

Metallionen als Cofaktoren bei der Hemmstoffbindung an Methionin-Aminopeptidase: eine kritische Betrachtung von In-vitro-Metalloenzym-Assays**

Rolf Schiffmann, Andreas Heine, Gerhard Klebe und Christian D. P. Klein*

Methionin-Aminopeptidasen (MetAPs) sind stark konservierte und weit verbreitete Metalloproteasen, die das N-terminale Initiator-Methionin von neu translatierten Polypeptidketten entfernen. Hemmstoffe von MetAPs haben zahlreiche biologische Effekte und werden daher in einer Vielzahl therapeutischer Bereiche entwickelt, z. B. als Mittel gegen Krebserkrankungen,^[1,2] als Antiinfektiva^[3] und als Mittel gegen rheumatoide Arthritis.^[4] Es sind zahlreiche Röntgenstrukturen von MetAPs publiziert worden, darunter auch solche des humanen Subtyps II^[5] und der *E.-coli*-MetAP.^[6] Alle MetAPs weisen das „Pita-Brot“-Faltungsmotiv auf. Die aktiven Zentren der bekannten MetAPs sind strikt konserviert – alle enthalten identische metallbindende Aminosäuren (2 × Asp, 2 × Glu, 1 × His), die zwei eng benachbarte Metallionen komplexieren. Diese Metallionen aktivieren ein Wassermolekül für den nucleophilen Angriff auf die Amidbindung des N-terminalen Methionins der MetAP-Substrate. Für In-vitro-Experimente wird meistens Cobalt(II) als MetAP-Cofaktor verwendet, denn das Dicobalt-Enzym zeigt die höchste katalytische Aktivität.

Bei der Suche nach neuen MetAP-Hemmstoffen haben wir Moleküldynamik-Studien^[7,8] und ein virtuelles Screening an der *E.-coli*-MetAP durchgeführt. Das aktive Zentrum wurde sorgfältig für das virtuelle Screening vorbereitet; ein Schwerpunkt lag hierbei auf den beiden an die Cobalt-Ionen gebundenen Wassermoleküle. Unter den Treffern des virtuellen Screenings war Thiabendazol (**1**), ein weithin verwendeter fungizider und antiparasitärer Wirkstoff. Die Hemmaktivität dieser Substanz gegen *E.-coli*-MetAP^[6] wurde mithilfe einer publizierten^[9] In-vitro-Methode getestet (Tabelle 1). Wie bei allen anderen bekannten MetAP-in-vitro-Assays wurde ein Überschuss an Cobalt-Ionen im Puffer

[*] R. Schiffmann, Dr. C. D. P. Klein
FR 8.2 Pharmazeutische und Medizinische Chemie
Universität des Saarlandes
66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-4386
E-mail: cdpk@mx.uni-saarland.de

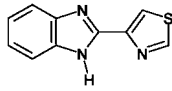
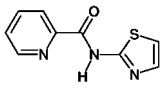
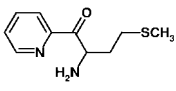
Dr. A. Heine, Prof. Dr. G. Klebe
Institut für Pharmazeutische Chemie
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)

[**] Wir danken Prof. R. Hartmann für die Unterstützung unserer Arbeiten. Dieses Projekt wurde ermöglicht durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (KL 1356) und den Fonds der Chemischen Industrie.



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

Tabelle 1: Nichtkovalent bindende Hemmstoffe von MetAP.

			
	Thiabendazol (1)	2 (Luo et al. ^[3])	3 (Douangamath et al. ^[10])
Röntgenstruktur des MetAP-Komplexes	Diese Publikation (PDB-Code 1YVM)	Diese Publikation ^[12]	Lit. [10]
Affinität für MetAP	$K_i = 0.4 \mu\text{M}$ (<i>E. coli</i>)	$\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$ (<i>E. coli</i>)	$\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{M}$ (<i>S. aureus</i>)

verwendet, um eine ausreichende Aktivität des Enzyms zu erzielen.

Wir stellten fest, dass Thiabendazol (**1**) mit $K_i = 0.4 \mu\text{M}$ an *E.-coli*-MetAP bindet. **1** wurde im Folgenden als Leitstruktur für die Synthese von Benzimidazol-Derivaten mit gesteigerter Aktivität verwendet.^[11] Da MetAP ein Enzym mit essenzieller Bedeutung in allen Zellen ist, erwarteten wir, dass **1**, und insbesondere die von uns hergestellten potenteren Analoga, antibakteriell gegen *E. coli* wirken sollten. Alle Verbindungen waren jedoch (in Konzentrationen bis 1 mM) inaktiv gegen *E. coli*. Dieses enttäuschende Ergebnis, das mit Beobachtungen bei einer strukturell unterschiedlichen, aber noch wirksameren Klasse von MetAP-Hemmstoffen^[3] vergleichbar ist, wurde zunächst mit einer unzureichenden Aufnahme der Verbindungen in die Bakterienzelle erklärt. Um eine zuverlässige Grundlage für die Weiterentwicklung der Hemmstoffe zu erhalten, haben wir die *E.-coli*-MetAP mit und ohne Liganden kristallisiert und die jeweiligen dreidimensionalen Strukturen durch Röntgenbeugung mit einer Auflösung von 1.6 Å aufgeklärt.

Die Ergebnisse des virtuellen Screenings ließen einen Bindungsmodus erwarten, bei dem Thiabendazol (**1**) in enger Nachbarschaft zu den beiden Cobalt-Ionen im aktiven Zentrum der *E.-coli*-MetAP lokalisiert ist. **1** bildet Komplexe mit Metallionen, und wir erwarteten, dass der Hemmstoff mit den beiden Kationen im aktiven Zentrum wechselwirkt. Es war daher völlig überraschend, dass der Hemmstoff nicht an die beiden „regulären“ Cobalt-Ionen bindet, sondern an ein zusätzliches, im Eingangsbereich des aktiven Zentrums lokalisiertes Metallion, das in der ligandenfreien Struktur nicht vorhanden ist. Der Bindungsmodus ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Das zusätzliche Cobalt-Ion wird in einer nahezu perfekt oktaedrischen Koordinationsgeometrie durch zwei Thiabendazol-Stickstoffatome, ein Histidin-Stickstoffatom (His 79) und drei Wassermoleküle komplexiert.

Wir haben weiterhin die dreidimensionale Struktur von *E.-coli*-MetAP mit der von Luo et al.^[3] beschriebenen Leitstruktur **2** bei einer Auflösung von 1.6 Å bestimmt. Diese Verbindung bindet über das Pyridin- und Amid-Stickstoffatom ebenfalls an ein zusätzliches Cobalt-Ion, das mit His 79 und drei Wassermolekülen im Eingangsbereich des aktiven Zentrums wechselwirkt.^[12] Möglicherweise trägt auch das Thiazol-Stickstoffatom, das 2.5 Å vom Wassermolekül gegenüber des Pyridin-Stickstoffatoms und 3 Å vom Cobalt-Ion entfernt ist, zur Stabilisierung des Komplexes bei.

Das zusätzliche Cobalt-Ion an His 79 ist nicht vorhanden, wenn das Enzym ohne Hemmstoffe kristallisiert wird. Dies wurde bereits in den Arbeiten Lowthers et al.^[6] gezeigt und

von uns bestätigt, indem wir die Struktur des Enzyms ohne Ligand bei ansonsten identischen Bedingungen bestimmten.

Im Laufe dieser Arbeiten berichteten Douangamath und Kollegen^[10] von einer anderen Klasse von MetAP-Hemmstoffen, darunter Verbindung **3**, und den Bindungsmodi dieser Verbindungen an *Staphylococcus-aureus*-MetAP.

Es ist bemerkenswert, dass auch **3** und ein davon abgeleiteter Hemmstoff an ein zusätzliches Cobalt-Ion binden, das im freien Enzym nicht vorhanden ist. Anders als bei den Komplexen der Substanzen **1** und **2** ist dieses Cobalt-Ion nicht an His 79, sondern an His 178 gebunden, und die Hemmstoffe gehen zusätzliche Wechselwirkungen mit den „regulären“ Cobalt-Ionen im aktiven Zentrum ein. Douangamath und Kollegen berichteten außerdem über einen Hemmstoff, dessen Bindung nicht durch ein zusätzliches Cobalt-Ion vermittelt wird.

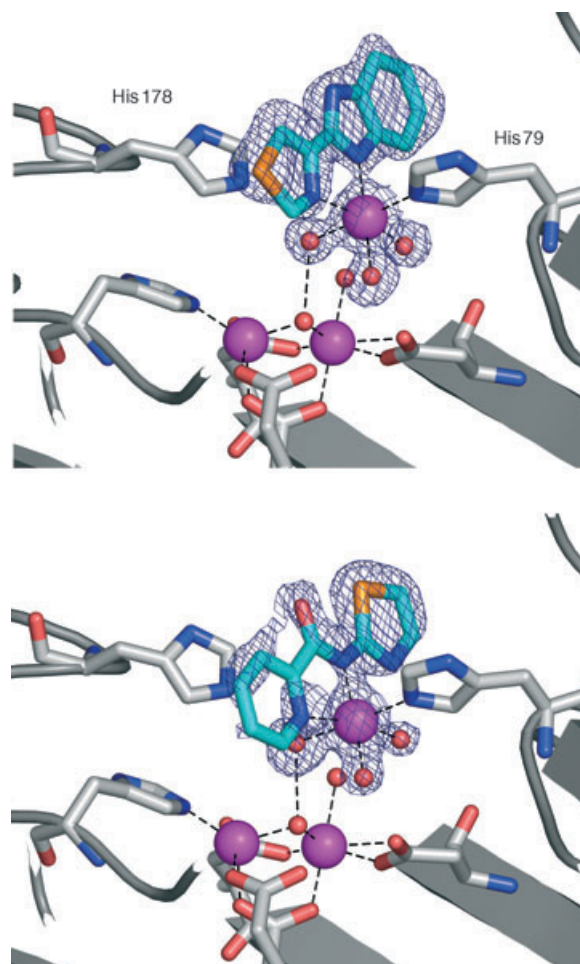


Abbildung 1. Elektronendichte von Thiabendazol (**1**, oben) und Verbindung **2** (unten) in der Nähe des aktiven Zentrums von *E.-coli*-MetAP. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte ist bei 1σ innerhalb eines Umkreises von 1.5 Å um den Hemmstoff, das zusätzliche Cobalt-Ion und die daran gebundenen Wassermoleküle dargestellt. C türkis, Co magenta, N blau, O rot, S gelb.

Drei Forschungsgruppen haben unabhängig voneinander strukturell diverse MetAP-Hemmstoffe entwickelt, deren (teilweise beträchtliche) In-vitro-Aktivität vom Vorliegen zusätzlicher Metallionen abhängt. Die Bildung ternärer Komplexe mit zusätzlichen Kationen hat ihre Ursache in der hohen Konzentration freier Metallionen im In-vitro-Testsystem; wie auch schon Douangamath und Mitarbeiter^[10] angemerkt haben, spiegelt dies sicher nicht die Bedingungen in der lebenden Zelle wider. Die Hemmstoffe sind daher – höchstwahrscheinlich – nicht brauchbar für einen therapeutischen In-vivo-Einsatz.

Eine naheliegende Lösung des Problems könnte darin gesehen werden, die Konzentration von Metallionen im Puffer des Enzym-Assays zu senken. Dies ist jedoch kein brauchbarer Ausweg, denn MetAPs und zahlreiche andere Metalloenzyme benötigen hohe Metallionen-Konzentrationen (üblicherweise 1 μM bis 1 mM), um unter In-vitro-Bedingungen aktiv zu sein. Die Konzentration von Metallionen in lebenden Zellen ist jedoch um mehrere Größenordnungen geringer.^[13]

Aus den hier dargestellten Resultaten können mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden. Zunächst möchten wir die Bedeutung von strukturellen Informationen über den Enzym-Hemmstoff-Komplex herausstellen. Ohne entsprechendes Wissen ist die Interpretation von Daten aus In-vitro-Experimenten oft schwierig oder unzuverlässig. Die Verbindungen **1–3** dienten als Grundlage für Struktur-Aktivitäts-Studien, obwohl inzwischen bezweifelt werden muss, dass sie unter physiologischen Bedingungen an MetAP binden. Die Inaktivität der Verbindungen in vivo wurde fälschlicherweise mit unzureichenden pharmakokinetischen Eigenschaften erklärt.

Weiterhin scheint ein vorsichtigerer Umgang mit Ergebnissen von In-vitro-Assays angebracht, vor allem im Bereich von Metalloenzymen. Es erscheint ratsam, potenzielle Leitstrukturen nicht nur im Hinblick auf pharmakokinetische Eigenschaften (log*P*, Molekülmasse, Wasserstoffbrücken) zu analysieren, sondern auch die Neigung zur Komplexbildung mit kleinen, anorganischen Ionen zu berücksichtigen. Bedeutungslose In-vitro-Daten könnten so vermieden werden. Es könnte auch verhindert werden, dass sinnlos in Entwicklungskandidaten investiert wird, die unzureichende pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, da sie im Verdauungstrakt an Metallionen oder andere anorganische Substanzen aus Nahrungsmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln binden. Es sollte vergleichsweise einfach sein, einen Filter-Algorithmus zu entwerfen, der nahe beieinander liegende und zur Komplexbildung neigende Heteroatome identifiziert. Ein solcher Filter könnte leicht in Programme eingebaut werden, die zur Verwaltung von Substanzdatenbanken oder zur Selektion von Verbindungen für virtuelles oder experimentelles Hochdurchsatz-Screening dienen.

Katz und Mitarbeiter^[14] schlugen 1998 vor, Zink-Ionen bewusst als Mediatoren für die Bindung von Serinprotease-Hemmstoffen einzuplanen. Diese Gruppe beschrieb unseres Wissen zum ersten Mal eine Ligandenbindung durch zusätzliche Übergangsmetallionen. In Analogie zu Katz et al. könnten wir vorschlagen, Cofaktor-abhängige Hemmstoffe mit gesteigerter In-vitro-Affinität zu entwerfen. Neuere Er-

kenntnisse über die Zink-Homöostase^[13] zeigen jedoch, dass die Konzentration freier Zink-Ionen in der Zelle für diesen Zweck zu niedrig ist. Es muss angenommen werden, dass die intrazelluläre Konzentration anderer, weniger inerte (z. B. redoxaktiver) Kationen noch strenger kontrolliert wird als die der relativ „harmlosen“ Zink-Ionen. Möglicherweise lassen sich aber weiter verbreitete inerte Kationen wie Magnesium und Calcium als Mediatoren für die Bindung von Liganden einsetzen. Dies würde es erlauben, die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung an die intrazelluläre Konzentration der betreffenden Ionen zu koppeln, die wiederum (insbesondere im Fall von Calcium) eine große Bedeutung für diverse Signaltransduktionsprozesse haben. Der gezielte Entwurf spezifischer und hoch affiner Liganden, die ternäre Komplexe mit bestimmten Kationen und biologischen Zielmolekülen eingehen, wird allerdings eine schwierige Aufgabe.

Experimentelles

Kristallisation und Bestimmung der Röntgenstruktur: Rekombinante eMetAP (Arg175Gln, um eine Thrombinspaltstelle in einer Schleife an der Oberfläche zu entfernen) wurde in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert und gereinigt.^[2]

Kristalle wurden mit einer leichten Änderung der vorher beschriebenen Bedingungen^[15] gezüchtet. Frisch hergestelltes Enzym wurde in einem Puffer aus 25 mM Hepes, pH 6.8, 25 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM CoCl_2 und 15 mM Methionin aufbewahrt. Kristalle des Cobalt(II)-Enzyms wurden über Nacht bei 22°C mit der Dampfdiffusionstechnik erhalten, nachdem 20 μL „sitting drops“ der Proteinlösung (13.5 mg mL^{-1}) im Puffer (mit 48.8 mM *n*-Octanoylsucrose, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA) im Verhältnis 1:1 mit 500 μL Reservoirolösung (24–33 % PEG 4000, 0.1M Hepes, pH 7.1, 2 mM CoCl_2) gemischt wurden.

Kristalle des Thiabendazol-Komplexes wurden erhalten, indem das Enzym (13.5 mg mL^{-1} , 49.8 mM *n*-Octanoylsaccharose) bei Raumtemperatur 5 min mit einer Lösung des Hemmstoffs in DMSO inkubiert wurde. Das Inhibitor-Enzym-Verhältnis betrug 5:1 (1 % DMSO, 48.8 mM *n*-Octanoylsaccharose) nachdem der vorher gebildete Komplex mit Reservoirolösung (0.1M Hepes, pH 7.1, 2 mM CoCl_2 , 24–33 % PEG 4000) gemischt wurde.

Der Datensatz wurde mit einem Rigaku/MSD-Drehanodengenerator (RU300) bei 50 kV und 90 mA gemessen; die Aufnahme der gemessenen Reflexe erfolgte mit einem R-axis-4++-„Image-Plate“-Detektor. 360 Beugungsbilder mit $\delta_\phi = 0.5^\circ$ wurden mit einem Detektorabstand von 100 mm bei -170°C gesammelt. 18 % Glycerol in der Mutterlauge diente als Kälteschutzpuffer.

Für Verbindung **2** betrug das Inhibitor-Enzym-Verhältnis 2.5:1 und die Reservoirolösung enthielt 4 mM CoCl_2 . Dieser Datensatz wurde mit einem R-axis-4-„Image-Plate“-Detektor unter gleichen Bedingungen und Parametern wie oben gemessen und bestand aus 240 Beugungsbildern.

Die Daten wurden mit dem Programm HKL2000 prozessiert und skaliert.^[16] Die von Lowther et al. veröffentlichte MetAP-Struktur (PDB-Code 2MAT) wurde ohne die Cobalt-Atome und Wassermoleküle als Ausgangsstruktur für den Molekülaustausch mit dem Programm PHASER verwendet.^[17] Die anschließende Verfeinerung als starre Gruppe erfolgte mit dem Programm CNS.^[18] Im weiteren Verlauf wurden mit CNS die Atompositionen verfeinert und eine „Simulated-Annealing“-Verfeinerung vorgenommen, gefolgt von einer Verfeinerung mit fixierten B-Werten. Anschließend wurde die Verfeinerung mit dem Programm SHELXL-97 fortgesetzt.^[19] Mindestens 20 Minimierungszyklen nach dem Verfahren des konjugierten Gradienten mit Einschränkungen für Bindungslängen, -winkel und B-Werte wurden für jede Verfeinerung durchgeführt. Am Ende der

Verfeinerung wurden Wasserstoffatome nach dem Reitermodell in berechnete Positionen gesetzt, wobei keine weiteren Parameter verwendet wurden. Zwischen den Verfeinerungsschritten wurden Modelle mit dem Programm O²⁰ erstellt.

Die Atomkoordinaten wurden in der PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) mit dem Zugriffscode 1YVM deponiert. Alle Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt.^[21] Die Raumstrukturen wurden überprüft; Ramachandran-Diagramme wurden mit dem Programm Procheck erzeugt.^[22]

Eingegangen am 17. Februar 2005

Online veröffentlicht am 4. Mai 2005

Stichwörter: Inhibitoren · Metalloenzyme · Methionin-Aminopeptidase · Röntgenbeugung · Wirkstoff-Design

- [1] N. Sin, L. Meng, M. Q. W. Wang, J. J. Wen, W. G. Bornmann, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6099.
- [2] W. T. Lowther, D. A. McMillen, A. M. Orville, B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12153.
- [3] Q. Luo, J. Li, Z. Liu, L. Chen, J. Li, Z. Qian, Q. Shen, Y. Li, G. Lushington, Q. Ye, F. Nan, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2631.
- [4] S. G. Bernier, D. D. Lazarus, E. Clark, B. Doyle, M. T. Labenski, C. D. Thompson, W. F. Westlin, G. Hannig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10768.
- [5] S. Liu, J. Widom, C. W. Kemp, C. M. Crews, J. Clardy, *Science* **1998**, *282*, 1324.
- [6] W. T. Lowther, A. M. Orville, D. T. Madden, S. Lim, D. H. Rich, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7678.
- [7] C. Klein, G. Folkers, *Oncol. Res. Anti-Cancer Drug Des.* **2003**, *13*, 513.
- [8] C. Klein, R. Schiffmann, G. Folkers, S. Piana, U. Röthlisberger, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47862.
- [9] G. Yang, R. B. Kirkpatrick, T. Ho, G. F. Zhang, P. H. Liang, K. O. Johanson, D. J. Casper, M. L. Doyle, J. P. Marino, S. K. Thompson, W. F. Chen, D. G. Tew, T. D. Meek, *Biochemistry* **2001**, *40*, 10645.
- [10] A. Douangamath, G. E. Dale, A. D'Arcy, M. Almstetter, R. Eckl, A. Frutos-Hoener, B. Henkel, K. Illgen, S. Nerdinger, H. Schulz, A. MacSweeney, M. Thormann, A. Tremel, S. Pierau, S. Wadman, C. Oefner, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1325.
- [11] C. Klein, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [12] Elektronendichte war eindeutig erkennbar in einer Position, die dem zusätzlichen Cobalt-Ion und den beiden Wassermolekülen in der Struktur des Thiabendazol-Komplexes entspricht. Zusätzliche Dichte ist in einer Position vorhanden, die ein planarer Ligand einnimmt, der über die Stickstoffatome an das Cobalt-Ion bindet. Wir können jedoch multiple Bindungsmodi nicht ausschließen, da die Elektronendichte für einen Teil des Liganden nicht eindeutig ist. Aus diesem Grund wurde die Struktur nicht in der PDB hinterlegt.
- [13] Y. Hitomi, C. E. Outten, T. V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8614.
- [14] B. A. Katz, J. M. Clark, J. S. Finer-Moore, T. E. Jenkins, C. R. Johnson, M. J. Ross, C. Luong, W. R. Moore, R. M. Stroud, *Nature* **1998**, *391*, 608.
- [15] W. T. Lowther, A. M. Orville, D. T. Madden, S. Lim, D. H. Rich, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7678.
- [16] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307 (Macromolecular Crystallography Part A).
- [17] L. C. Storoni, A. J. McCoy, R. J. Read, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 432.
- [18] A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, *54*, 905.
- [19] G. M. Sheldrick, T. R. Schneider, *Methods Enzymol.* **1997**, 319.
- [20] T. A. Jones, J. Y. Zou, S. W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1991**, *47*, 110.
- [21] W. L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*, **2002**, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>.
- [22] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283.