

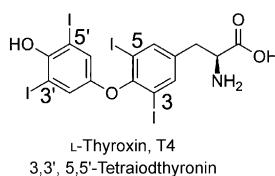
Schildrüsenhormone – von der Kristallstruktur über die Aktivität zur Reaktivität

Ulrich Schweizer* und Clemens Steegborn

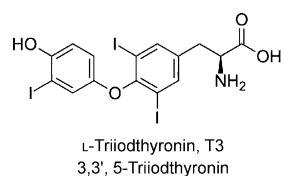
Deiodase · Halogenbindungen ·
Schildrüsenhormone · Selen

Biologische Moleküle bestehen aus einer bemerkenswert kleinen Anzahl an chemischen Elementen. Substrate und Reaktionsprodukte fast aller lebensnotwendigen Reaktionen sowie die daran beteiligten Enzyme, Coenzyme und Cofaktoren enthalten im Wesentlichen die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Phosphor, Schwefel sowie, in Spuren, Metalle.

Das Spurenelement Iod wird im Menschen ausschließlich für zwei miteinander verwandte Substanzen benötigt, nämlich für das Schildrüsenhormon L-Thyroxin (T4, Abbildung 1) und seinen biologisch aktiveren Metaboliten T3 (Abbildung 1). Die Schildrüsenhormone enthalten nicht nur zwei iodierte aromatische Ringe, sondern diese sind zudem über eine Diphenyletherbindung verknüpft – die einzige derartige Verknüpfung, die man in der Biochemie des Menschen bisher kennt. Die Biosynthese des T4 erfolgt in einem spezialisierten Organ, der Schildrüse (oder ihrer Vorgängerstruktur bei niederen Vertebraten und Chordatieren). Die Umwandlung des Prohormons T4 zum biologisch aktiven T3 wird durch 5'-Deiodierung am Außenring erreicht (Abbildung 1). Katalysiert wird die Reaktion durch zwei der drei Isoformen der



L-Thyroxin, T4
3,3', 5,5'-Tetraiodthyronin



L-Triiodthyronin, T3
3,3', 5-Triiodthyronin

Abbildung 1. Strukturen und Nummerierung des Prohormons Thyroxin und seines aktiveren Metaboliten T3. Die Affinität des nukleären T3-Rezeptors zu T3 ist mehr als zehnmal höher als die zu T4. Der Tyrosylring, der die 3- und 5-Iodatome trägt, wird oft als „innerer Ring“ bezeichnet, während der Phenolring „äußerer Ring“ genannt wird.

Iodthyronin-Deiodasen (Dio), Dio1 und Dio2. 5-Deiodierung am Innenring wird vorwiegend über Dio3 vermittelt. Dabei entstehen aus T4 und T3 die inaktiven Metabolite reverse T3 und 3,3'-T2. Alle Deiodase-Isoenzyme sind homologe Sele-noenzyme: Sie weisen dieselbe Grundstruktur auf und enthalten Selenocystein in ihren aktiven Zentren.^[1] Die Gründe für die unterschiedlichen Regioselektivitäten der Isoenzyme (5'- versus 5-Deiodierung) sind noch nicht bekannt. Die zelltyp- und entwicklungsspezifische Expression der Deiodasen stellt die lokale T3-Konzentration ein, und diese Enzyme sind somit zentrale Regulatoren der Hormonwirkung.

Ein Mangel an Schildrüsenhormon führt zu Verzögerungen oder Störungen während der Entwicklung des Gehirns, der Augen, des Innenohrs, der Knochen und vieler anderer Organe. Bis zur Einführung des Neugeborenen-Screenings in den 1970er Jahren war kongenitale Hypothyreose die Hauptursache für geistige Behinderungen.^[2] Bereits geringe Abweichungen der individuellen Schildrüsenhormonwerte wirken sich negativ auf das körperliche Wohlbefinden aus. Eine T4-Ersatztherapie ist für Tausende Patienten notwendig, denen jedes Jahr die Schildrüse entfernt wird, sowie für Millionen hypothyreote Patienten, die T4 zur TSH-Suppression benötigen. L-T4 wird in Tablettenform verabreicht. Dabei wird stillschweigend angenommen, dass das schlecht wasserlösliche Molekül irgendwie aus der Tablette freigesetzt und während der Darmpassage aufgenommen wird. Ärzte wissen, dass ihre Patienten mit Nachdruck an einem einmal verordneten T4-Präparat festhalten. Obwohl man sich nicht erklären kann, weshalb 100 µg von synthetisch reinem Thyroxin der einen Marke nicht mit 100 µg reinem Thyroxin einer anderen Marke äquivalent sein sollten, berücksichtigen gegenwärtige Richtlinien den Wunsch der Patienten.^[3]

Der kürzlich erschienene Artikel von Mondal und Mugesh über molekulare Eigenschaften des Thyroxins liefert eine erstaunlich einfache Antwort auf dieses Mysterium.^[4] Die Autoren kristallisierten synthetisches Thyroxin aus verschiedenen Lösungsmitteln und fanden zweierlei Kristallformen: eine trikline (Form I) und eine monokline (Form II). Beide Polymorphe enthielten jeweils zwei Moleküle T4 in der asymmetrischen Einheit, die zudem in verschiedenen Konformationen vorlagen und unterschiedliche intra- und intermolekulare Wechselwirkungen im Kristallgitter eingingen. Die Unterschiede betrafen insbesondere die Orientierung der Amino- und Carboxygruppen zum Diphenyletherrest sowie

[*] Prof. Dr. U. Schweizer

Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Nussallee 11, 53115 Bonn (Deutschland)
E-Mail: uschweiz@uni-bonn.de

Prof. Dr. C. Steegborn
Lehrstuhl für Biochemie und Institut für Biomakromoleküle
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95447 Bayreuth (Deutschland)

ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506919> zu finden.

die Kristallkontakte, die ein Netzwerk von Halogenbindungen (XB) mit einschlossen. In beiden Kristallformen wurden starke Wechselwirkungen zwischen einem Iodatom am Phenolring und der Carboxygruppe eines benachbarten Moleküls beobachtet. Eine Konformationsanalyse ergab, dass die größten Unterschiede zwischen den Polymorphen die Konformation der Aminosäuregruppe am inneren Ring betrafen. Die verschiedenen Geometrien in den Polymorphen spiegelten sich in unterschiedlichen FT-Raman- und Festphasen-¹³C-NMR-Spektren wider.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die polymorphen Formen unterschiedliche Löslichkeiten aufwiesen. Form I (kristallisiert aus Methanol) zeigte eine viel geringere spezifische optische Aktivität in Methanol als Form II in Acetonitril (kristallisiert aus Acetonitril). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Konformation des T4 vom Lösungsmittel abhängt. Bei pH 4 wies Form I eine signifikant höhere Löslichkeit als Form II auf, letztergenannte hingegen löste sich besser bei pH 9. T4 unterschiedlicher Firmen könnte demzufolge in verschiedenen polymorphen Formen vorliegen und sich daher im Lösungsverhalten unterscheiden. Die intestinale Freisetzung wäre demnach vom verwendeten T4-Polymorph und weniger von der galenischen Rezeptur oder den Zusätzen der Tablette abhängig.^[5] Bemerkenswerterweise ist T4 bereits in gelöster Form für Patienten erhältlich, die gleichzeitig Protonenpumpenhemmer zur Senkung der Magensäureproduktion einnehmen.^[6] Der Artikel von Mondal und Mugesh^[4] stellt einen großen Fortschritt dar, da er Ärzten und Patienten eine rationale Grundlage für die Suche nach einer optimalen T4-Therapie liefert. Diese Arbeit setzt Thyroxin auf die Liste der pharmazeutisch aktiven Inhaltsstoffe mit unterschiedlichen Kristallformen. Und Polymorphe beeinflussen nicht nur die pharmazeutische Wirkung, sondern haben auch ernsthafte patentrechtliche Bedeutung.^[7]

Das zweite faszinierende Ergebnis der Autoren ist, dass sich die chemischen Verschiebungen der Iod-substituierten Kohlenstoffatome C3, C5, C3', C5' in den aromatischen Ringen bemerkenswert zwischen den Polymorphen unterscheiden. Die Autoren interpretieren dies als Hinweis auf eine unterschiedliche Reaktivität der assoziierten C-I-Bindungen.^[4] Die Kristalle zeigten gerichtete XB entlang der Achse der C-I-Bindung, was zu Wechselwirkungen zwischen dem Donor und dem positiven elektrostatischen Potential (σ -Loch) des Iods führt. Die Bindungsstärke wird außerdem signifikant von der Konformation des Moleküls beeinflusst. Dieser Aspekt ist wahrscheinlich von hoher biochemischer Relevanz, da das katalytische Selenolat während der Deiodierungsreaktion vermutlich das σ -Loch des Iods linear über eine Halogenbindung angreift und dadurch die C-I-Bindung schwächt.^[8] Die Autoren führten Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Rechnungen durch, um diesen Punkt genauer zu erforschen und berechneten die XB-Energien der verschiedenen T4-Konformere mit Methylselenoat als Akzeptor der Halogenbindung. Im Allgemeinen waren I···Se-Bindungen der 3- und 5-Iodatome stärker als Halogenbindungen an 3'- und 5'-Position. Diese Befunde stimmen mit früheren Ergebnissen aus dem Mugesh-Labor überein, in denen die effiziente 5-Deiodierung von T4 mithilfe eines kleinen, Deiodase nachahmenden Moleküls untersucht wurde.^[9] Eine 4'-

Sulfatierung von Iodthyroninen verstärkt das σ -Loch des 5'-Iods und erleichtert die 5'-Deiodierung von T4S durch das gleiche kleine Mimetikum.^[10] Mondal und Mugesh zeigten daraufhin, dass die Änderung der Torsionswinkel, die die Konformation der substituierten T4-Phenylringe entlang der Diphenyletherverknüpfung definieren, die I···Se-Wechselwirkungen mit den 3'- und 5'-Iodatomen verstärkt und so den 3- und 5-Iodatomen annähert.

Die faszinierenden Ergebnisse der DFT-Rechnungen zeigen zudem, dass die Konformation des Thyroxin-Aminosäurerestes die XB-Energien ebenfalls auffallend beeinflusst und in manchen Konformationen die 5'-Deiodierung gegenüber der 5-Deiodierung bevorzugt wird. Die Autoren stellten fest, dass die Bindung der Iodthyronine in leicht unterschiedlichen Konformationen der Weg sein könnte, wie die drei ansonsten sehr ähnlichen Deiodasen ihre verschiedenen Regioselektivitäten erreichen.

Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne der murinen Dio3 (mDio3^{cat}) wurde kürzlich gelöst, leider ohne gebundenes Substrat.^[11] Basierend auf der Bindung des Substrates im T3-Schilddrüsenhormonrezeptor-Komplex^[12] sowie in Übereinstimmung mit Mutationsanalysen wurde das Substrat mit seiner Aminosäuregruppe nahe den Aminosäuren Arg²⁷⁵ und Glu²⁵⁹ modelliert (Abbildung 2). Interessanter-

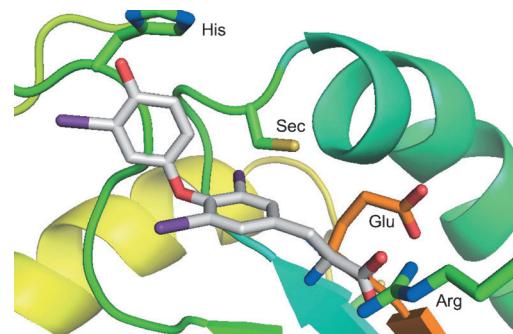


Abbildung 2. Modell der Bindung von T3 in Dio3^{cat} basierend auf PDB: 4TR3. Die beteiligten Aminosäuren His202, Sec170, Glu259 und Arg275 sind beschriftet.

weise unterscheiden sich die Deiodase-Isoenzyme rund um die Substratbindestelle nur in wenigen Aminosäuren. Glu²⁵⁹ ist innerhalb der Deiodasen von Säugetieren konserviert. Arg²⁷⁵ wird hingegen in Dio2 durch Lys ersetzt. In Dio1 ist das betreffende Lys um eine Position in Richtung des N-Terminus verschoben. Unter Berücksichtigung der Arbeit von Mondal und Mugesh könnte man sich vorstellen, dass die kleinen Unterschiede in dem Bereich des Enzyms, der die Carboxygruppe des Substrates erkennt, möglicherweise die Regioselektivität beeinflussen, indem sie das Substrat in leicht unterschiedlichen Konformationen fixieren.

In ihrer inspirierenden Arbeit begannen die Autoren damit, ihre Verbindung aus verschiedenen Lösungsmitteln zu kristallisieren, um zunächst Kristalle und Konformationen sorgfältig zu analysieren. In einer Zeit, die von hochentwickelten Geräten und großen Datenmengen geprägt ist, widmeten sie sich zuerst dieser alten Kunst. Erst mit der richtigen

Fragestellung im Hinterkopf setzten sie dann ausgefeilte instrumentelle Analytik bis hin zu DFT-Rechnungen ein. Fast nebenbei lösten sie das Rätsel der Nichtäquivalenz von verschiedenen T4-Präparaten und lieferten eine attraktive Hypothese zur Frage, wie Deiodasen ihre Regioselektivität kontrollieren: indem sie die Substratkonformation in einiger Entfernung von der reaktiven Bindung steuern.

Danksagung

Wir bedanken uns für die kontinuierliche Förderung durch die DFG, insbesondere im Schwerpunktprogramm THYROID TRANS ACT (Förderungen SCHW914/3, SCHW914/6, STE1701/16).

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12856–12858
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13048–13050

-
- [1] A. C. Bianco, D. Salvatore, B. Gereben, M. J. Berry, P. R. Larsen, *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 38–89.
 - [2] A. Gruters, H. Biebermann, H. Krude, *Horm. Res.* **2003**, *59*, 24–29.

- [3] J. R. Garber, R. H. Cobin, H. Gharib, J. V. Hennessey, I. Klein, J. I. Mechanick, R. Pessah-Pollack, P. A. Singer, K. A. Woeber, *Endocrine Practice* **2012**, *18*, 988–1028.
- [4] S. Mondal, G. Mugesh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10833–10837; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 10983–10987.
- [5] D. Pabla, F. Akhlaghi, H. Zia, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *72*, 105–110.
- [6] R. Vita, G. Saraceno, F. Trimarchi, S. Benvenga, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 4481–4486.
- [7] D. K. Bucar, R. W. Lancaster, J. Bernstein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6972–6993; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 7076–7098.
- [8] C. A. Bayse, E. R. Rafferty, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 5365–5367.
- [9] a) D. Manna, G. Mugesh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9246–9249; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9432–9435; b) D. Manna, G. Mugesh, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4269–4279.
- [10] D. Manna, S. Mondal, G. Mugesh, *Chemistry* **2015**, *21*, 2409–2416.
- [11] U. Schweizer, C. Schlicker, D. Braun, J. Köhrle, C. Steegborn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 10526–10531.
- [12] A. S. Nascimento, S. M. Dias, F. M. Nunes, R. Aparicio, A. L. Ambrosio, L. Bleicher, A. C. Figueira, M. A. Santos, N. M. de Oliveira, H. Fischer, M. Togashi, A. F. Craievich, R. C. Garrant, J. D. Baxter, P. Webb, I. Polikarpov, *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 586–598.

Eingegangen am 26. Juli 2015

Online veröffentlicht am 11. September 2015
