

Epigenetik

Design, Synthese und biologische Evaluierung eines niedermolekularen Inhibitors der Histon-Acetyltransferase Gcn5**

Markus Biel, Androniki Kretsovali,*
Efthymia Karatzali, Joseph Papamatheakis und
Athanasios Giannis*

Histon-Proteine sind basische Komponenten des eukaryotischen Chromatins.^[1] Sie bestehen aus einer direkt mit der DNA wechselwirkenden globulären Domäne und einem flexibleren N-terminalen Bereich,^[2] der Ziel zahlreicher posttranslationaler Modifikationen ist. Zu diesen gehören neben der Acetylierung und Methylierung von Lysin- bzw. Argininresten auch die Phosphorylierung von Serinresten sowie die Anheftung einer Ubiquitin-Einheit.^[3] Die Hypothese des „Histon-Codes“^[4] geht davon aus, dass sich mithilfe dieser Modifikationen spezifische Substitutionsmuster auf den Histonen erzeugen lassen, die von regulatorischen Proteinen abgelesen und dadurch mit fundamentalen zellulären Prozessen wie der Aktivierung oder Repression von Transkriptionsvorgängen in Zusammenhang gebracht werden können. Die bislang am besten untersuchte Modifikation ist die Histonacetylierung. So konnte gezeigt werden, dass die Einstellung eines spezifischen Acetylierungsgrades an den Histon-N-termini innerhalb einer bestimmten Genregion, durch das Zusammenspiel selektiver Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) erfolgt.^[5] Eine gezielte Beeinflussung dieser Vorgänge durch niedermolekulare, zellpermeable Inhibitoren ist für die Entschlüsselung des „Histon-Codes“ von außerordentlicher Bedeutung und eröffnet neue Therapiemöglichkeiten für Erkrankungen wie Krebs.^[5,6] Während für die HDACs inzwischen eine ganze Reihe niedermolekularer Inhibitoren beschrieben wurde, von denen sich bereits einige in der klinischen Prüfung befinden,^[7] sind für Histon-Acetyltransferasen kaum solche Verbindungen

bekannt. Erst kürzlich konnte die Anacardsäure bei einem breiten Screening von Pflanzenextrakten mit Antitumoreigenschaften als niedermolekularer Inhibitor der HAT p300 identifiziert werden.^[8]

Viele der bekannten Transkriptionsfaktoren haben eine intrinsische HAT-Aktivität gemeinsam.^[9] Auf der Basis von Sequenzhomologien, aber auch durch Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer biologischen Funktion, können die HATs in drei Familien eingegliedert werden: die GNAT-, CBP/p300- und MYST-Familie.^[9] In vivo sind die Histon-Acetyltransferasen immer mit großen Multiproteinkomplexen assoziiert. So ist die in Hefe vorkommende HAT yGcn5 beispielsweise Teil der Multiproteinkomplexe Ada und SAGA, die sich in den Substratselektivitäten vom freien Enzym unterscheiden.^[9]

Wir berichten hier über die gezielte Entwicklung und die biologische Evaluierung des ersten niedermolekularen Inhibitors der humanen Histon-Acetyltransferase Gcn5, eines prominenten GNAT-Vertreters mit hoher Präferenz für das Histon H3 als Substrat. Ausgehend von einer Arbeitshypothese auf der Basis von bekannten kinetischen Studien und Mechanismusvorschlägen,^[9,10] wurden die α -Methylen- γ -butyrolactone als Inhibitoren etabliert.

Viele Verbindungen mit γ -Butyrolacton-Grundgerüst sind biologisch aktiv,^[11] und diese Substanzen decken ein breites Wirkungsspektrum ab. Da das gemeinsame Strukturmotiv von der Natur privilegiert zu sein scheint, fassten wir die Entwicklung neuartiger HAT-Inhibitoren aus der Klasse der γ -Butyrolactone ins Auge (Abbildung 1b). Die Auswahl

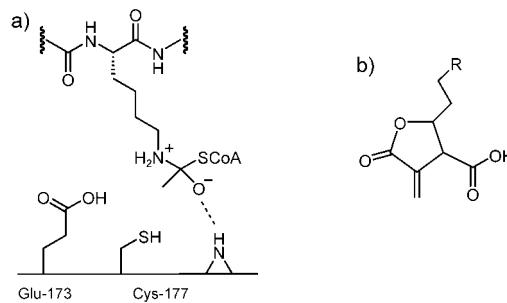


Abbildung 1. a) Tetraedrisches Intermediat im postulierten Katalysemechanismus von Gcn5; b) allgemeine Struktur der Inhibitoren mit Butyrolactongerüst. (R = Alkylkette; siehe Text für Details)

geeigneter Substituenten an den Positionen 2 bis 4 orientiert sich dabei an den Erfordernissen des postulierten Katalysemechanismus.^[10] Man geht davon aus, dass nach der Bindung von Acetyl-CoA an Gcn5 entsprechend dem Induced-fit-Modell die Bindungstasche für das Histon zugänglich wird und sich so ein ternärer Komplex aus Enzym, Acetyl-CoA und Histon bildet. Hierbei deprotoniert die stark konservierte, generelle Base Glu 173, die zur Erhöhung ihrer Basizität von hydrophoben Aminosäuren umgeben ist, die ϵ -Aminofunktion der Lysinseitenkette des Histons und ermöglicht dadurch einen nucleophilen Angriff auf die Sulfanylcarbonylfunktion von benachbartem Acetyl-CoA (Abbildung 1a). Das entstehende tetraedrische Intermediat

[*] Dr. A. Kretsovali, E. Karatzali, Prof. Dr. J. Papamatheakis
Institute of Molecular Biology and Biotechnology
FORTH, Vassilika Vouton
P.O. Box 1527

71110 Heraklion, Kreta (Griechenland)
Fax: (+30) 2810-391-101

E-mail: kretsova@imbb.forth.gr

Dipl.-Chem. M. Biel, Prof. Dr. A. Giannis
Universität Leipzig
Institut für Organische Chemie
Johannisallee 29
04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-9736599
E-mail: giannis@chemie.uni-leipzig.de

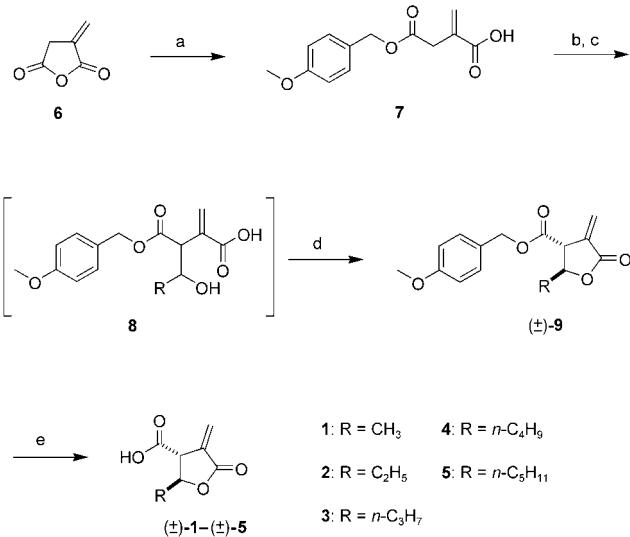
[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. A.K. und J.P. danken für die Förderung durch GSRT/PENED 2002.

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

wird durch eine Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-Amidbindung von Cys177 stabilisiert, und zerfällt abschließend zur generellen Base Glu173, CoASH und acetyliertem Histon.

Die Übersetzung dieser mechanistischen Vorgaben in eine einfache Arbeitshypothese zur Entwicklung neuartiger HAT-Inhibitoren führt zu der grundlegenden Einsicht, dass eine geeignete Struktur über einen Wasserstoffbrückens-acceptor für die Rückgrat-Amidbindung von Cys177 und eine polare Gruppe zur Wechselwirkung mit Glu173 verfügen sollte. Darauf hinaus sollte das Molekül eine ähnlich aliphatische Seitenkette enthalten wie Lysin.

Die Synthese der γ -Butyrolactone **1–5**^[12] beginnt mit der regioselektiven Öffnung von Itaconsäureanhydrid **6** zum 4-Methoxybenzylitaconat **7**, das anschließend durch Lithium-bis(trimethylsilyl)amid in das entsprechende Esterenolat überführt und mit einem aliphatischen Aldehyd zur Hydroxycarbonsäure **8** umgesetzt wird. Der Ringschluss zum Lacton **9** erfolgt ohne vorherige Isolierung von **8** in einem Chloroform/Ethanol-Gemisch, und Erhitzen in einer essigsauren Phenolschmelze ergibt die Endprodukte **1–5** durch Esterspaltung und Freisetzung der Carboxygruppe unter milden Bedingungen (Schema 1).



Schema 1. Synthese der Butyrolactone **1–5**: a) 4-Methoxybenzylalkohol, *n*-Hexan, Toluol, 60 °C, 36 h, 88%; b) LiHMDS, THF, -78 °C, 1 h; c) RCHO, THF, -78 °C, 12 h; d) CHCl₃, EtOH, RT, 72 h; e) Phenol, HOAc, 60 °C, 3 h.

Die Butyrolactone **1–5** wurden in einem In-vitro-HAT-Assay mit rekombinantem Gcn5^[13] oder CBP^[14] und kommerziellen Core-Histonen auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, führen die Verbindungen **3, 4** und **5** zur Inhibition von CBP, wohingegen lediglich **3** gegenüber Gcn5 wirksam ist. Zur Ermittlung der IC₅₀-Werte wurde die Menge an enzymatisch acetyliertem Histon in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Verbindungen **3–5** eine schwache Inhibition von CBP hervorrufen (IC₅₀-Werte für CBP: **3**: 0.5 mM, **4** und **5**: 1.7–2 mM); das Butyrolacton **3**

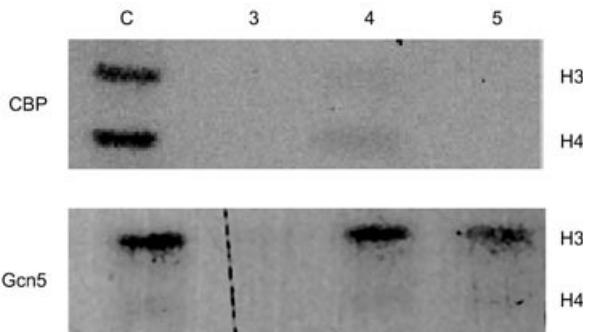


Abbildung 2. Inhibition der HATs CBP und Gcn5 durch die Verbindungen **3, 4** und **5**: Während CBP durch **3, 4** und **5** inhibiert wird, zeigt ausschließlich Verbindung **3** gegenüber der Gcn5 eine entsprechende Wirksamkeit. Die Kontrolle C enthält 10 µg Core-Histon, 0.05 µCi [³H]-Acetyl-CoA sowie 10 ng CBP bzw. 100 ng GST-Gcn5. Die Inhibitoren wurden jeweils in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Die Auftrennung der Histone erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese (12% SDS) mit nachfolgender Quantifizierung im Phosphoimager. H3: Histon 3; H4: Histon 4.

inhibiert Gcn5 hingegen mit einem IC₅₀-Wert von 100 µM (Abbildung 3). In diesem Zusammenhang erscheint es uns wichtig anzumerken, dass der K_d-Wert für die Bindung des Histons H3 durch Gcn5 (oder auch PCAF) in Gegenwart von Acetyl-CoA bei ca. 100 µM liegt.^[9a,15,16] Unser Inhibitor zeigt also eine vergleichbare Affinität zu Gcn5 wie das natürliche Substrat H3 und ist somit ein guter Ausgangspunkt zur Aufstellung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

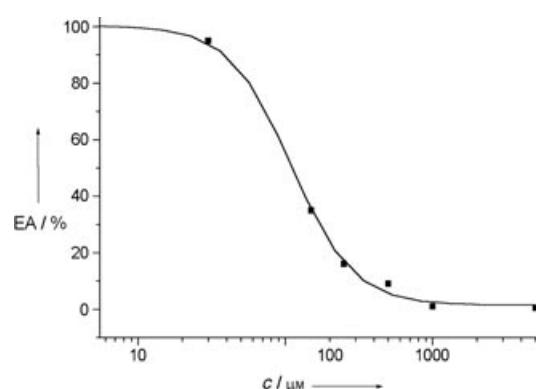


Abbildung 3. Zur Bestimmung des IC₅₀-Werts wurde das Butyrolacton **3** in verschiedenen Konzentrationen *c* zusammen mit 100 ng Gcn5, 3 µg Core-Histon (Sigma) sowie 0.05 µCi [¹⁴C]-Acetyl-CoA (Amersham) inkubiert. Die Menge des dabei acetylierten Histons wurde nach Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese (12% SDS) quantifiziert. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen. EA = Enzymaktivität.

Die Länge der aliphatischen Kette an Position 4 des Butyrolactons scheint ausschlaggebend für die biologische Wirksamkeit zu sein. In enzymatischen Untersuchungen stellten wir zudem fest, dass die Inhibition nicht zeitabhängig verläuft. Diese Ergebnisse sprechen für eine nicht-irreversible Hemmung des Enzyms. Durch die Variation des

Substituenten an Position 2 steht darüber hinaus eine Möglichkeit für die Optimierung des Inhibitors **3** offen.

Die Identifizierung niedermolekularer Inhibitoren für Histon-Acetyltransferasen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Untersuchung von Prozessen, die mit dem Modell des „Histon-Codes“ in Zusammenhang stehen. Aufbauend auf den bisher beschriebenen kinetischen Studien und Enzymkatalysemechanismen konnten wir durch rationales Design den Gcn5-Inhibitor **3** identifizieren. Weiterhin wurde für **3** eine nicht-irreversible Inhibition der Gcn5 ermittelt, sodass eine 1,4-Addition von nucleophilen Gruppen des Enzyms an die Enon-Einheit wenig wahrscheinlich ist. Infolgedessen eröffnet die Derivatisierung des Butyrolactons **3**^[17] an Position 2 einen erfolgversprechenden Weg zum Studium von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

Eingegangen am 29. Januar 2004,
veränderte Fassung am 28. April 2004 [Z53879]

Stichwörter: Biologische Aktivität · Epigenetik · Histon-Acetyltransferase · Histon-Code · Inhibitoren

- [1] R. D. Kornberg, J. O. Thomas, *Science* **1974**, *184*, 865–868.
- [2] K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, *389*, 251–260.
- [3] S. L. Berger, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 142–148.
- [4] a) B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, *403*, 41–45; b) M. Izuka, M. M. Smith, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2003**, *13*, 154–160.
- [5] D. Chung, *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, S10–S11.
- [6] a) S. L. Schreiber, B. E. Bernstein, *Cell* **2002**, *111*, 771–778; b) P. Workman, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *1*, 342–352.
- [7] T. A. Miller, D. J. Witter, S. Belvedere, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5097–5116.

- [8] K. Balasubramanyam, V. Swaminathan, A. Ranganathan, T. K. Kundu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19134–19140.
- [9] a) S. Y. Roth, J. M. Denu, C. D. Allis, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 81–120; b) R. Marmorstein, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 433–444; c) M. J. Carrozza, R. T. Utley, J. L. Workman, J. Côté, *Trends Genet.* **2003**, *19*, 321–329.
- [10] R. C. Trievel, J. R. Rojas, D. E. Sterner, R. N. Venkataramani, L. Wang, J. Zhou, C. D. Allis, S. L. Berger, R. Marmorstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8931–8936.
- [11] a) H. M. R. Hoffmann, J. Rabe, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 96–112; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 94–110; b) A. G. González, M. H. Silva, J. I. Padrón, F. Léon, E. Reyes, M. Álvarez-Mon, J. P. Pivel, J. Quintana, F. Estévez, J. Bermejo, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2358–2361; c) F. P. Kuhajda, E. S. Pizer, J. N. Li, N. S. Mani, G. L. Frehywot, C. A. Townsend, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3450–3454; d) H. M. Ogmundsdóttir, G. M. Zoega, S. R. Gissurarson, K. Ingólfssdóttir, *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 107–115; e) A. Randazzo, C. Debitus, L. Minale, P. P. Garcia, M. J. Alcaraz, M. Paya, L. Gomez-Paloma, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 571–575; f) A. E. Mitchell, J. Zheng, B. D. Hammock, M. Lo Bello, A. D. Jones, *Biochemistry* **1998**, *37*, 6752–6759; g) A. Huwe, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2170–2187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2122–2138.
- [12] R. M. Carlson, A. R. Oyler, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 4065–4069.
- [13] E. Smith, J. Belote, R. Schlitz, X. Yang, P. Morre, S. Berger, Y. Nakatani, C. Allis, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2948–2954.
- [14] J. Chrvia, R. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. Montminty, R. Goodman, *Nature* **1993**, *365*, 855–859.
- [15] K. G. Tanner, M. R. Langer, Y. Kim, J. M. Denu, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11961–11969.
- [16] K. G. Tanner, M. R. Langer, Y. Kim, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22048–22055.
- [17] Die Struktur der Verbindungen **1–5** wurde mithilfe von NOE-Experimenten bestimmt.