gage, J. Lightbody, M. Ouellette, B. P. Rosen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10383–10387.
- [66] S. K. Shahi, R. L. Krauth-Siegel, C. E. Clayton, *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 1129–1138.
- [67] A. Boveris, H. Sies, E. E. Martino, R. Docampo, J. F. Turrens, A. O. Stoppani, *Biochem. J.* **1980**, *188*, 643–648.
- [68] E. Tetaud, C. Giroud, A. R. Prescott, D. W. Parkin, D. Baltz, N. Bateau, T. Baltz, A. H. Fairlamb, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *116*, 171–183.
- [69] S. R. Wilkinson, D. J. Meyer, J. M. Kelly, *Biochem. J.* **2000**, *352*, 755–761.
- [70] H. Hillebrand, A. Schmidt, R. L. Krauth-Siegel, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6809–6815.
- [71] S. R. Wilkinson, D. Horn, S. R. Prathalingam, J. M. Kelly, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31640–31646.
- [72] S. R. Wilkinson, S. O. Obado, I. L. Mauricio, J. M. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13453–13458.
- [73] R. L. Krauth-Siegel, S. K. Meiering, H. Schmidt, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 539–549.
- [74] a) L. Thomson, A. Denicola, R. Radi, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *412*, 55–64; b) M. Trujillo, H. Budde, M. D. Pineyro, M. Stehr, C. Robello, L. Flohé, R. Radi, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34175–34182.
- [75] T. Irsch, R. L. Krauth-Siegel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 22209–22217.
- [76] S. E. Austin, M. O. Khan, K. T. Douglas, *Drug Des. Discov.* **1999**, *16*, 5–23.
- [77] R. L. Krauth-Siegel, G. H. Coombs, *Parasitol. Today* **1999**, *15*, 404–409.

- [78] S. Müller, G. H. Coombs, R. D. Walter, *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 242–249.
- [79] S. Müller, E. Liebau, R. D. Walter, R. L. Krauth-Siegel, *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 320–328.
- [80] B. A. Arrick, O. W. Griffith, A. Cerami, *J. Exp. Med.* **1981**, *153*, 720–725.
- [81] P. Kapoor, M. Sachdev, R. Madhubala, *Trop. Med. Int. Health* **2000**, *5*, 438–442.
- [82] S. L. Oza, M. R. Ariyanayagam, N. Aitcheson, A. H. Fairlamb, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *131*, 25–33.
- [83] S. Chen, C.-H. Lin, C. T. Walsh, J. K. Coward, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 505–510.
- [84] K. Amssoms, S. L. Oza, E. Ravaschino, A. Yamani, A. Lambeir, P. Rajan, G. Bal, J. Rodriguez, A. H. Fairlamb, K. Augustyns, A. Haemers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2553–2556.
- [85] A. Schmidt, R. L. Krauth-Siegel, *Curr. Top Med. Chem.* **2002**, *2*, 1239–1259.
- [86] C. H. Williams, Jr. in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, Vol. 3 (Hrsg.: F. Müller), CRC Press, Boca Raton, **1992**, S. 121–211.
- [87] B. N. Leichus, M. Bradley, K. Nadeau, C. T. Walsh, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6414–6420.
- [88] R. Zheng, N. Cenas, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12697–12703.
- [89] H. Bauer, V. Massey, L. D. Arscott, R. H. Schirmer, D. A. Ballou, C. H. Williams, Jr., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33020–33028.
- [90] V. S. Stoll, S. J. Simpson, R. L. Krauth-Siegel, C. T. Walsh, E. F. Pai, *Biochemistry* **1997**, *36*, 6437–6447.
- [91] E. M. Jacoby, I. Schlichting, C. B. Lantwin, W. Kabsch, R. L. Krauth-Siegel, *Proteins* **1996**, *24*, 73–80.
- [92] J. Kuriyan, X. P. Kong, T. S. Krishna, R. M. Sweet, N. J. Murgolo, H. Field, A. Cerami, G. B. Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8764–8768.
- [93] W. N. Hunter, S. Bailey, J. Habash, S. J. Harrop, J. R. Helliwell, T. Aboagye-Kwarteng, K. Smith, A. H. Fairlamb, *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 322–333.
- [94] C. B. Lantwin, I. Schlichting, W. Kabsch, E. F. Pai, R. L. Krauth-Siegel, *Proteins* **1994**, *18*, 161–173.
- [95] S. Bailey, K. Smith, A. H. Fairlamb, W. N. Hunter, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 67–75.
- [96] C. S. Bond, Y. Zhang, M. Berriman, M. L. Cunningham, A. H. Fairlamb, W. N. Hunter, *Structure Fold. Des.* **1999**, *7*, 81–89.
- [97] J. A. Ponasik, C. Strickland, C. Faerman, S. Savides, P. A. Karplus, B. Ganem, *Biochem. J.* **1995**, *311*, 371–375.
- [98] H. K. Smith, M. Bradley, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 326–332.
- [99] Z. Li, M. W. Fennie, B. Ganem, M. T. Hancock, M. Kobašlija, D. Rattendi, C. J. Bacchi, M. C. O'Sullivan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 251–254.
- [100] S. Bonse, C. Santelli-Rouvier, J. Barbe, R. L. Krauth-Siegel, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5448–5454.
- [101] T. J. Benson, J. H. McKie, J. Garforth, A. Borges, A. H. Fairlamb, K. T. Douglas, *Biochem. J.* **1992**, *286*, 9–11.
- [102] M. O. Khan, S. E. Austin, C. Chan, H. Yin, D. Marks, S. N. Vaghjiani, H. Kendrick, V. Yardley, S. L. Croft, K. T. Douglas, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3148–3156.
- [103] S. Girault, S. Baillet, D. Horvath, V. Lucas, E. Davioud-Charvet, A. Tartar, C. Sergheraert, *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 39–52.
- [104] S. Girault, T. E. Davioud-Charvet, L. Maes, J. F. Dubremetz, M. A. Debreu, V. Landry, C. Sergheraert, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 837–846.
- [105] B. Bonnet, D. Soulez, E. Davioud-Charvet, V. Landry, D. Horvath, C. Sergheraert, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1249–1256.
- [106] P. A. Karplus, R. L. Krauth-Siegel, R. H. Schirmer, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *171*, 193–198.
- [107] R. H. Schirmer, J. G. Müller, R. L. Krauth-Siegel, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 153–157; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 141–154.
- [108] H. Gallwitz, S. Bonse, A. Martinez-Cruz, I. Schlichting, K. Schumacher, R. L. Krauth-Siegel, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 364–372.
- [109] S. Bonse, J. M. Richards, S. A. Ross, G. Lowe, R. L. Krauth-Siegel, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4812–4821.
- [110] C. J. Hamilton, A. Saravanamuthu, A. H. Fairlamb, I. M. Eggleston, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3683–3693.
- [111] N. Cenas, D. Bironaité, E. Dickancaite, Z. Anusevicius, J. Sarlauskas, J. S. Blanchard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 224–229.
- [112] G. B. Henderson, P. Ulrich, A. H. Fairlamb, I. Rosenberg, M. Pereira, M. Sela, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5374–5378.
- [113] M. C. Jockers-Scherübl, R. H. Schirmer, R. L. Krauth-Siegel, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 267–272.
- [114] K. Blumenstiel, R. Schöneck, V. Yardley, S. L. Croft, R. L. Krauth-Siegel, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1791–1799.
- [115] L. Salmon-Chemin, E. Buisine, V. Yardley, S. Kohler, M. A. Debreu, V. Landry, C. Sergheraert, S. L. Croft, R. L. Krauth-Siegel, E. Davioud-Charvet, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 548–565.
- [116] K. Augustyns, K. Amssoms, A. Yamani, P. K. Rajan, A. Haemers, *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1117–1141.
- [117] C. D'Silva, S. Daunes, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2002**, *11*, 217–231.
- [118] R. L. Krauth-Siegel, O. Inhoff, *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, 77–85.
- [119] C. J. Hamilton, A. Saravanamuthu, I. M. Eggleston, A. H. Fairlamb, *Biochem. J.* **2003**, *369*, 529–537.
- [120] D. J. Hammond, S. L. Croft, J. Hogg, W. E. Gutteridge, *Acta Trop.* **1986**, *43*, 367–378.
- [121] K. Chibale, H. Haupt, H. Kendrick, V. Yardley, A. Saravanamuthu, A. H. Fairlamb, S. L. Croft, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2655–2657.
- [122] C. Chan, H. Yin, J. Garforth, J. H. McKie, R. Jaouhari, P. Speers, K. T. Douglas, P. J. Rock, V. Yardley, S. L. Croft, A. H. Fairlamb, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 148–156.
- [123] D. Horvath, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2412–2423.
- [124] a) R. H. Schirmer, T. Schöllhammer, G. Eisenbrand, R. L. Krauth-Siegel, *Free Radical Res. Commun.* **1987**, *3*, 3–12; b) M. Bilzer, R. L. Krauth-Siegel, R. H. Schirmer, T. P. Akerboom, H. Sies, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 373–378.
- [125] K. Becker, R. H. Schirmer, *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 173–188.
- [126] O. Inhoff, J. M. Richards, J. W. Brier, G. Lowe, R. L. Krauth-Siegel, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4524–4530.
- [127] T. Nozaki, J. C. Engel, J. A. Dvorak, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 111–117.
- [128] J. D. Maya, S. Bollo, L. J. Nunez-Vergara, J. A. Squella, Y. Repetto, A. Morello, J. Perie, G. Chauviere, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 999–1006.
- [129] A. Argyrou, G. Sun, B. A. Palfrey, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2218–2228.
- [130] N. K. Cenas, G. A. Rakauskiene, J. J. Kulys, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *973*, 399–404.
- [131] B. K. Kubata, Z. Kabututu, T. Nozaki, C. J. Munday, S. Fukuzumi, K. Ohkubo, M. Lazarus, T. Maruyama, S. K. Martin, M. Duszenko, Y. Urade, *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1241–1251.
- [132] A. Nordhoff, *Dissertation*, Universität Heidelberg, **1995**.
- [133] P. A. Karplus, E. F. Pai, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *178*, 693–703.
- [134] P. Campbell, D. Butler (Hrsg.), *Nature* **2004**, *430*, 923–946.
- [135] *Antimalarial Chemotherapy. Mechanisms of Action, Resistance and New Directions in Drug Discovery* (Hrsg.: P. J. Rosenthal), Humana Press, Totowa, **2001**.
- [136] R. G. Ridley, *Nature* **2002**, *415*, 686–693.

- [137] J. Wiesner, R. Ortmann, H. Jomaa, M. Schlitzer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5432–5451; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5274–5293.
- [138] K. Rieckmann, Q. Cheng, *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 293; G. C. Coles, *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 293–294.
- [139] I. A. Clark, W. B. Cowden in *Oxidative Stress* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, **1985**, S. 131–149.
- [140] S. Müller, T. W. Gilberger, Z. Krnajski, K. Lüersen, S. Meierjohann, R. D. Walter, *Protoplasma* **2001**, *217*, 43–49.
- [141] K. Becker, S. M. Kanzok, R. Iozef, M. Fischer, R. H. Schirmer, S. Rahlfs, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1057–1064.
- [142] R. M. Luond, J. H. McKie, K. T. Douglas, M. J. Dascombe, J. Vale, *J. Enzyme Inhib.* **1998**, *13*, 327–345.
- [143] G. Giribaldi, D. Ulliers, F. Mannu, P. Arese, F. Turrini, *Br. J. Haematol.* **2001**, *113*, 492–499.
- [144] A. Irmler, A. Bechthold, E. Davioud-Charvet, V. Hofmann, R. Reau, S. Gromer, R. H. Schirmer, K. Becker in *Flavins and Flavoproteins*, Vol. 14 (Hrsg.: S. Chapman, R. Perham, N. Scrutton), Agency for Scientific Publications, Berlin, **2002**, S. 803–808.
- [145] H. Ginsburg, J. Golenser, *Redox Rep.* **2003**, *8*, 276–279.
- [146] S. M. Kanzok, R. H. Schirmer, I. Türbachova, R. Iozef, K. Becker, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40180–40186.
- [147] H. Sies, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *215*, 213–219.
- [148] K. Becker, S. Rahlfs, C. Nickel, R. H. Schirmer, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 551–566.
- [149] S. M. Kanzok, S. Rahlfs, K. Becker, R. H. Schirmer, *Methods Enzymol.* **2002**, *347*, 370–381.
- [150] S. Rahlfs, R. H. Schirmer, K. Becker, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1024–1041.
- [151] Z. Krnajski, T. W. Gilberger, R. D. Walter, S. Müller, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *112*, 219–228.
- [152] C. H. Williams, L. D. Arscott, S. Müller, B. W. Lennon, M. L. Ludwig, P. F. Wang, D. M. Veine, K. Becker, R. H. Schirmer, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6110–6117.
- [153] Z. Krnajski, T. W. Gilberger, R. D. Walter, A. F. Cowman, S. Müller, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25970–25975.
- [154] R. P. Hirt, S. Müller, T. M. Embley, G. H. Coombs, *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 302–308.
- [155] Z. Krnajski, R. D. Walter, S. Müller, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *113*, 303–308.
- [156] S. Rahlfs, K. Becker, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1404–1409.
- [157] S. Kawazu, K. Komaki, N. Tsuji, S. Kawai, N. Ikenoue, T. Hatabu, H. Ishikawa, Y. Matsumoto, K. Himeno, S. Kano, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *116*, 73–79.
- [158] K. Lüersen, R. D. Walter, S. Müller, *Biochem. J.* **2000**, *346*, 545–552.
- [159] S. Meierjohann, R. D. Walter, S. Müller, *Biochem. J.* **2002**, *363*, 833–838.
- [160] P. M. Färber, L. D. Arscott, C. H. Williams, Jr., K. Becker, R. H. Schirmer, *FEBS Lett.* **1998**, *422*, 311–314.
- [161] G. N. Sarma, S. N. Savvides, K. Becker, M. Schirmer, R. H. Schirmer, P. A. Karplus, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 893–907.
- [162] E. Liebau, B. Bergmann, A. M. Campbell, P. Teesdale-Spittle, P. M. Brophy, K. Lüersen, R. D. Walter, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *124*, 85–90.
- [163] K. Fritz-Wolf, A. Becker, S. Rahlfs, P. Harwaldt, R. H. Schirmer, W. Kabsch, K. Becker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13821–13826.
- [164] S. Rahlfs, C. Nickel, M. Deponte, R. H. Schirmer, K. Becker, *Redox Rep.* **2003**, *8*, 246–250.
- [165] S. Rahlfs, M. Fischer, K. Becker, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37133–37140.
- [166] R. Iozef, S. Rahlfs, T. Chang, H. Schirmer, K. Becker, *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 284–288.
- [167] H. Atamna, H. Ginsburg, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 670–679.
- [168] R. Munday, C. C. Winterbourn, *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 4349–4352.
- [169] P. Wardman, C. von Sonntag, *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 31–45.
- [170] R. L. Krauth-Siegel, J. G. Müller, F. Lottspeich, R. H. Schirmer, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 345–350.
- [171] H. Sztajer, B. Gamain, K. D. Aumann, C. Slomianny, K. Becker, R. Brigelius-Flohé, L. Flohé, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7397–7403.
- [172] Z. A. Wood, L. B. Poole, P. A. Karplus, *Science* **2003**, *300*, 650–653.
- [173] E. Davioud-Charvet, M. J. McLeish, D. M. Veine, D. Giegel, L. D. Arscott, A. D. Andricopulo, K. Becker, S. Müller, R. H. Schirmer, C. H. Williams, Jr., G. L. Kenyon, *Biochemistry* **2003**, *42*, 13319–13330.
- [174] U. Benatti, L. Guida, A. De Flora, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 747–753.
- [175] A. Schönleben-Janas, P. Kirsch, P. R. Mittl, R. H. Schirmer, R. L. Krauth-Siegel, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1549–1554.
- [176] E. Davioud-Charvet, S. Delarue, C. Biot, B. Schwöbel, C. C. Böhme, A. Müsiggrodt, L. Maes, C. Sergheraert, P. Grellier, R. H. Schirmer, K. Becker, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4268–4276.
- [177] H. Zappe, *Dissertation*, Universität Heidelberg, **1980**.
- [178] R. H. Schirmer, B. Coulibaly, A. Stich, M. Scheiwein, H. Merkle, J. Eubel, K. Becker, H. Becher, O. Müller, T. Zich, W. Schiek, B. Kouyaté, *Redox Rep.* **2003**, *8*, 272–275.
- [179] S. N. Savvides, M. Scheiwein, C. C. Böhme, G. E. Arteel, P. A. Karplus, K. Becker, R. H. Schirmer, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2779–2784.
- [180] M. Schirmer, M. Scheiwein, S. Gromer, K. Becker, R. H. Schirmer in *Flavins and Flavoproteins*, Vol. 13 (Hrsg.: S. Ghislia, P. Kroneck, P. Macheroux, H. Sund), Agency for Scientific Publications, Berlin, **1999**, S. 857–862.
- [181] R. H. Schirmer, H. Bauer, K. Becker in *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Vol. 5 (Hrsg.: T. E. Creighton), Wiley, New York, **2002**, S. 1471–1475.
- [182] S. Müller, T. W. Gilberger, P. M. Färber, K. Becker, R. H. Schirmer, R. D. Walter, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *80*, 215–219.
- [183] Z. Krnajski, T. W. Gilberger, R. D. Walter, S. Müller, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40874–40878.
- [184] T. W. Gilberger, R. D. Walter, S. Müller, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29584–29589.
- [185] V. N. Gladyshev, K. T. Jeang, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6146–6151.
- [186] H. Bauer, S. Gromer, A. Urbani, M. Schnölzer, R. H. Schirmer, H. M. Müller, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4272–4281.
- [187] P. Harwaldt, S. Rahlfs, K. Becker, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 821–830.
- [188] T. W. Gilberger, R. H. Schirmer, R. D. Walter, S. Müller, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *107*, 169–179.
- [189] P. M. Färber, K. Becker, S. Müller, R. H. Schirmer, R. M. Franklin, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 655–661.
- [190] S. N. Savvides, P. A. Karplus, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8101–8107.
- [191] C. C. Böhme, L. D. Arscott, K. Becker, R. H. Schirmer, C. H. Williams, Jr., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 37317–37323.
- [192] M. A. Keese, R. Saffrich, T. Dandekar, K. Becker, R. H. Schirmer, *FEBS Lett.* **1999**, *447*, 135–138.
- [193] H. Y. Long, B. Lell, K. Dietz, P. G. Kremsner, *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 553–555.
- [194] A. Nordhoff, C. Tziatzios, J. A. van den Broek, M. K. Schott, H. R. Kalbitzer, K. Becker, D. Schubert, R. H. Schirmer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 273–282.
- [195] M. Mayer, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1919**, *45*, 1052–1053.
- [196] P. Guttmann, P. Ehrlich, *Berl. Klin. Wochenschr.* **1891**, *28*, 953–956.

- [197] J. L. Vennerstrom, M. T. Makler, C. K. Angerhofer, J. A. Williams, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2671–2677.
- [198] H. Atamna, M. Krugliak, G. Shalmiev, E. Deharo, G. Pescarmona, H. Ginsburg, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 693–700.
- [199] J. Golenser, J. Miller, D. T. Spira, N. S. Kosower, J. A. Vandewaa, J. B. Jensen, *Trop. Med. Parasitol.* **1988**, *39*, 273–276.
- [200] Y. Zhang, I. König, R. H. Schirmer, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 861–865.
- [201] F. Turrini, H. Ginsburg, F. Bussolino, G. P. Pescarmona, M. V. Serra, P. Arese, *Blood* **1992**, *80*, 801–808.
- [202] S. Krieger, W. Schwarz, M. R. Ariyanayagam, A. H. Fairlamb, R. L. Krauth-Siegel, C. Clayton, *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 542–552.
- [203] J. F. Morrison, C. T. Walsh, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1988**, *61*, 201–301.
- [204] A. Nordhoff, R. H. Schirmer, *Naturwiss. Rundsch.* **1995**, *48*, 336–343.
- [205] F. Q. Schafer, G. R. Buettner, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
- [206] S. Gromer, S. Uriq, K. Becker, *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 40–89.
- [207] B. W. Lennon, C. H. Williams, Jr., *Biochemistry* **1996**, *35*, 4704–4712.
- [208] S. M. Kanzok, A. Fechner, H. Bauer, J. K. Ulschmid, H. M. Müller, J. Botella-Munoz, S. Schneuwly, R. H. Schirmer, K. Becker, *Science* **2001**, *291*, 643–646.
- [209] E. N. Iheanacho, N. H. Hunt, R. Stocker, *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *18*, 543–552.
- [210] D. Shenton, G. Perrone, K. A. Quinn, I. W. Dawes, C. M. Grant, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16853–16859.
- [211] E. S. Arnér, A. Holmgren, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6102–6109.
- [212] A. Holmgren, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 237–271.
- [213] I. A. Cotgreave, R. Gerdes, I. Schuppe-Koistinen, C. Lind, *Methods Enzymol.* **2002**, *348*, 175–182.
- [214] H. Ostergaard, C. Tachibana, J. R. Winther, *J. Cell. Biol.* **2004**, *166*, 337–345.
- [215] Z. Bozdech, H. Ginsburg, *Malar. J.* **2004**, *3*, 23–30.
- [216] B. Biteau, J. Labarre, M. B. Toledo, *Nature* **2003**, *425*, 980–984.
- [217] T. S. Chang, W. Jeong, H. A. Woo, S. M. Lee, S. Park, S. G. Rhee, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50994–51001.
- [218] A. Saravanamuthu, T. J. Vickers, C. S. Bond, M. R. Peterson, W. N. Hunter, A. H. Fairlamb, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29493–29500.
- [219] C. Biot, H. Bauer, R. H. Schirmer, E. Davioud-Charvet, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5972–5983.
- [220] A. Argyrou, J. S. Blanchard, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2004**, *78*, 89–142.
- [221] B. Coulibaly, J. Eubel, S. Gromer, R. H. Schirmer in *Health Research in Developing Countries* (Hrsg.: H. Becher, B. Konyaté), Springer, Heidelberg, **2005**, S. 285–292.