

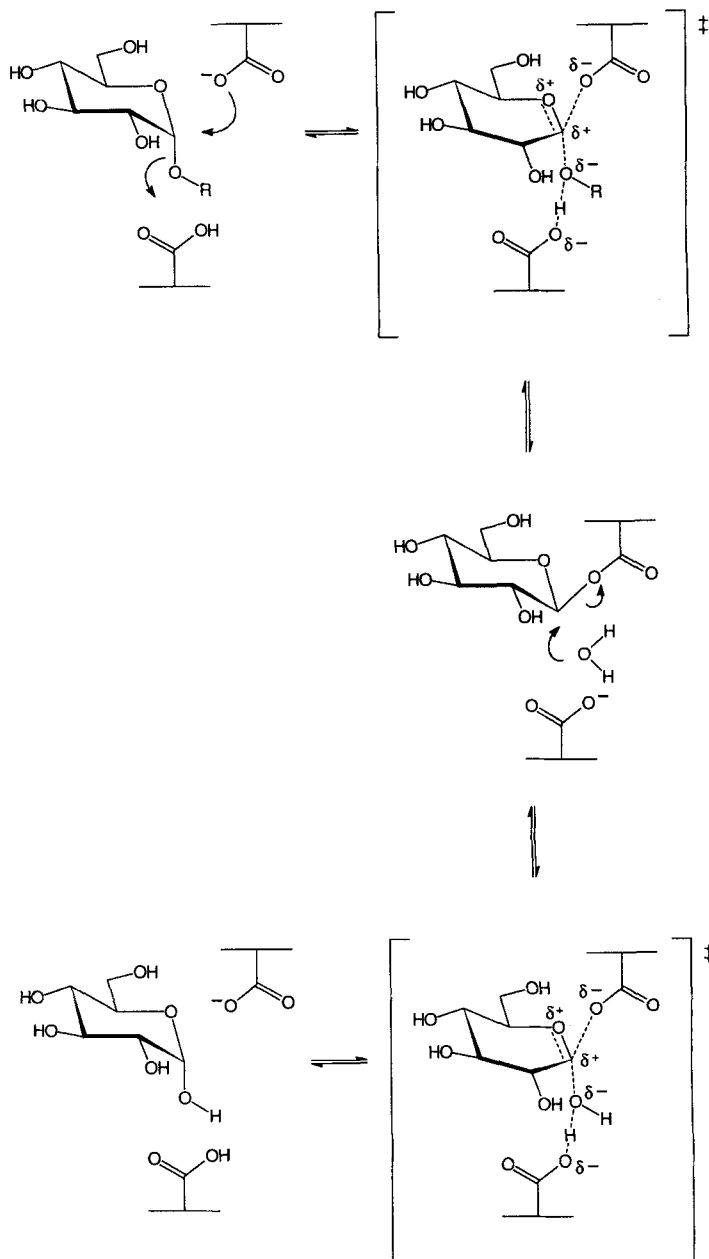
# Ein neues Konzept zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus konfigurationserhaltender Glycosid-Hydrolasen

Arnold E. Stütz\*

Glycosid-Hydrolasen (Glycosidasen) sind allgegenwärtige und überaus wichtige Enzyme, die Poly- und Oligosaccharide zu den entsprechenden Monomeren abbauen oder Glycokonjugate an der Bindung zwischen dem Zuckerbaustein und dem Aglycon spalten. Vom Stärkeabbau bis hin zum komplexen und hochorganisierten Prozeß des Glycoprotein-Trimmings haben Glycosidasen zahlreiche Funktionen, die essentiell für die Existenz und die Überlebensfähigkeit von Organismen sind.

Abhängig vom Wirkungsmechanismus wurden unterschiedliche Typen dieser Enzyme definiert<sup>[1]</sup>: Exoglycosidasen greifen ein Saccharid am nichtreduzierenden Ende an, und Endoglycosidasen spalten glycosidische Bindungen entlang der Polysaccharidkette. Mit konfigurationserhaltenden Glycosidasen ist die Konfiguration am anomeren Zentrum im Produkt als Folge zweier konsekutiver Inversionen unverändert im Vergleich zu der im Substrat. Invertierende Glycosidasen führen dagegen in nur einem Hydrolyseschritt zur Inversion der Konfiguration an C-1. Für das Verständnis der katalytischen Eigenschaften von Glycosidasen und um effiziente und möglichst selektive Inhibitoren für diagnostische und therapeutische Anwendungen herstellen zu können, ist die Aufklärung des Mechanismus und des Reaktionsverlaufs am aktiven Zentrum seit Jahrzehnten das Ziel intensiver Forschungsarbeiten.

Trotz aller Bemühungen ist es bisher allerdings nicht gelungen, die Mehrzahl dieser Enzyme, z. B. viele interessante Exoglycosidasen, zu kristallisieren, um ihre Strukturen zu bestimmen und so ein dreidimensionales Bild der Molekülgeometrie am katalytischen Zentrum zu erhalten. Daher waren Untersuchungen des Reaktionsmechanismus von Glycosidasen bisher weitgehend auf indirekte Methoden angewiesen, bei denen die Eigenschaft von Substratanaloga wie Bromconduiten, Iminozuckern, aber auch Glycosylfluoriden und verwandten Verbindungen als kompetitive oder nichtkompetitive Hemmer genutzt werden<sup>[2]</sup>. Mechanistische Betrachtungen basieren auf den Arbeiten von Koshland<sup>[3]</sup> und der Kristallstrukturanalyse von Hühnerei-Lysozym, einer niedermolekularen Endohexosaminidase, durch Phillips und Mitarbeiter<sup>[4]</sup>. Diesen Ergebnissen zufolge verläuft die enzymatische Glycosidhydrolyse wie in Schema 1 dargestellt. Eine katalytisch wirkende Carbonsäurefunktion im aktiven Zentrum des Enzyms protoniert im ersten Schritt das Glycosid. Danach stabilisiert eine Carboxylatgruppe auf der anderen Seite der Zuckerringebene den cyclischen, oxocarboniumartigen Übergangszustand durch Bildung einer kovalenten Bindung unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum. Diese Zwischenstufe kann aus beiden Richtungen über oxocarboniumartige Übergangszustände gebildet werden. Im abschließenden Hydrolyseschritt wird der Zucker durch den



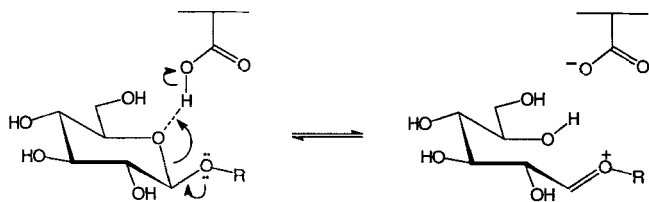
Schema 1. Mechanismus der enzymatischen Glycosidhydrolyse nach Phillips et al.

Angriff eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum freigesetzt. Es galt viele Jahre lang als gesichert, daß sich Lysozyme im speziellen und konfigurationserhaltende Glycosidasen im allgemeinen während ihrer Evolution dazu entwickelten, die Bildung eines solchen cyclischen oxocarboniumartigen Übergangszustandes zu begünstigen<sup>[1, 2]</sup>.

Stereochemischen Betrachtungen zur Glycosidase-Inhibition mit Iminozuckern folgend, schlug Fleet 1985 einen Mechanismus vor, nach dem im ersten Schritt die endocyclische Bin-

[\*] Univ.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. A. E. Stütz  
Institut für Organische Chemie der Technischen Universität  
Stremayrgasse 16, A-8010 Graz (Österreich)  
Telefax: Int. + 316/873-8740  
E-mail: stuetz@orgc.tu-graz.ac.at

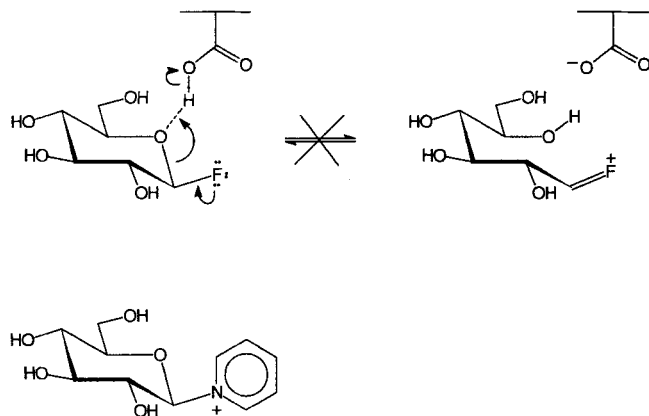
dung zwischen dem Ringsauerstoffatom und dem anomeren Kohlenstoffatom unter Bildung einer offenkettigen Spezies gespalten wird<sup>[5]</sup> (Schema 2). Eine derartige Zwischenstufe



Schema 2. Mechanismus der enzymatischen Glycosidhydrolyse nach Fleet.

wurde auch in einem die Diskussion überaus belebenden Beitrag von Post und Karplus<sup>[6]</sup> über den Mechanismus der Glycosidhydrolyse mit Hühner-Lysozym postuliert. Zu diesem Vorschlag führten eine mit diesem Enzym experimentell nicht beobachtbare Deformation des Substrates beim Binden an das Enzym<sup>[4]</sup>, die auch von Sinnott<sup>[1]</sup> sowie von Legler<sup>[2]</sup> kommentiert wurde, und computerunterstützte Molekül-Dynamik-Simulationen, die das Konzept der „geringsten molekularen Bewegung“ mit der Theorie der stereoelektronischen Kontrolle<sup>[7]</sup> von organisch-chemischen Reaktionen kombinierten. In diesem Ansatz wird davon ausgegangen, daß der Austritt einer Abgangsgruppe von einem tetraedrischen Kohlenstoffzentrum, das an ein oder mehrere Heteroatome gebunden ist, durch die antiperiplanare Anordnung der freien Elektronenpaare der Heteroatome unterstützt wird<sup>[8]</sup>. Ein Beispiel hierfür ist die nicht-enzymatische, Lewis-Säure-katalysierte Umsetzung von geschützten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucopyranosiden mit unterschiedlichen Nucleophilen in inerten Lösungsmitteln, wobei kinetisch kontrolliert offenkettige Derivate entstehen<sup>[9]</sup>.

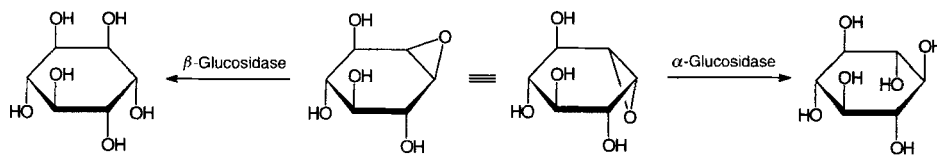
Diese Befunde und die daraus gezogenen Schlüsse lösten eine heute noch aktuelle Diskussion aus. Es gibt einige gute Argumente gegen einen endocyclischen Bindungsbruch, z. B. die Tatsache, daß die experimentell feststellbare enzymatische Hydrolyse von Glycopyranosylfluoriden und Glycosylpyridiniumderivaten nicht mit diesem Mechanismus kompatibel ist<sup>[11]</sup> (Schema 3).



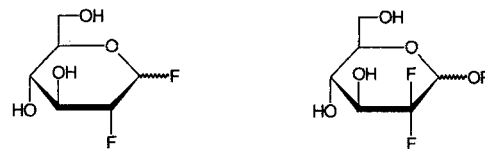
Schema 3. Glycopyranosylfluoride und Glycosylpyridiniumderivate hydrolysieren nicht nach dem von Fleet vorgeschlagenen Mechanismus.

Weiter konnte gezeigt werden, daß das Condurit-B-Epoxid sowohl von einer  $\alpha$ -<sup>[2,10]</sup> als auch von einer  $\beta$ -Glucosidase<sup>[12,11]</sup> jeweils am Epoxid-Kohlenstoffatom attackiert wird, das dem Kohlenstoffatom C-1 des natürlichen Substrats entspricht, und nicht alternativ an dem Kohlenstoffatom, das die Position des Ringsauerstoffatoms einnimmt (Schema 4). Trotzdem war bisher nicht völlig auszuschließen, daß sich manche Glycosidasen im Verlauf ihrer Evolution sowohl an Veränderungen der relativen Basizität des Ringsauerstoffatoms O-5 und des Sauerstoffatoms O-1 am anomeren Zentrum als auch an das jeweilige Aglycon anpassen konnten und so je nach Bedarf einen der beiden einander auf den ersten Blick ausschließenden Reaktionswege nutzen.

In einem Ansatz zur Aufklärung wichtiger mechanistischer Aspekte von konfigurationserhaltenden Glycosid-Hydrolasen untersuchten Withers und Mitarbeiter die Anomere von 2-Desoxy-2-fluorglucopyranosylfluorid<sup>[12,13]</sup> und 2-Desoxy-2,2-difluorglucopyranosid<sup>[14]</sup> als Substrate (Schema 5). Die Fluor-



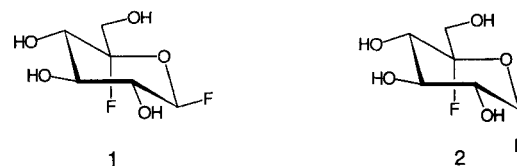
Schema 4. Das Condurit-B-Epoxid wird sowohl von  $\alpha$ - als auch von  $\beta$ -Glucosidase an C-1 geöffnet.



Schema 5. 2-Desoxy-2-fluorglucopyranosylfluorid und 2-Desoxy-2,2-difluorglucopyranosid.

substituenten an C-2 destabilisieren induktiv die sich im ersten Schritt der Hydrolyse entwickelnde positive Ladungsdichte am benachbarten anomeren Kohlenstoffatom und verlängern dadurch die Lebensdauer des Glycosyl-Enzym-Adduktes. Dies führte bei  $\beta$ -Glucosidasen zum Ziel, versagte aber bei unterschiedlichen  $\alpha$ -Glucosidasen, die den natürlichen Substituenten an C-2 zur Substraterkennung und für die Bindung an das Enzym benötigen<sup>[15]</sup>. So können *N*-Acetyl-Hexosaminidasen, für die die Acetylaminogruppe an C-2 der natürlichen Substrate für die Erkennung essentiell ist, nicht mit Inhibitoren dieses Typs untersucht werden.

Kürzlich haben McCarter und Withers auch diese Unzulänglichkeit überwunden<sup>[16]</sup>. Sie synthetisierten die beiden 5-Fluor-D-glucopyranosylfluoride 1 und 2 als erste Verbindungen einer neuen Klasse von „Pseudosubstraten“. Bei den Untersuchungen mit diesen Verbindungen gewannen sie auch neue, wertvolle Daten, die den klassischen, von Phillips und Mitarbeitern postulierten Mechanismus eindrucksvoll stützen.



Die beiden Anomere **1** und **2** wurden auf einfache und elegante Weise nach Ferrier und Tyler<sup>[17]</sup> hergestellt. In diesen stabilen, neuartigen Verbindungen ersetzt das Fluoratom das etwas kleinere axial-ständige Wasserstoffatom an C-5 und stört nicht die für das Erkennen und die Bindung an das Enzym wichtigen sterischen und elektronischen Gegebenheiten. Dies ist ein bedeutender Vorteil gegenüber den 2-Desoxy-2-fluorglycopyranosylfluoriden, in denen, wie erwähnt, das Fluoratom an C-2 in einigen Fällen die Position einer essentiellen Hydroxy- oder Acetylaminogruppe des jeweiligen natürlichen Substrates einnimmt. Das 5-Fluor- $\beta$ -D-glucosylfluorid **1** erwies sich als effizienter Hemmer der  $\beta$ -Glucosidase aus *Agrobacterium faecalis* und **2** – abweichend von früheren Ergebnissen mit 2-Desoxyfluorzuckern – als einer der stärksten bisher bekannten Inhibitoren der  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe, was die Leistungsfähigkeit des neuen Konzeptes und dieser neuartigen Verbindungsklasse eindrucksvoll demonstriert. Ein bemerkenswerter Befund war, daß die elektropray-massenspektrometrisch bestimmte Masse der mit **1** inaktivierten  $\beta$ -Glucosidase 181 Einheiten größer war als die des freien, intakten Enzyms. Diese Massendifferenz entspricht einem definierten, kovalent an das aktive Zentrum gebundenen 5-Fluorglucosylrest. Dieses besonders interessante und sehr aussagekräftige Ergebnis ist ein starkes und vor allem direktes Argument für den klassischen, von Phillips vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus mit konfigurationserhaltenden Glycosidasen, denn durch Bruch der endocyclischen C-O-Bindung wäre in diesem Fall ein instabiles geminales Fluorhydrin entstanden, aus dem sich unter Freisetzung von Fluorwasserstoff ein 5-Oxozucker gebildet hätte. Dieser würde, wenn er am aktiven Zentrum des Enzym hinreichend fest gebunden würde, einen Enzym-Substrat-Komplex mit völlig anderer Molekülmasse geben. Daraus ergibt sich zwanglos, daß zumindest in diesem Beispiel die exocyclischen Bindung gespalten wurde.

Das neue Konzept der 5-Fluorhexopyranosylfluoride wird weitere, analoge Derivate anderer Zucker nahezu uneinge-

schränkt zugänglich machen, so daß die Untersuchung des Reaktionsmechanismus einer breiten Palette von Glycosyl-Hydrolasen möglich wird. In Hinblick auf das Verstehen der komplexen bioorganischen Vorgänge der enzymatischen Glycosidhydrolyse und hinsichtlich der Evolution von Glycosidasen wird es sehr interessant werden, zu erfahren, ob alle Glycosidase-katalysierten Reaktionen nach dem Mechanismus verlaufen, der ursprünglich für Lysozyme vorgeschlagen worden ist, ob mit neuartigen, problemorientiert entworfenen Pseudosubstraten und Inhibitoren Enzyme gefunden werden können, die den endocyclischen Bindungsbruch katalysieren können, und ob einige Enzyme sogar in der Lage sind, beide Reaktionswege zu nutzen, wie in einem Übersichtsartikel vorgeschlagen wurde<sup>[18]</sup>.

**Stichworte:** Enzyminhibitoren • Fluorzucker • Glycosidasen

- [1] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1171–1202.
- [2] G. Legler, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, 48, 319–384.
- [3] D. E. Koshland, Jr., *Biol. Rev.* **1953**, 28, 416–436; siehe auch Übersichtsartikel: *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2468–2472; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2375–2378.
- [4] C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. T. C. North, D. C. Phillips, V. R. Sharma, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1967**, 167, 378–385.
- [5] G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5073–5076.
- [6] C. B. Post, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 1317–1319.
- [7] P. Deslongchamps, *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1983**.
- [8] A. J. Kirby, *Acc. Chem. Res.* **1984**, 17, 305–311; siehe auch Übersichtsartikel: *Angew. Chem.* **1996**, 108, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 706–724.
- [9] Y. Guidon, P. C. Anderson, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2485–2488.
- [10] H. Braun, G. Legler, J. Deshusses, G. Semenza, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 483, 135–140.
- [11] G. Legler, S. N. Hasnain, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1970**, 351, 25–31.
- [12] S. G. Withers, K. Rupitz, I. P. Street, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 7929–7932.
- [13] I. P. Street, J. B. Kempton, S. G. Withers, *Biochemistry* **1992**, 31, 9970–9978.
- [14] C. Braun, G. D. Brayer, S. G. Withers, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26778–26781.
- [15] J. D. McCarter, M. J. Adam, C. Braun, M. Namechuk, D. Tull, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **1993**, 249, 77–90.
- [16] J. D. McCarter, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 241–242.
- [17] R. J. Ferrier, P. Tyler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 1528–1534.
- [18] R. W. Franck, *Bioorg. Chem.* **1992**, 20, 77–88.