

**Inhibitoren**

DOI: 10.1002/ange.200503003

**Fluoreszierende Inhibitoren von IspF, einem Enzym im „Nicht-Mevalonat-Biosyntheseweg“ der Isoprenoide und möglichen Ziel einer Antimalariatherapie\*\***

*Christine M. Crane, Johannes Kaiser, Nicola L. Ramsden, Susan Lauw, Felix Rohdich, Wolfgang Eisenreich, William N. Hunter,\* Adelbert Bacher\* und François Diederich\**

Malaria bleibt eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen in den davon betroffenen Gebieten und ist für die Infektion von 300–500 Millionen und den Tod von 2.5–5 Millionen Menschen pro Jahr verantwortlich. Die zuneh-

[\*] N. L. Ramsden, Prof. Dr. W. N. Hunter  
Division of Biological Chemistry and Molecular Microbiology  
School of Life Sciences  
MSI/WTB Complex  
University of Dundee  
Dow Street, Dundee DD1 5EH (Großbritannien)  
Fax: (+44) 138-232-2558  
E-mail: w.n.hunter@dundee.ac.uk

Dr. J. Kaiser, S. Lauw, Dr. F. Rohdich, Dr. W. Eisenreich,  
Prof. Dr. A. Bacher  
Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-289-13363  
E-mail: adelbert.bacher@ch.tum.de

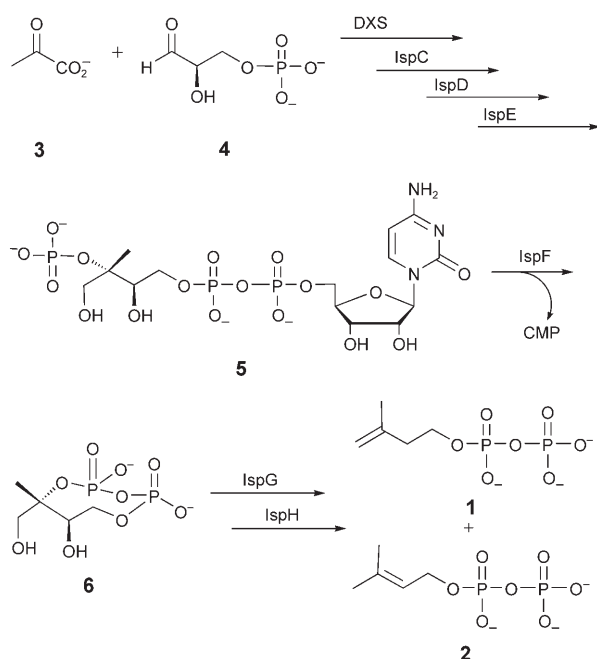
C. M. Crane, Prof. Dr. F. Diederich  
Laboratorium für Organische Chemie  
ETH Hönggerberg  
HCI, 8093 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 44-632-1109  
E-mail: diederich@org.chem.ethz.ch

[\*\*] Wir danken den folgenden Institutionen für finanzielle Unterstützung: der Hans-Fischer Gesellschaft (an J.K.), dem Wellcome Trust (an W.N.H.), dem Biotechnology and Biological Sciences Research Council (an W.N.H.) und InPharmatica (an W.N.H.). Wir danken Prof. D. Arigoni und Dr. L. Kemp für wertvolle Ratschläge und Hilfestellungen. IspF = 2C-Methyl-D-erythrit-2,4-cyclodiphosphat-Synthase.



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

mende Verbreitung von gegen die derzeit verabreichten Medikamente resistenten Stämmen der unterschiedlichen *Plasmodium*-Parasiten erfordert eine rasche Suche nach Therapieansätzen, die auf neuen Wirkmechanismen basieren.<sup>[1]</sup> Enzyme aus dem „Nicht-Mevalonat-Biosyntheseweg“ zum Aufbau der C<sub>5</sub>-Vorstufen von Terpenen, Isopentenylidiphosphat (IPP, **1**) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **2**), wurden vor kurzem als mögliche Zielverbindungen für die Entwicklung neuer Antimalaria- und antimikrobieller Wirkstoffe beschrieben.<sup>[2,3]</sup> Der „Nicht-Mevalonat-Biosyntheseweg“<sup>[4]</sup> beruht auf der Kondensation von Pyruvat (**3**) mit Glyceraldehyd-3-phosphat (**4**; Schema 1) und ist die einzige

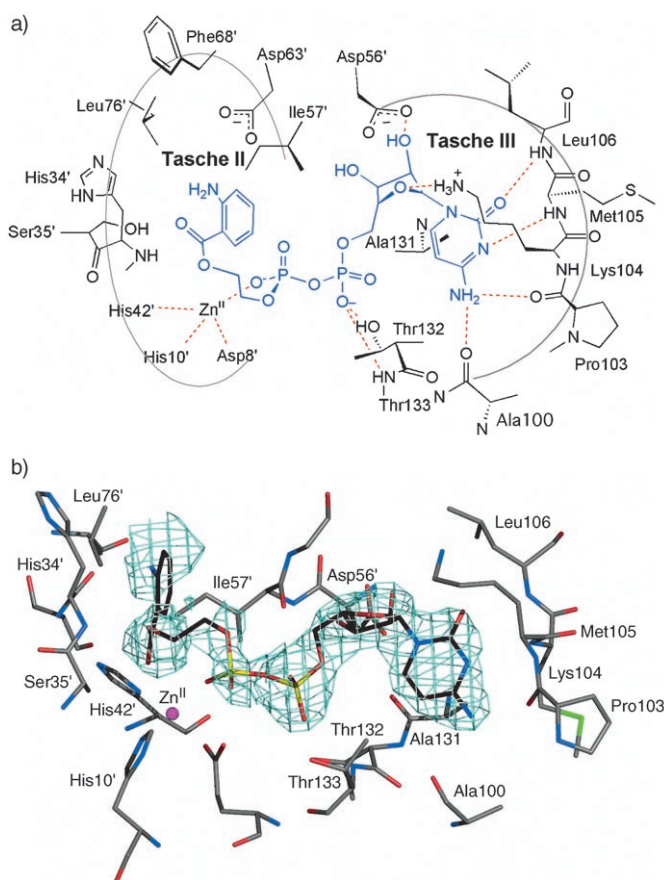


**Schema 1.** Der „Nicht-Mevalonat-Weg“ in der Biosynthese der C<sub>5</sub>-Vorstufen für Terpene, IPP (1) und DMAPP (2) (siehe Hintergrundinformationen). DXS = 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, CMP = Cytidin-5'-monophosphat.<sup>[4-8]</sup>

Quelle für **1** und **2** in Plastiden höherer Pflanzen<sup>[5a-c]</sup> sowie in zahlreichen Bakterien,<sup>[4b,5c,6]</sup> darunter auch den für schwere Krankheitsbilder verantwortlichen, wie *Mycobacterium tuberculosis*<sup>[6b]</sup> und den protozoischen *Plasmodium*-Parasiten (*Apicomplexa*).<sup>[3]</sup> Da Säuger ausschließlich den „Mevalonat-Weg“ zur Synthese von **1** und **2** verwenden,<sup>[6]</sup> könnte die Entwicklung niedermolekularer Leitstrukturen zur Hemmung der Enzyme auf dem „Nicht-Mevalonat-Weg“ entscheidend für den Weg zu neuen Antimalaria-Wirkstoffen werden.<sup>[1b,2,3]</sup>

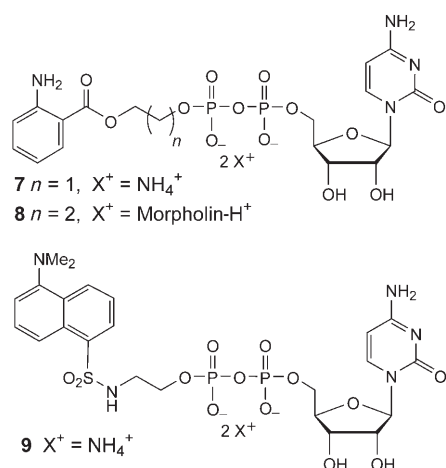
Wir haben das Enzym IspF (2C-Methyl-D-erythrit-2,4-cyclodiphosphat-Synthase, *ygbB*) als Zielverbindung für die strukturbasierte Entwicklung von Leitstrukturen ausgewählt.<sup>[7,8]</sup> IspF ist das fünfte Enzym im „Nicht-Mevalonat-Weg“ und katalysiert die Cyclisierung von **5** zu **6**. Den Kristallstrukturen (Proteindatenbank(PDB)<sup>[8,9]</sup>-Einträge 1GX1 und 1JY8) zufolge liegt IspF als C<sub>3</sub>-symmetrisches Homotrimer vor. Die topologisch äquivalenten aktiven Zentren befinden sich dabei an den Grenzflächen benachbarter Unter-

einheiten. Die starre, hochkonservierte „Tasche III“ eines Monomers bindet den Cytidinrest von **5**, und die größere, flexiblere „Tasche II“ des angrenzenden Monomers bindet die 2C-Methyl-D-erythrit-Teile von **5** und **6** (für die Proteinreste, die diese Taschen bilden, siehe Abbildung 1b). Ta-



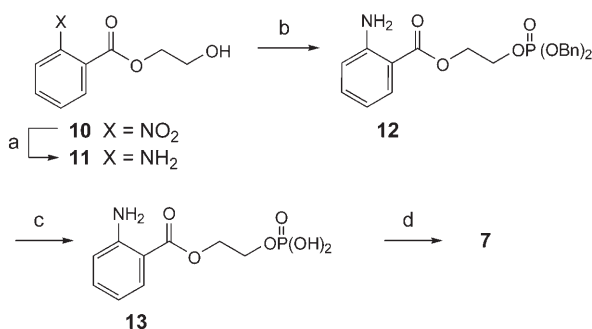
**Abbildung 1.** Bindungsmodus von **7** in der Kristallstruktur des ternären Komplexes mit IspF und  $\text{Zn}^{\text{II}}$  bei 2.3 Å Auflösung.<sup>[17]</sup> Die gezeigte Ligandenbindung erfolgt an der Grenzfläche der Untereinheiten A und C. Die mit ' gekennzeichneten Reste stammen vom benachbarten Monomer. Fünf der sechs unabhängigen aktiven Zentren von IspF zeigen die abgebildete Bindungskonformation. a) Bindungsmodus von **7** (blau) mit möglichen Wasserstoffbrücken als rote gestrichelte Linien. b)  $F_o - F_c$ -Differenzelektronendichteverteilung mit einer Umhüllung auf dem 2 $\sigma$ -Niveau, umgeben von Proteinresten innerhalb eines Abstands von 4 Å. Farbkodierung: C grau, O rot, N blau, S grün, P gelb, Zn lila.

sche II enthält auch ein tetraedrisch koordiniertes  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Ion. Die Inhibitoren **7–9** wurden mithilfe des Molekülmodellierungsprogramms MOLOC<sup>[10,11]</sup> so entworfen, dass sie die beiden Taschen besetzen. Da bisher keine Hemmstoffe von IspF beschrieben waren, wählten wir in einem ersten Schritt den Cytidin-5'-diphosphat(CDP)-Teil des natürlichen Substrats zur Besetzung der Tasche III. Dessen Diphosphatrest ist über einen Abstandhalter geeigneter Länge mit einem aromatischen Rest verknüpft, der die durch Leu76', Phe61' und Ile57' gebildete hydrophobe Spalte der Tasche II besetzen soll. (Abbildung 1). Da wir in dieser frühen Phase des Projekts auch daran interessiert waren, einen Fluoreszenzbasierten Enzymhemmungstest zu entwickeln, wählten wir



die Reste Anthranilat (2-Aminobenzoat) und Dansyl (5,5-Dimethylaminonaphthalinsulfamoyl) als aromatische Einheiten für die Besetzung der Tasche II aus.<sup>[12]</sup>

Die Synthese der Zielverbindung **7** ist in Schema 2 gezeigt (siehe Hintergrundinformationen für die Synthese von **8** und **9**). Die Reduktion des Nitroderivats **10** führte zum Anthra-

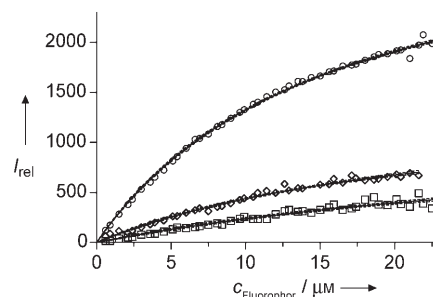


**Schema 2.** Synthese des fluoreszierenden Liganden **7**. a) Zn, AcOH, MeOH, 0  $\rightarrow$  20 °C, 5 h, quant.; b) HOPO(OBn)<sub>2</sub>, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, THF 20 °C, 63 %; c) H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 7 h, 20 °C, 98 %; d) Et<sub>3</sub>N, Cytidin-5'-monophosphomorpholidat-4-morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidin-Salz, 1*H*-Tetrazol, Pyridin, 20 °C, 48 h, dann DOWEX-Ionenaustauscher (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), 45 %. THF = Tetrahydrofuran, Bn = Benzyl, DIAD = Diisopropylazodicarboxylat.

nilat **11**, das über eine modifizierte Mitsunobu-Reaktion<sup>[13]</sup> zum Phosphotriester **12** phosphoryliert wurde. Entfernung der Benzylreste durch Hydrierung lieferte das freie Phosphat **13**. Das gewünschte Diphosphat wurde über eine durch 1*H*-Tetrazol katalysierte Moffatt-Kondensation von **13** mit Cytidin-5'-monophosphomorpholidat-4-morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidin-Salz erhalten.<sup>[14]</sup> Ionenaustauschchromatographie (DOWEX 50 WX8 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) ergab das Diammoniumsalz von **7**, das säulenchromatographisch an Cellulose gereinigt und vollständig charakterisiert wurde (siehe Hintergrundinformationen).

Fluoreszenz-Bindungstitrations wurden zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_d$  der Komplexe von IspF aus *Escherichia coli* mit den Liganden **7–9** durchgeführt.<sup>[15]</sup> Dabei führte die Zugabe des Enzyms zu hypsochromer Ver-

schiebung und Intensitätssteigerung der Fluoreszenzemission, was auf die Komplexierung der Fluoreszenzsonden in einer Umgebung reduzierter Polarität zurückgeführt werden kann. Die Affinitätsdaten zeigten sich stark von der in Lösung vorhandenen Zn<sup>II</sup>-Ionenkonzentration abhängig; deshalb wurde in den Bindungsstudien Zn(OAc)<sub>2</sub> in einer zur Sättigung des Enzyms ausreichenden Konzentration zugegeben. Typische Titrationskurven<sup>[15]</sup> sind in Abbildung 2 gezeigt. Die



**Abbildung 2.** Typische Fluoreszenztitrationskurven für IspF (*E. coli*) (6.25  $\mu\text{M}$ ) mit den Inhibitoren **7** ( $\square$ ), **8** ( $\diamond$ ) und **9** ( $\circ$ ) im Konzentrationsbereich 0–24  $\mu\text{M}$  unter Verwendung von 0.3- $\mu\text{M}$ -Aliquoten (nur 0.6- $\mu\text{M}$ -Schritte sind aus Gründen der Übersichtlichkeit gezeigt).<sup>[15]</sup>

Dissoziationskonstanten, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind, wurden mithilfe nichtlinearer Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt. Alle drei

**Tabelle 1:** Affinitäten der Liganden für *E. coli*-IspF, bestimmt über Fluoreszenz- (**7–9**) und <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopische Tests (**9**, CMP, CDP).

Verbindung	$K_d$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>[a]</sup>	$\text{IC}_{50}$ [mM] <sup>[b]</sup>
<b>7</b>	$36 \pm 5$	
<b>8</b>	$23 \pm 2$	
<b>9</b>	$15 \pm 0.3$	3.0
CMP		15.0
CDP		7.3

[a] Bei 25 °C; für Details siehe Lit. [15]. [b] Bei 37 °C; für Details siehe Lit. [16] und Hintergrundinformationen.

Hemmstoffe zeigen Bindungsaktivitäten im unteren mikromolaren Bereich. Parallel dazu wurden  $\text{IC}_{50}$ -Werte ( $\text{IC}_{50}$  = Konzentration des Inhibitors, bei der 50 % der maximalen Anfangsgeschwindigkeit gemessen wird) für **9**, CDP und CMP über Enzym-katalysierte Umsetzungen mit <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopischer Produktanalyse bestimmt (siehe Hintergrundinformationen).<sup>[16]</sup> Danach zeigt der Hemmstoff **9** einen niedrigeren  $\text{IC}_{50}$ -Wert (3.0 mM) als CDP (7.3 mM) und CMP (15.0 mM), was auf einen Gewinn an freier Bindungsenthalpie durch die Einführung des aromatischen Fluorophors in den synthetischen Liganden schließen lässt. Die durch die Ergebnisse der Fluoreszenzstudien nahe gelegte Beteiligung der fluoreszierenden aromatischen Reste an der Bindung an das Enzym aus *E. coli* konnte anschließend durch Röntgenkristallstrukturanalysen der Komplexe von IspF mit den Liganden **7** und **9** bestätigt werden.

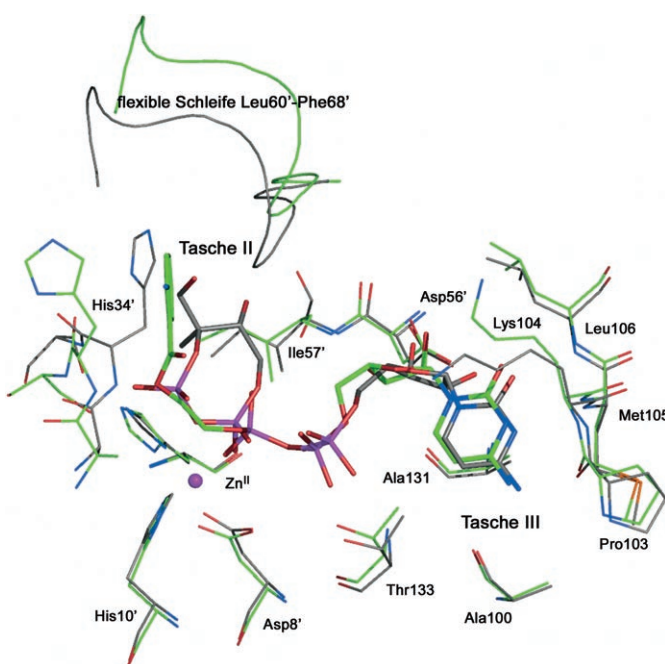
Die Strukturen der ternären Komplexe von **7** (Abbildung 1) und **9** (siehe Hintergrundinformationen) mit einem

tetraedrisch koordinierten  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Ion im aktiven Zentrum von IspF (*E. coli*) wurden bis zu einer Auflösung von 2.3 bzw. 2.5 Å bestimmt.<sup>[17]</sup> Der Komplex von **7** besteht aus sechs Untereinheiten (zwei Trimeren) in der asymmetrischen Elementarzelle, derjenige von **9** nur aus einer. Die Kristallstrukturen bestätigen, dass die Cytidinreste in beiden Komplexen erwartungsgemäß in Tasche III fest verankert sind. Dabei bildet die über Ala131 gestapelte Nucleobase vier hoch konservierte H-Brücken zum Peptidrückgrat von Ala100 bis Leu106 (Abbildung 1a und Hintergrundinformationen).<sup>[8,9]</sup> Der Riboseteil geht weitere H-Brücken ein, wobei die HO-Gruppen an C(2') und C(3') mit dem Carboxylatrest von Asp56' wechselwirken. Die katalytisch aktiven  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Ionen sind in beiden Strukturen tetraedrisch koordiniert, mit den Seitenketten von His10', His42' und Asp8' sowie dem  $\beta$ -Phosphat der Inhibitoren als Liganden. Die Strukturen bestätigen die vorhergesagte Bindung der Anthranilat- und Dansyl-Fluorophore in Tasche II.

Im ternären Komplex von IspF mit Ligand **7** und  $\text{Zn}^{\text{II}}$  liegen unterschiedliche Konformationen der sechs, willkürlich als A–F bezeichneten, unabhängigen aktiven Zentren vor. In den aktiven Zentren B–F sind die Orientierung des Liganden und dessen Wechselwirkungen mit dem Protein sehr ähnlich (siehe Hintergrundinformationen). Der CDP-Teil von **7** nimmt in allen sechs aktiven Zentren dieselbe Lage ein. Im aktiven Zentrum A findet man den Imidazolring von His34' in der „geschlossenen“ (in das aktive Zentrum hineinragende) Konformation, wohingegen die „offene“ (abgewandte) Konformation in den aktiven Zentren B–F vorliegt.<sup>[18]</sup> Die Tasche II in Struktur A ist beweglicher als in den restlichen fünf Strukturen, was sich in höheren thermischen Parametern widerspiegelt (siehe Hintergrundinformationen).

Abbildung 3 zeigt die Überlagerung der Kristallstruktur des ternären Komplexes IspF- $\text{Zn}^{\text{II}}$ -**7** (Konformere B–F) mit der vorher beschriebenen Struktur des quaternären Komplexes von IspF mit CMP, **6** und  $\text{Zn}^{\text{II}}$  (PDB-Eintrag 1JY8).<sup>[8a]</sup> In beiden Strukturen liegt His34' in der „offenen“ Konformation vor. Das Anthranilat überlagert sehr schön mit der hydrophoben Region des Cyclodiphosphats **6**. Die Schleife Leu60'–Phe68', die die hydrophobe Spalte in Tasche II bildet, zeigt dabei beträchtliche Flexibilität und nähert sich den Liganden in beiden Komplexen in stark unterschiedlichem Maße. Aus Strukturüberlagerungen geht interessanterweise hervor, dass diese flexible Schleife eine nahezu identische Orientierung in den Kristallstrukturen des ternären Komplexes IspF- $\text{Zn}^{\text{II}}$ -**7** und des quaternären Komplexes IspF- $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Mn<sup>II</sup>-CDP (PDB-Eintrag 1GX1) einnimmt.<sup>[8b]</sup> Im Unterschied dazu nimmt His34' im quaternären Komplex die „geschlossene“ Konformation ein, um mit dem  $\beta$ -Phosphatrest von CDP zu wechselwirken (siehe Hintergrundinformationen).

Die Kristalle des ternären Komplexes von IspF mit **9** und  $\text{Zn}^{\text{II}}$  enthalten ein einziges Monomer in der asymmetrischen Einheit. Wechselwirkungen in der „Cytidin-Tasche“ ähneln stark denjenigen im Komplex von **7** (siehe Hintergrundinformationen). Die Seitenkette von His34' liegt in der offenen Konformation vor. Eine Überlagerung der Kristallstrukturen der Komplexe von **7** und **9** (siehe Hintergrundinformationen) liefert weitere Belege für die große konformative Beweg-



**Abbildung 3.** Überlagerung der Kristallstrukturen des ternären Komplexes IspF- $\text{Zn}^{\text{II}}$ -**7** (Konformere B–F, C-Atome: hellgrün) mit der früher beschriebenen Struktur des quaternären Komplexes von IspF mit CMP, **6** und  $\text{Zn}^{\text{II}}$  (PDB-Eintrag 1JY8;<sup>[8a]</sup> C-Atome: grau). Farbkodierung: O rot, N blau, S orangerot, P lila, Zn lila.<sup>[17]</sup>

lichkeit der hydrophoben Spalte in Tasche II. Im Vergleich zum Komplex von **7** gehen die lipophilen Reste Ile56', Phe61', Phe68' und Leu76' im Komplex von **9** eine beträchtliche Umorientierung ein, um den größeren Dansylrest einzulagern und mit ihm hydrophobe Enzym-Ligand-Wechselwirkungen zu bilden. Die  $F_o - F_c$ -Differenzelektronendichteverteilung zeigt dabei nur eine schwache Elektronendichte für den Dansylring von **9**, wobei erhöhte thermische Parameter auf einen hohen Beweglichkeitsgrad schließen lassen (siehe Hintergrundinformationen).

Wir haben hier Synthese, biologische Aktivität und Co-kristallstrukturanalysen der ersten, strukturbasiert entworfenen Hemmstoffe von IspF beschrieben. Dabei ermöglichte die Einführung von Fluoreszenzsonden in die Liganden **7–9** die Quantifizierung ihrer Bindungsaffinität zu IspF mittels Fluoreszenz-Bindungstitrationen. Derzeit werden schnelle, ökonomische Bindungstests mithilfe dieser fluoreszierenden Hemmstoffe entwickelt. Der für **7** und **9** vorausgesagte Bindungsmodus wurde weitgehend durch Kristallstrukturanalysen bestätigt. Obschon die hydrophobe Region in Tasche II konformativ sehr beweglich ist, führt ihre Besetzung durch aromatische Ligandenteile zu einem messbaren Gewinn an freier Bindungsenthalpie. Somit wurden nützliche Erkenntnisse für die strukturbasierte Weiterentwicklung von Inhibitoren des „Nicht-Mevalonat-Wegs“ und letztlich von neuen Klassen von Wirkstoffen gegen Malaria und andere mikrobielle Erkrankungen gewonnen.

Eingegangen am 23. August 2005,  
veränderte Fassung am 3. November 2005  
Online veröffentlicht am 3. Januar 2006

**Stichwörter:** Fluoreszenz · Inhibitoren · IspF · Nicht-Mevalonat-Weg · Protein-Kristallstrukturanalyse

- [1] a) U. Weiss (Hrsg.), „Malaria“, in *Nature* **2002**, 415, 669–715; b) L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M.-A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, 418, 785–789; c) J. K. Baird, *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 1565–1577.
- [2] Fosmidomycin (OHC-N(OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) ist ein potenter Hemmstoff der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (IspC) im „Nicht-Mevalonat-Biosyntheseweg“. Für ausgewählte Veröffentlichungen siehe: a) J. Wiesner, R. Ortman, H. Jomaa, M. Schlitzer, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5432–5451; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5274–5293; b) T. Kuzuyama, T. Shimizu, S. Takahashi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7913–7916; c) M. A. Missinou, S. Borrmann, A. Schindler, S. Issifou, A. A. Adegnika, P.-B. Matsiegui, R. Binder, B. Lell, J. Wiesner, T. Baranek, H. Jomaa, P. G. Kremsner, *Lancet* **2002**, 360, 1941–1942; d) B. Lell, R. Ruangweera, J. Wiesner, M. A. Missinou, A. Schindler, T. Baranek, M. Hintz, D. Hutchinson, H. Jomaa, P. G. Kremsner, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 735–738.
- [3] H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, E. Beck, *Science* **1999**, 285, 1573–1576.
- [4] a) W. Eisenreich, M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M. H. Zenk, A. Bacher, *Chem. Biol.* **1998**, 5, R221–R233; b) M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.* **1993**, 295, 517–524.
- [5] a) M. K. Schwarz, Dissertation, ETH Zürich, Nr. 10951, **1994**; b) W. Eisenreich, B. Menhard, P. J. Hylands, M. H. Zenk, A. Bacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6431–6436; c) S. T. J. Broers, Dissertation, ETH Zürich, Nr. 10978, **1994**.
- [6] a) F. Rohdich, S. Hecht, A. Bacher, W. Eisenreich, *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, 2–3, 393–405; b) Y. Boucher, W. F. Doolittle, *Mol. Microbiol.* **2000**, 37, 703–716; c) F. Rohdich, J. Wungsintaweeikul, M. Fellermeier, S. Sanger, S. Herz, K. Kis, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11758–11763.
- [7] Für ausgewählte Veröffentlichungen siehe: a) F. Rohdich, W. Eisenreich, J. Wungsintaweeikul, S. Hecht, C. A. Schuhr, A. Bacher, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 3190–3197; b) S. B. Richard, J.-L. Ferrer, M. E. Bowman, A. M. Lillo, C. N. Tetzlaff, D. E. Cane, J. P. Noel, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 8667–8672; c) T. L. Campbell, E. D. Brown, *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 5609–5618.
- [8] a) S. Steinbacher, J. Kaiser, J. Wungsintaweeikul, S. Hecht, W. Eisenreich, S. Gerhardt, A. Bacher, F. Rohdich, *J. Mol. Biol.* **2002**, 316, 79–88; b) L. E. Kemp, C. S. Bond, W. N. Hunter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 6591–6596.
- [9] Veröffentlichte Kristallstrukturen von IspF: a) H. Kishida, T. Wada, S. Unzai, T. Kuzuyama, M. Takagi, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, J. R. H. Tame, S.-Y. Park, *Acta Crystallogr. D* **2003**, 59, 23–31; b) S. Ni, H. Robinson, G. C. Marsing, D. E. Bussiere, M. A. Kennedy, *Acta Crystallogr. D* **2004**, 60, 1949–1957; c) C. Lehmann, K. Lim, J. Toedt, W. Krajewski, A. Howard, E. Eisenstein, O. Herzberg, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2002**, 49, 135–138; d) L. E. Kemp, M. S. Alpey, C. S. Bond, M. A. J. Ferguson, S. Hecht, A. Bacher, W. Eisenreich, F. Rohdich, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. D* **2005**, 61, 45–52; e) T. Sgraja, L. E. Kemp, N. L. Ramsden, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. F* **2005**, 61, 625–629.
- [10] a) P. R. Gerber, K. Müller, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, 9, 251–268; b) Gerber Molecular Design (<http://www.moloc.ch>).
- [11] Für die strukturbasierte Entwicklung von Hemmstoffen von Plasmapsin II, einem weiteren möglichen Zielenzym für eine neue Antimalaria-Therapie, siehe: D. Carcache, S. Hörtnner, A. Bertogg, C. Bonkert, D. Bur, H. P. Märki, A. Dorn, F. Diederich, *ChemBioChem* **2002**, 3, 1137–1141.
- [12] a) Y.-H. Li, L.-M. Chan, L. Tyler, R. T. Moody, C. M. Himel, D. M. Hercules, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3118–3126; b) F. Diederich, K. Dick, D. Griebel, *Chem. Ber.* **1985**, 118, 3588–3619.
- [13] M. Saady, L. Lebeau, C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2239–2242.
- [14] V. Wittmann, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2144–2147.
- [15] a) Die fluoreszierenden Inhibitoren **7–9** wurden bei 20 °C in eine Lösung (2 mL) von IspF (17 kDa pro Untereinheit) aus *E. coli* (6.25 μM) in 50 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8.2, die 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 2 mM Zn(OAc)<sub>2</sub> enthält, bis zu einem Gesamtvolumen von 3 mL titriert [Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan]. Die Emission von **7** und **8** wurde bei λ<sub>exc</sub> = 320 nm, λ<sub>em</sub> = 423 nm und diejenige von **9** bei λ<sub>exc</sub> = 366 nm, λ<sub>em</sub> = 532 nm mithilfe eines Hitachi-F-2000-Fluoreszenzspektrophotometers (1 cm Quarzküvette, 3 mL Volumen) gemessen. K<sub>d</sub>-Werte wurden mithilfe von Gleichung (1) ermittelt, wobei I<sub>rel</sub> die relative Fluoreszenzintensität bei der gemessenen Emissionswellenlänge, I<sub>max</sub> die maximale Fluoreszenzerhöhung bei Sättigungsbindung des Inhibitors und F<sub>0</sub> die Konzentration des Fluorophors darstellen. Die Hintergrundemissionen von **7–9** (Konzentration: 0–24 μM) und IspF in 50 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8.2, in Gegenwart von 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 2 mM Zn(OAc)<sub>2</sub> wurden abgezogen, wodurch die in Abbildung 2 gezeigten Sättigungskurven erhalten wurden. Die relativen Fluoreszenzerhöhungen (I<sub>max</sub>–I)/I (I: maximale Fluoreszenz des freien Inhibitors) betrugen 20 % (**7**), 30 % (**8**) und 80 % (**9**). Die Bindungsdaten wurden mithilfe nichtlinearer Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt (GraphPad Prism 4 Computerprogramm, San Diego, CA, **2005**). Die angegebenen Fehlergrenzen sind Standardabweichungen mit R<sup>2</sup> für alle Kurvenanpassungen ≥ 0.96; b) R. S. Sarfati, V. K. Kansal, H. Munier, P. Glaser, A.-M. Gilles, E. Labruyère, M. Mock, A. Danchin, O. Bärzu, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18902–18906; c) W. O. McClure, G. M. Edelman, *Biochemistry* **1967**, 6, 559–566.
- [16] Die IC<sub>50</sub>-Werte für CMP, CDP und **9** wurden in durch IspF (*E. coli*) katalysierten Reaktionen mit [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-**5** (1 mM) als Substrat bestimmt. Die Produktbildung wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie verfolgt (siehe Hintergrundinformationen).
- [17] a) Kristalle von *E. coli*-IspF im Komplex mit den Liganden **7** und **9** wurden mithilfe der Gasphasendiffusionsmethode gezüchtet.<sup>[8b]</sup> Die Vorratslösungen der Liganden **7** und **9** bestanden aus 0.1 M Ammoniumsulfat und 0.1 M Natriumacetat, pH 5, sowie 10 % bzw. 8 % Polyethylenglycol-200-Monomethylether. Die hängenden Tropfen bestanden aus 1 μL Vorratslösung und 3 μL einer Lösung von IspF (5.5 mg mL<sup>-1</sup>) in 50 mM Tris-Hydrochlorid, pH 7.7, die 50 mM NaCl und 2 mM Ligand enthält. Die Kristalle des Komplexes von **7** fielen als monokline Plättchen in der Raumgruppe P2<sub>1</sub> mit den Elementarzellenabmessungen a = 54.03, b = 115.27, c = 87.61 Å, β = 90.18° an. Kristalle des Komplexes von **9** bestanden aus kubischen Blöcken in der Raumgruppe I2<sub>3</sub> mit a = 145.1 Å. Die Daten wurden mit der Strahlenquelle ID29 an der „European Synchrotron Radiation Facility“ (Grenoble, Frankreich) gemessen und mithilfe von MOSFLM (A. G. W. Leslie, H. R. Powell, G. Winter, O. Svensson, D. Spruce, S. McSweeney, D. Love, S. Kinder, E. Duke, C. Nave, *Acta Crystallogr. D* **2002**, 58, 1924–1928) aufgearbeitet. Der Datensatz für den Komplex von **7** ist 99.5 % komplett, bis zu einer Auflösung von 2.3 Å, mit einem R<sub>sym</sub>-Wert von 9.7 % und 27.1 % im Bereich höchster Auflösung. Der Datensatz für den Komplex von **9** ist 99 % komplett, bis zu einer Auflösung von

2.5 Å, mit einem  $R_{\text{sym}}$ -Wert von 8% und 68.5% im Bereich höchster Auflösung. Das Ausgangsmodell für beide Strukturermittlungen war die Kristallstruktur von *E. coli*-IspF im Komplex mit CDP (PDB-Eintrag 1GX1). Molekulare Substitutionsmethoden („Collaborative Computational Project Number 4“, *Acta Crystallogr. D* **1994**, *50*, 760–763; J. Navaza, *Acta Crystallogr. D* **2001**, *57*, 1367–1372), wurden zur Erzeugung von Ausgangsmodellen für weitere Verfeinerung verwendet; diese Modelle bestanden aus sechs Untereinheiten (zwei Trimeren) für den Komplex von **7** und einer einzigen Untereinheit für den Komplex von **9**. Die Strukturen wurden mithilfe einer Kombination von O (T. A. Jones, J. Y. Zou, S. W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta Crystallogr. A* **1991**, *47*, 110–119) und refmac5 (G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. D* **1997**, *53*, 240–255) bis zu einem  $R$ -Faktor von 24.3% und  $R$ -frei von 27.9% (Komplex von **7**), bzw. einem  $R$ -Faktor von 21.5% und  $R$ -frei von 25.9% (Komplex von **9**) verfeinert. Das Modell des Komplexes von **7** enthält 233 Wassermoleküle, sechs  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Ionen, eines in jedem aktiven Zentrum, und zwei Moleküle Geranyldiphosphat (GPP).<sup>[9d]</sup> Insgesamt befinden sich 92.1% der Aminosäuren in den am meisten bevorzugten Regionen der Ramachandran-Darstellung, wobei keine in die unerlaubten Regionen fällt. Das Modell des Komplexes von **9** enthält 56 Wassermoleküle, ein  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Ion und ein Geranyldiphosphat; 90.8% der Aminosäuren liegen in den am meisten bevorzugten Regionen der Ramachandran-Darstellung, keine in den unerlaubten Regionen. Für weitere Details siehe PDB-Einträge 2AMT und 2AO4. b) Es ist zu erwähnen, dass eine ganze Reihe von Kristallisationsbedingungen getestet wurde, um verwertbare Kristalle zu erhalten; dabei war unter den besten Bedingungen für die Komplexe beider Liganden kein  $\text{Mg}^{\text{II}}$ -Ion vorhanden. Kristalle mit anderen Liganden wurden in der Vergangenheit sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von  $\text{Mg}^{\text{II}}$ - oder  $\text{Mn}^{\text{II}}$ -Ionen gezüchtet; dabei wurden keine Strukturunterschiede beobachtet, die auf die Gegenwart oder Abwesenheit der zweiwertigen Kationen zurückzuführen wären (unveröffentlichte Ergebnisse).

- [18] a) Der Imidazolring von His34' in den aktiven Zentren B–F nimmt in unterschiedlichem Ausmaß die „offene“ (dem aktiven Zentrum abgewandte) Konformation ein. Abstände von der Anthranilat- $\text{NH}_2$ -Gruppe zum Imidazolring variieren von 3.8 bis 4.5 Å, was signifikante intermolekulare Wechselwirkungen ausschließt. Die „offene“ und die „geschlossene“ Konformation von His34' wurden bereits in zuvor beschriebenen Kristallstrukturen von IspF beobachtet.<sup>[8,9]</sup> b) Die unterschiedliche Struktur des aktiven Zentrums A kann nicht auf Kristallpackungseffekte zurückgeführt werden.