

Wirkstoff-Design

Aminoglycosid-Mikroarrays für Bindungsstudien an Resistenzproteinen**

Matthew D. Disney, Sophie Magnet, John S. Blanchard und Peter H. Seeberger*

Verschiedene Aminoglycoside sind Breitbandantibiotika gegen eine Vielzahl klinisch relevanter Bakterien. Sie binden an bakterielle 30S-Ribosomen und unterdrücken somit die Proteinbiosynthese. Die therapeutische Wirksamkeit von Aminoglycosiden wurde in letzter Zeit durch zunehmend auftretende Antibiotika-Resistenzen deutlich herabgesetzt.^[1,2] Bakterien haben unterschiedliche Mechanismen zur Resistenzbildung, wie verringerte Aufnahme in die Zelle, Mutationen des Targets, Proteinbindung und enzymatische Modifizierung des Wirkstoffs.^[1,2] Die enzymatische Modifizierung ist der meistverbreitete Weg zur Aminoglycosid-Resistenz. Sie führt zu einer starken Abnahme der Bindungsaaffinität zum therapeutischen Wirkstoff.^[3] Die Entwicklung von Hochdurchsatz-Methoden zur Identifizierung von Verbindungen, die schwach an Resistenz verursachende Proteine und stark an therapeutische Targets binden, würde die Entwicklung besserer Antibiotika deutlich erleichtern. Solche Methoden führen auch zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen von Antibiotika mit dem Target oder den Resistenz verursachenden Proteinen. Mikroarrays,^[4-8] die durch Immobilisierung kleiner Moleküle an Glasoberflächen hergestellt werden, sind eine vielseitige Plattform für das schnelle parallele Screening von mehreren Tausend potenziellen Antibiotika auf ihre Bindung an therapeutische Wirkstoffe und Resistenz verursachende Proteine. Derartige Screenings kommen mit kleinsten Mengen an Antibiotika, therapeutischen Targets und Resistenz verursachenden Proteinen aus und überwinden somit die Grenzen der üblichen Screening-Methoden.

Hier beschreiben wir die Herstellung von Aminoglycosid-Mikroarrays und deren Verwendung zur Untersuchung der Bindung von Aminoglycosiden an Resistenz verursachende Proteine. Zwei Aminoglycosid-Acetyltransferasen, die Antibiotika-Resistenz verursachen, 2'-Acetyltransferase (AAC(2')) aus *Mycobacterium tuberculosis*^[9] und 6'-Acetyltransferase (AAC(6')) aus *Salmonella enterica*,^[10] wurden als Beispiele ausgewählt. Hybridisierung dieser Enzyme mit den entsprechenden Arrays führte zu Wechselwirkungen der immobilisierten Aminoglycoside sowohl mit AAC(2') als auch mit AAC(6')). Picomolare Mengen der Aminoglycoside auf den Oberflächen waren ausreichend, um eine Bindung zu beobachten (Abbildung 1). Das Signal für Mannose als Negativkontrolle war signifikant schwächer als die Signale der übrigen getesteten Substanzen, was auf spezifische Wechselwirkungen hindeutet.

Die Bindung von Aminoglycosid-Antibiotika an Resistenz-Enzyme kann, im Bezug auf das Fluoreszenzsignal

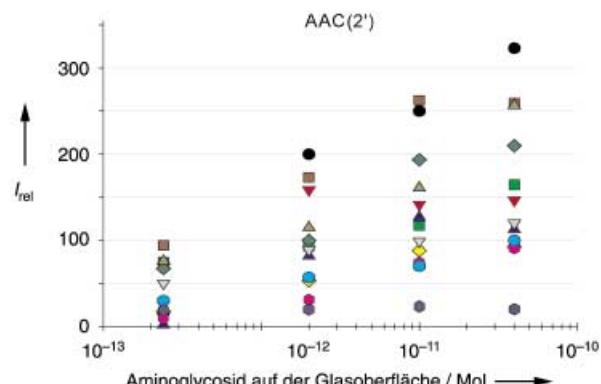
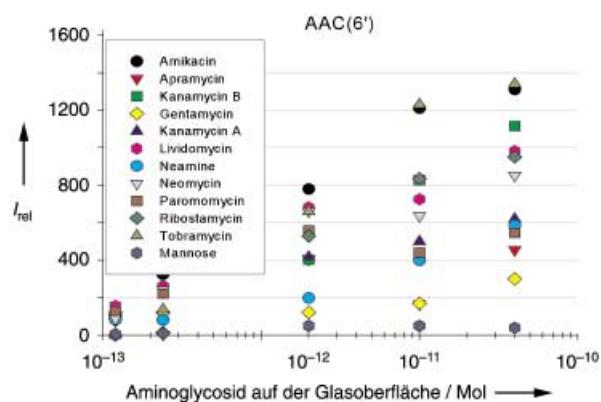
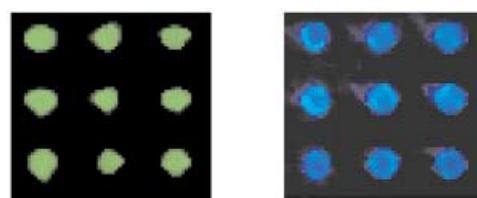


Abbildung 1. Oben: Aminoglycosid-Mikroarray nach Hybridisierung mit AAC(6') (grün) oder AAC(2') (blau). Unten: Fluoreszenzintensitäten der Antibiotika-Hybride bei mehreren Oberflächenbeladungen der Aminoglycoside auf der Glasoberfläche.

[*] Dr. M. D. Disney, Prof. Dr. P. H. Seeberger
Laboratorium für Organische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
ETH Hönggerberg HCI F315
Wolfgang-Pauli-Strasse 10
8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 163-31-235
E-mail: seeberger@org.chem.ethz.ch
Dr. S. Magnet, Prof. Dr. J. S. Blanchard
Department of Biochemistry
Albert Einstein College of Medicine
Bronx, NY 10461 (USA)

[**] Diese Untersuchungen wurden durch ein Roche-Foundation-Post-doc-Stipendium (für M.D.D.) unterstützt. P.H.S. dankt Glaxo-SmithKline (Scholar Award), der Alfred P. Sloan Foundation (Stipendium) sowie der Firma Merck (USA) für finanzielle Unterstützung. Die Arbeiten am Albert Einstein College wurden durch die NIH (AI33696) unterstützt.

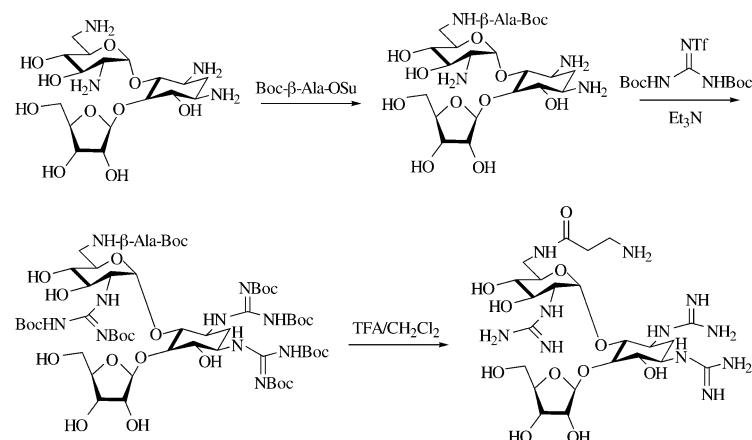
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

des Spots mit der höchsten Konzentration, in zwei Gruppen eingeteilt werden. (Abbildung 1). Für AAC(6') wurde die höchste Fluoreszenz für die Bindungen mit Amikacin, Tobramycin, Kanamycin B, Lividomycin, Neomycin und Ribostamycin erhalten. Die Bindungen mit Kanamycin A, Apramycin, Paromomycin, Gentamycin und Neamin ergaben schwächere Signale. Für AAC(2') wurden intensive Signale für die Bindungen mit Amikacin, Paromomycin, Tobramycin und Ribostamycin und schwächere Signale für die Bindungen mit Kanamycin B, Apramycin, Kanamycin A, Neamin, Neomycin, Lividomycin und Gentamycin beobachtet.

Die Hybridisierung von AAC(6') an Aminoglycosid-Arrays wurde mit Protein-Aminoglycosid-Bindungsmessungen in Lösung verglichen.^[11] Diese ergab eine starke Korrelation zwischen den unterschiedlichen Messarten. Der kalorimetrischen Untersuchung nach haben Ribostamycin, Tobramycin, Lividomycin und Neomycin die stärksten Affinitäten zu AAC(6'), während für Kanamycin B, Paromomycin, Gentamycin C, Kanamycin A und Amikacin schwächere Affinitäten nachgewiesen wurden. Mit Ausnahme von Amikacin korrelieren die Arraydaten gut mit denen der kalorimetrischen Untersuchung. Amikacin wies eines der höchsten Fluoreszenzsignale bei der Bindung mit beiden Enzymen auf. Entgegen den meisten anderen Aminoglycosiden enthält Amikacin zwei primäre Aminogruppen; die sterisch weniger gehinderte Aminfunktion ist durch sechs Kohlenstoffatome von der 2,4-Desoxystreptamineinheit getrennt. Amikacin wird daher möglicherweise anders als die übrigen Aminoglycoside an der Oberfläche immobilisiert, was zu den intensiveren Signalen führen kann.

Um Inhibitoren für antibiotische Resistenz-Enzyme zu finden, wurde eine Bibliothek von Aminoglycosid-Mimetika synthetisiert, auf den Oberflächen angebracht und deren Bindungsverhalten gegen AAC(2') und AAC(6') getestet. Guanidinoglycoside^[12,13] sind aus mehreren Gründen eine attraktive Klasse von Aminoglycosid-Analoga: 1) Sie können, ausgehend von Aminoglycosiden, einfach synthetisiert werden. 2) Ihre erhöhte positive Ladung könnte eine stärkere Bindung in der Aminoglycosid-Bindungstasche im Resistenz verursachenden Enzym verursachen, das mehrere negativ geladene Aminogruppen enthält.^[14] 3) Die pK_a -Unterschiede zwischen Guanidino- ($pK_a \sim 12.5$) und Aminogruppe ($pK_a \sim 8.8$) erlauben die Annahme, dass Guanidinoglycoside keine Substrate für AAC(2') und AAC(6') sind.

Eine andere Gruppe von Guanidinoglycosiden, die einen primären Aminlinker zur Immobilisierung enthielten, wurde durch Reaktion der Aminoglycoside mit Boc-β-Ala-OSu synthetisiert (Schema 1). Mit diesen wurde die Oberfläche beladen und jede Bibliothekskomponente normalisiert. Die Guanidylierung unter Verwendung von *N,N'*-Di(Boc)-*N''*-triflylguanidin^[12] dauert gewöhnlich mindestens drei Tage. Die Reaktionen wurden abgebrochen, wenn die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass die Aminoglycoside vollständig zu den Boc-Derivaten umgesetzt worden waren. Anschließendes Behandeln mit einer Lösung von Trifluores-



Schema 1. Als Beispiel ist die Synthese des 6'-N-β-Alan-1,3'-N-guanidinoribostamycin gezeigt. Alle anderen Verbindungen einer Bibliothek von Aminoglycosid-Mimetika wurden analog hergestellt.

Tabelle 1: Bindungsstärke von ausgewählten Aminoglycosiden an AAC(2') und AAC(6') bei Addition von Guanidinogruppen.^[a]

Aminoglycosid	AAC(6')	AAC(2')
Kanamycin A	2.1	1.1
Kanamycin B	1.6	5.5
Neomycin	3.2	2.5
Ribostamycin	7.5	6.7
Paromomycin	1.4	1.1
Lividomycin	1.1	1.8

[a] Die Bindungsstärke gibt die Steigerung der Signalintensität aufgrund der Anwesenheit der Guanidinogruppe wieder und wird durch dividieren der Guanidinoglycosid-Signalintensität durch die Intensität des Signals der korrespondierenden Aminoglycoside erhalten.

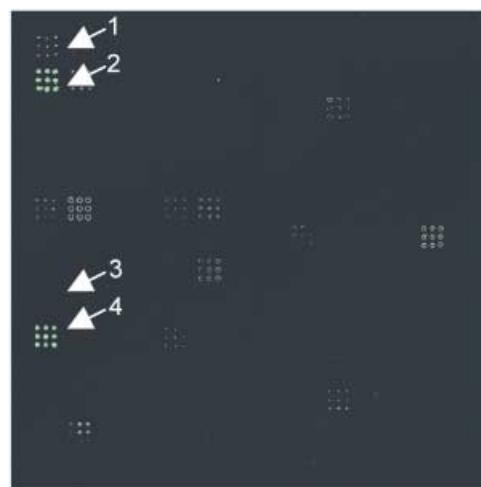


Abbildung 2. Ein Array, das Guanidinoglycoside und Aminoglycoside enthält und mit fluoreszenzmarkiertem AAC(6') inkubiert wurde. Die Pfeile zeigen 3 × 3-Blöcke von repetitiven Spots, Spottdurchmesser ca. 150 μm. Die Pfeile markieren die Spots von β-Ala-Neomycin (1), β-Ala-Guanidinoneomycin (2), β-Ala-Ribosytamycin (3) und β-Ala-Guanidinoribostamycin (4).

Tabelle 2: Inhibition von AAC(2') und AAC(6') durch 6'-N- β -Alanin-1,3,3'-N-guanidinoribostamycin.^[a]

Aminoglycoside	K_M [μM]	V_{max} [10^{-2} min^{-1}] ^[b]	K_{ii} [μM]	K_{is} [μM]
AAC(6')				
Ribostamycin	4.4(± 0.8)	18(± 0.1)	92(± 20)	17(± 8)
Kanamycin A	12(± 3)	2.8(± 0.2)	23(± 7)	31(± 15)
AAC(2')				
Ribostamycin	4.4(± 0.7)	4.4(± 1.8)	134(± 40)	39(± 16)
Kanamycin B	0.7(± 0.2)	2.6(± 0.2)	61(± 20)	200(± 50)

[a] Die Experimente zur Bestimmung der Inhibitionskonstante wurden mit mehreren Konzentrationen des Aminoglycosids und des Inhibitors durchgeführt. Näheres siehe Hintergrundinformationen.
[b] Geschwindigkeiten in $\Delta A_{412} \text{ min}^{-1}$.

sigsäure in CH_2Cl_2 ^[12] ergab die erwünschten guanidinylierten Produkte in guten Ausbeuten (ca. 90 % Aubeute/Schritt).

Um den Einfluss der Guanidinylierung abzuschätzen, wurde das Guanidinoglycosid sowie das Aminoglycosid mit jeweils einem β -Alaninlinker auf den Träger aufgebracht und getestet. Die Inkubation der Arrays mit fluoreszenzmarkiertem AAC(2') und AAC(6') ergab in allen Fällen ein stärkeres Signal für die Bindung von Guanidinoglycosiden zu AAC(2') oder AAC(6') als für die Bindung entsprechender Aminoglycoside. Die größte Steigerung, 7fach für AAC(2') und 8fach für AAC(6'), wurde mit β -Ala-Guanidinoribostamycin beobachtet (Tabelle 1 und Abbildung 2). Aufgrund dieser Studien und der kalorimetrischen Experimente wählten wir β -Ala-Guanidinoribostamycin für weitere, detaillierte Studien aus.

Um sicherzustellen, dass β -Ala-Guanidinoribostamycin ein Substrat für AAC(2') oder AAC(6') ist, wurden kinetische Experimente bei 37 °C durchgeführt und photometrisch verfolgt.^[10] Während Ribostamycin innerhalb von 10 Minuten vollständig umgesetzt wurde, reagierte β -Ala-Guanidinoribostamycin weder mit AAC(2') noch mit AAC(6') (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigte sich, dass β -Ala-Guanidinoribostamycin AAC(2') und AAC(6') inhibiert (Tabelle 2). In allen Fällen war 6'- β -Ala-Guanidinoribostamycin ein nichtkompetitiver Inhibitor der Bindung von Ribostamycin an AAC(2') und AAC(6'). Aus den Daten der kinetischen Experimente wurden die Effekte auf die Inhibitionskonstante K_{ii} und auf die Steigungsinfraktionierungskonstante K_{is} bestimmt. Die Resultate zeigen, dass 6'- β -Ala-Guanidinoribostamycin AAC(6') und AAC(2') K_{ii} - und K_{is} -Werte von 10 bis 200 μM hatten. Dass 6'- β -Ala-Guanidinoribostamycin ein nichtkompetitiver Inhibitor ist, lässt vermuten, dass es sowohl an die beiden freien Enzyme als auch an den Acetyl-CoA-Enzymkomplex bindet. Dies wird auch für die nichtkompetitive Inhibition von Lividomycin an AAC(6') angenommen.^[10]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung einer empfindlichen Mikroarray-Methode zum Screening der Bindung von Antibiotika an Resistenz verursachende Enzyme beschrieben. In Kombination mit anderen Methoden können neue Antibiotika identifiziert werden, die schwach an Resistenz verursachende Enzyme und stark an therapeutische Targets binden. Mit dem Ziel, Inhibitoren für Resistenz-Enzyme zu finden, wurde eine Reihe von Aminoglycosid-Mimetika auf ihre Affinität zu Resistenz verursachenden Enzymen AAC(2') und AAC(6') untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass 6'- β -Ala-Guanidinoribostamycin eine hohe Affi-

nität zu AAC(2') und AAC(6') hat. Weitere Experimente ergaben, dass 6'- β -Ala-Guanidinoribostamycin kein Substrat für die hier untersuchten Enzyme, jedoch ein Inhibitor für die Acylierung verschiedener klinisch relevanter Antibiotika ist. Somit wurde die Nützlichkeit des Screening von Verbindungsbibliotheken auf Antibiotika demonstriert, die die aktuellen bakteriellen Resistenzen umgehen.

Eingegangen am 3. November 2003 [Z53236]

Stichwörter: Antibiotika · Bioorganische Chemie · Hochdurchsatz-Screening · Kohlenhydrate · Kombinatorische Chemie

- [1] C. Walsh, *Nature* **2000**, *406*, 775.
- [2] G. D. Wright, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 563.
- [3] B. Llano-Sotelo, E. F. Azucena, Jr., L. P. Kotra, S. Mabashery, C. S. Chow, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 455.
- [4] D. Barnes-Seeman, S. B. Park, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2376.
- [5] S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011.
- [6] A. N. Koehler, A. F. Shamji, S. L. Schreiber, D. Barnes-Seeman, S. B. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8420.
- [7] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967.
- [8] P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7849.
- [9] S. S. Hegde, F. Javid-Majd, J. S. Blanchard, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45876.
- [10] S. Magnet, T. Lambert, P. Courvalin, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3700.
- [11] S. S. Hegde, T. K. Dam, C. F. Brewer, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **2002**, *41*, 7519.
- [12] T. J. Baker, N. W. Luedtke, Y. Tor, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 9054.
- [13] N. W. Luedtke, T. J. Baker, M. Goodman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12035.
- [14] M. W. Vetting, S. S. Hegde, F. Javid-Majd, J. S. Blanchard, S. L. Roderick, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 653.