

Spezifische Inhibitoren der endobakteriellen Hämbiosynthese

# Endosymbiontische Wolbachia-Bakterien als Wirkstoffziel in Filarienwürmern

C. S. Lentz<sup>1</sup>, V. Halls<sup>2</sup>, J. S. Hannam<sup>2</sup>, B. Niebel<sup>2</sup>, U. Strübing<sup>1</sup>, G. Mayer<sup>2</sup>, A. Hoerauf<sup>1</sup>, M. Famulok<sup>2</sup>, K. M. Pfarr<sup>1</sup>  
1 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn  
2 LIMES Institut, Laboratory of Chemical Biology, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

## ▲ Einleitung

Parasitische Fadenwürmer (Filarien) sind Erreger der Lymphatischen Filariose (LF) und der Onchozerkose (OZ), die mehr als 150 Millionen Menschen in den Tropen und Subtropen befallen und schwere chronische Pathologien wie Lymphödeme und Hydrozele (LF) oder Dermatitis und Keratitis/Blindheit (OZ) hervorrufen können. Infektiöse Larven der Filarien (LF: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*; OZ: *Onchocerca volvulus*) werden bei der Blutmahlzeit infizierter Mücken übertragen, wandern bei LF in die Lymphgefäße und bei OZ unter die Haut und entwickeln sich zu adulten Würmern, die über Jahre im Menschen überleben, sich paaren und L1-Larven (Mikrofilarien) produzieren.

Zur Kontrolle der Filariosen werden in endemischen Ländern Massenbehandlungsprogramme (MDA) mit den Anthelminthika Diethylcarbamazin oder Ivermectin jeweils in Kombination mit Albendazol durchgeführt. Diese Behandlung tötet Mikrofilarien (mikrofilarizider Effekt) und reduziert so die Transmission, während adulte Würmer persistieren. Die Filarien sind zum Überleben und zur Reproduktion von einem endosymbiontischen  $\alpha$ -Proteobakterium, *Wolbachia*, abhängig, was die Therapie von LF/OZ mit dem Antibiotikum Doxycyclin ermöglicht. Durch Depletion der Endosymbionten werden die adulten Würmer sterilisiert und abgetötet (makrofilarizider Effekt), wodurch die Transmission unterbrochen und die Patienten auch langfristig von adulten Würmern befreit werden, was teils sogar mit einem Rückgang der Pathologie einhergeht. Da aufgrund von Kontraindikationen und der mehrwöchigen Behandlungsdauer eine Verwendung von Doxycyclin in MDA schwierig ist und Resistenzbildung gegen die klassischen Anthelminthika droht, ist ein dringender Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten für LF/OZ entstanden.

Zur Entwicklung neuer antifilarieller Wirkstoffe stellen die *Wolbachien* also hervorragende Zielstrukturen zur

Referat zu: A Selective Inhibitor of Heme Biosynthesis in Endosymbiotic Bacteria Elicits Antifilarial Activity In Vitro. Chem Biol 2013;20(2):177-187

Verfügung. Die Bakterien, nicht aber die Filarien, besitzen sämtliche Gene für die zur De-novo-Biosynthese des essenziellen Kofaktors Häm nötigen Enzyme und versorgen den Wurm vermutlich mit Häm. Eine gezielte Unterbrechung der Hämbiosynthese in *Wolbachien* würde zu

einem Mangel an Häm im Wurm und zu dessen Tod führen. Aufgrund seiner zum humanen Enzym unterschiedlichen molekularen Struktur ist das Enzym  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Dehydratase (ALAD), das die Reaktion von  $\delta$ -Aminolävulinsäure zu Porphobilinogen katalysiert, ein geeigneter Angriffspunkt zur Entwicklung antifilarieller Wirkstoffe.

## Ergebnisse

Wir haben das *Wolbachien*-ALAD (wALAD) rekombinant hergestellt und im Hochdurchsatzverfahren 18.000 chemische Substanzen auf Inhibition der enzymatischen Aktivität getestet. Wir konnten eine Klasse dreifach substituierter Benzimidazolstrukturen als spezifische Hemmstoffe des *Wolbachien*-Enzyms identifizieren, die mit der  $Mg^{2+}$ -abhängigen Aktivierung von wALAD konkurrieren. Der im enzymatischen Test potenteste Hemmstoff, wALADin1, hemmte wALAD mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 11  $\mu M$ , während das humane Enzym, das nicht durch  $Mg^{2+}$ -Ionen aktiviert wird, kaum von wALADin1 beeinflusst wurde ( $IC_{50} > 700 \mu M$ ). Anhand von Tests zu Struktur-Aktivitätsbeziehungen einer Reihe chemischer Derivate von wALADin1 konnten sowohl Strukturmerkmale herausgestellt werden, die für die inhibitorische Wirkung, als auch solche, die für die Speziesselektivität verantwortlich sind, identifiziert werden.

Die Eignung von wALADin1 als antifilarielle Substanz wurde im Folgenden an *Litomosoides sigmodontis*, einer Filarie aus Nagetieren, die eng mit den humanpathogenen Spezies verwandt ist und ebenfalls *Wolbachien* enthält, getestet. Adulte Weibchen wurden aus Wüstenrennmäu-

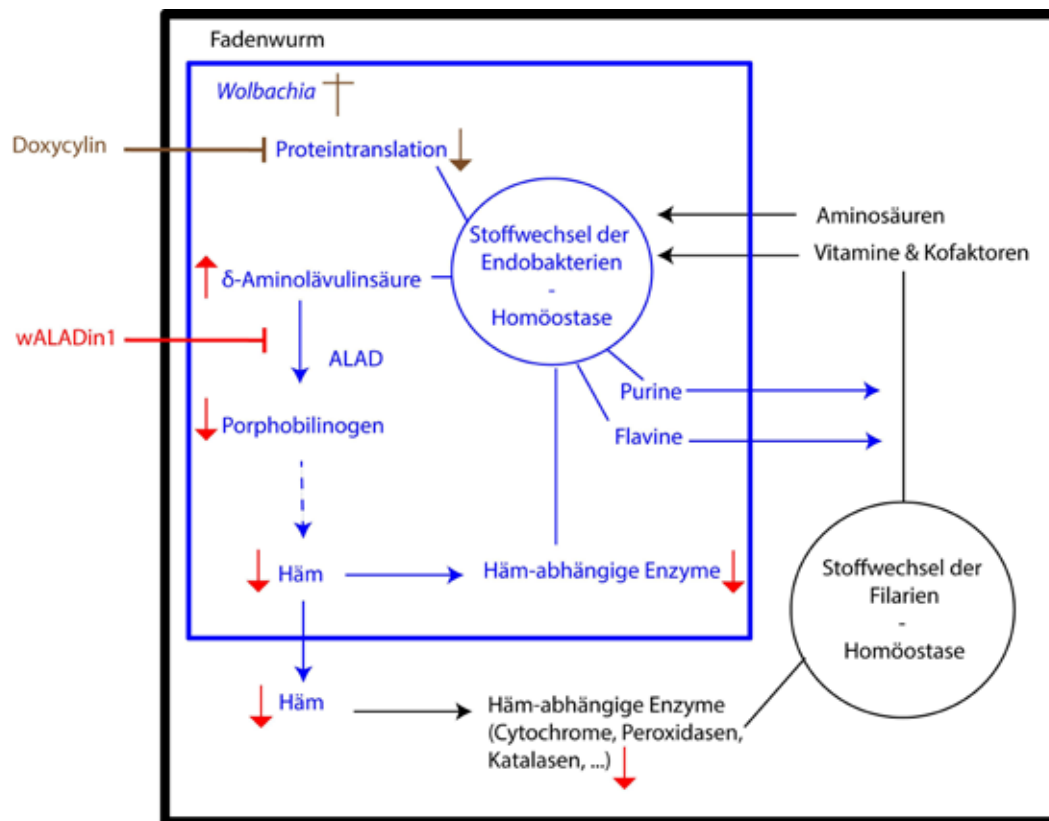


Abb. 1: Humanpathogene Fadenwürmer wie *Brugia malayi* sind zum Überleben auf das endosymbiotische Bakterium *Wolbachia* angewiesen. Die Bakterien sind in der Lage, Tetrapyrrole wie Häm de novo zu synthetisieren und dem Wurm, dem dieser Syntheseweg fehlt, diese und weitere essenzielle Metabolite zur Verfügung zu stellen. Doxycyclin wirkt durch Hemmung der bakteriellen Proteintranslation (brauner Pfeil) und führt über eine primäre Depletion der Endobakterien zum Tod und Sterilisierung adulter Würmer. Der neuartige Wirkstoff wALADin1 hemmt spezifisch einen enzymatischen Schritt der endobakteriellen Hämbiosynthese, der durch das Enzym ALAD katalysiert wird. Seine antifilarielle Wirkung (in vitro) beruht vermutlich auf der gezielten Unterbrechung der Versorgung des Wurms mit Häm durch *Wolbachia* und der daraus resultierenden reduzierten Aktivität hämabhängiger Enzyme wie Peroxidasen oder Cytochrome im Wurm (rote Pfeile).

sen entnommen und wALADin1 für 14 bis 17 Tage ausgesetzt. Behandelte Würmer zeigten deutlich reduzierte Motilität und Lebensfähigkeit ( $IC_{50} \sim 100 \mu M$ ). In Kontrollstudien mit einer Nagetierfilarie, die keine Endobakterien und somit nicht das molekulare Zielprotein von wALADin1 enthält, hatte wALADin1 unter den getesteten Bedingungen keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit.

## Diskussion

Wir haben eine Klasse von Hemmstoffen identifiziert, die spezifisch das endobakterielle Hämbiosynthesenzym ALAD inhibiert und adulte Filarien in Kultur *Wolbachien* abhängig abtötet. Die Bestimmung des molekularen Wirkmechanismus und der Struktur-Aktivitätsbeziehungen der wALADin1-Benzimidazole bilden die Grundlage

zur Entwicklung eines potenteren Wirkstoffs mit potenziell antifilarieller Wirkung in vivo. Solche Wirkstoffe, die gezielt Stoffwechselwege, mit denen die Bakterien zur Symbiose beitragen, unterbrechen oder die Endobakterien der Filarien mit Substanzen wie Doxycyclin abtöten (siehe Abb.1), stellen vielversprechende Kandidaten zur Entwicklung dringend benötigter neuer makrofilariizider Medikamente dar.

## Korrespondenzadresse

Dipl.-Mol.biomed. Christian Lentz  
 Universitätsklinikum Bonn, Institut für Medizinische  
 Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie  
 Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn  
 E-Mail: clentz@uni-bonn.de