

# Saccharin hemmt Carboanhydrasen: eine mögliche Erklärung für seinen unangenehmen metallischen Nachgeschmack

Karen Köhler, Alexander Hillebrecht, Johannes Schulze Wischeler, Alessio Innocenti, Andreas Heine, Claudiu T. Supuran und Gerhard Klebe\*

Saccharin, der älteste künstliche Süßstoff, wurde durch einen glücklichen Zufall 1879 von Fahlberg und Remsen entdeckt.<sup>[1]</sup> Da es etwa 450-mal süßer als Kristallzucker ist, war dies eine wichtige Entdeckung, besonders für Diabetiker. Seine Vermarktung begann bereits kurz danach, und der Süßstoff gewann als kalorienfreier Zuckerersatz an Popularität, besonders im Gemisch mit Cyclamat. Er wird z.B. als „Sweet’n Low“ in großem Stil vertrieben. Neben seiner extremen Süßungskraft hat Saccharin aber auch einen bitteren, metallischen Nachgeschmack. Seit seinem Einsatz in der Lebensmittelindustrie gab es Bedenken im Hinblick auf seine Sicherheit: Vor allem in den 1960er und 1970er Jahren wurden Vermutungen über eine mögliche Cancerogenität von Saccharin laut. Bisher gibt es jedoch keinen eindeutigen Beweis für einen Zusammenhang zwischen Saccharinkonsum und gesundheitlichen Schäden.<sup>[2]</sup>

Saccharin wird als Natriumsalz eingesetzt. Chemisch gesehen handelt es sich um ein Sulfimid, das eine Lactameinheit und eine cyclische Sulfonamideinheit enthält. Die Sulfonamideinheit ist für den sauren Charakter des Moleküls verantwortlich und legt die Vermutung nahe, dass es eine Wechselwirkung mit dem Zinkion am Boden der Bindetasche von Carboanhydrasen eingehen könnte. Die Familie der Carboanhydrasen ist eine bedeutende Klasse weit verbreiterter Proteine, die in vielen Kompartimenten und Organen unseres Körpers vorkommen. Bislang sind 15 Isoenzyme der Carboanhydrase charakterisiert worden.<sup>[3]</sup> Sie alle katalysieren dieselbe Reaktion: die Fixierung von Kohlendioxid durch Wasser als Bicarbonat. Die verschiedenen Carboanhydrasen sind an vielen essenziellen Aufgaben beteiligt, z.B. am CO<sub>2</sub>-Transport, an der pH-Regulierung oder an der Bereitstellung von C<sub>1</sub>-Bausteinen für die Biosynthese.<sup>[4]</sup>

Wir haben das Inhibitionsprofil<sup>[5]</sup> von Saccharin gegen eine Reihe von Isoenzymen der Carboanhydrase bestimmt.

Überraschenderweise hemmt die Substanz einige Mitglieder dieser Protein Familie im nanomolaren Bereich (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Inhibierende Wirkung von AAZ, TPM, Furosemid, Hydrochlorothiazid und Saccharin gegen die Isoenzyme I–XIV (Stopped-Flow, CO<sub>2</sub>-Hydratisierungsmethode<sup>[5]</sup>).

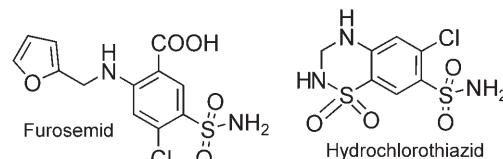
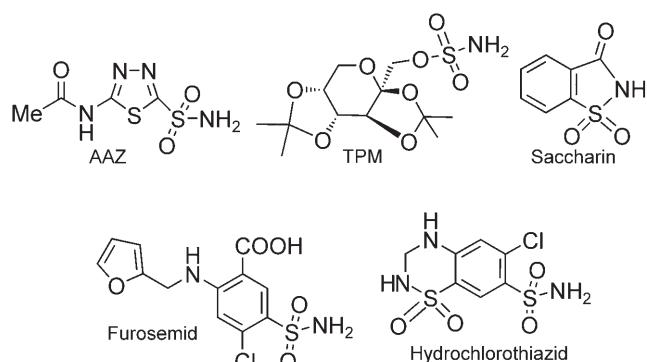
Isoenzym <sup>[a]</sup>	K <sub>i</sub> <sup>[b]</sup> [nM]				
	AAZ	TPM	Furosemid	Hydrochlorothiazid	Saccharin
hCA I <sup>[c]</sup>	250	250	62	328	18540
hCA II <sup>[c]</sup>	12	10	65	290	5950
hCA IV <sup>[c]</sup>	74	4900	564	427	7920
hCA Va <sup>[c]</sup>	63	63	499	4225	10060
hCA Vb <sup>[c]</sup>	54	30	322	603	7210
hCA VI <sup>[c]</sup>	11	45	245	3655	935
hCA VII <sup>[c]</sup>	2.5	0.9	513	5010	10
hCA IX <sup>[d]</sup>	25	58	420	367	103
hCA XII <sup>[d]</sup>	5.7	3.8	261	355	633
mCA XIII <sup>[c]</sup>	17	47	550	3885	12100
hCA XIV <sup>[c]</sup>	41	1460	52	4105	773

[a] h = humanes Isoenzym, m = murines Isoenzym. [b] Die Fehler liegen im Bereich von 5–10% der angegebenen Werte (von drei Messungen).

[c] Humanes (kloniertes) Isoenzym, durch CO<sub>2</sub>-Hydratisierungsmethode.

[d] Katalytische Domäne des humanen, klonierten Isoenzyms, durch CO<sub>2</sub>-Hydratisierungsmethode.<sup>[5]</sup>

Der Vergleich mit dem therapeutisch eingesetzten CA-Inhibitor Acetazolamid (AAZ) und anderen Sulfonamiden wie



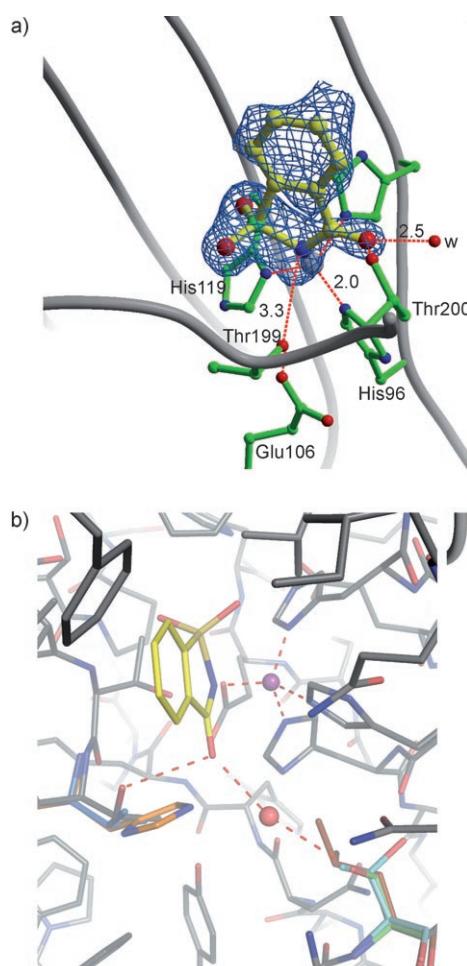
Furosemid, Hydrochlorothiazid oder Topiramat zeigt, dass Saccharin eine bemerkenswerte Selektivität gegen die verschiedenen Isoformen aufweist. Dies ist insoweit beeindruckend, als alle CAs weitgehend konservierte Bindetaschen haben, und erschwert die Entwicklung von Verbindungen mit zufriedenstellenden Selektivitätsprofilen deutlich. Die ubiquitäre CA II wird durch Saccharin im unteren mikromolaren

[\*] K. Köhler, A. Hillebrecht, J. Schulze Wischeler, Dr. A. Heine, Prof. Dr. G. Klebe  
Institut für Pharmazeutische Chemie  
Philipps-Universität Marburg  
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6421-282-8994  
E-Mail: klebe@mail.uni-marburg.de

A. Innocenti, Prof. Dr. C. T. Supuran  
Università degli Studi di Firenze  
Dipartimento di Chimica  
Laboratorio di Chimica Bioinorganica  
Via della Lastruccia, 3, 50019 Sesto Fiorentino (Italien)

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

Bereich gehemmt. Dies veranlasste uns, die Kristallstruktur von Saccharin im Komplex mit CA II zu bestimmen (Abbildung 1 und Hintergrundinformationen).<sup>[6]</sup>



**Abbildung 1.** a) Bindetasche der Carboanhydrase II (katalytische Aminosäurereste in Grün) mit gebundenem Saccharin [gelb, Differenzelektronendichte (blau), konturiert bei  $3\sigma$ ]. Das aufgenommene Wassermolekül ist rechts als rote Kugel dargestellt. b) Die Kristallstruktur aus (a) [Aminosäuren des Proteins (grau), Saccharin (gelb), Wassermolekül (rötliche Kugel), Zink (violett)], überlagert mit den mutierten Resten in den anderen Isoformen: His200 (orange, CAI), Val200 (blau, mCAXIII), Ser65 (dunkelgrün, CAVII), Leu65 (braun, CAVa) und Thr65 (cyan, CAXIV).

Saccharin koordiniert höchstwahrscheinlich in deprotonierter Form über sein Stickstoffatom an das katalytische Zinkion, sodass eine abgeflachte, verzerrte tetraedrische Koordinationsumgebung am Metallzentrum entsteht. Das Stickstoffatom selbst ist pyramidal umgeben, und in der angenommenen Richtung des freien Elektronenpaares liegt das Sauerstoffatom Oy der Seitenkette von Thr199. Der Abstand von 3.3 Å spricht für die Bildung einer schwachen Wasserstoffbrücke, allerdings befindet sich dieses Sauerstoffatom auch in einem günstigen Abstand für die Bildung einer Wasserstoffbrücke zu einem Sauerstoffatom von Glu106 (2.5 Å). Ein Sauerstoffatom der benachbarten Sulfonylgruppe erweitert die Koordination am Zinkzentrum zu einer

verzerrten Bipyramide (3.1 Å), während das zweite Sauerstoffatom eine schwache Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe der Hauptkette von Thr199 bildet. Das Carbonylsauerstoffatom der Lactameinheit befindet sich in Wasserstoffbrückenabstand zu Thr200-Oy. Ferner bildet es eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül des aktiven Zentrums.

Eine weitere Besonderheit dieser Kristallstruktur ist der Einbau eines mutmaßlichen zweiten Zinkions in die Bindetasche. His64, das den Transport von Protonen in das katalytische Zentrum hinein und aus diesem hinaus vermittelt, liegt in zwei Konformationen vor. Das erste Konformer ist von einem starken Elektronendichtemaximum überlagert, das als zweites, partiell besetztes Zinkion (67 %) verfeinert werden konnte. Dieses wird von His64-Nδ in der zweiten Konformation, von der NH-Gruppe der Hauptkette derselben Aminosäure und von der Carbonylgruppe der Hauptkette von Asn62 koordiniert. Zwei Wassermoleküle vervollständigen die Koordinationsphäre dieses zweiten Zinkions. Zinkionen kommen fast überall in mikromolaren Konzentrationen vor, weshalb sie aus der Pufferlösung aufgenommen und in die Struktur eingebaut worden sein können.

Auf der Basis dieser Kristallstruktur lässt sich nun über die Ursache der beeindruckenden Selektivität von Saccharin gegen die Isoenzyme spekulieren (ein Sequenz-Alignment ist den Hintergrundinformationen beigelegt). Fast alle klinisch zugelassenen CA-Inhibitoren weisen eine terminale, exocyclische Sulfonamid-, Sulfamat- oder Sulffimideinheit auf.<sup>[7]</sup> Im Unterschied dazu hat Saccharin eine cyclische Struktur, und die Lactam-Carbonylgruppe in einem heterocyclischen Fünfring ist eine strukturelle Besonderheit, die in keinem der Grundgerüste der üblichen CA-Inhibitoren vorkommt. Saccharin ist nur ein mäßig starker Inhibitor der CA II, während es die CAVII im nanomolaren Bereich hemmt.

Da keine Kristallstruktur dieser Isoform verfügbar ist, wurde ein Homologiemodell vom Swiss-Model Repository<sup>[8]</sup> verwendet. Es fällt auf, dass in Nachbarschaft zur Carbonylgruppe des Lactams ein Alanin durch ein Serin ersetzt ist (Abbildung 1b). In der Kristallstruktur des Komplexes von Saccharin mit CA II ist ein Wassermoleköl so platziert, dass es optimal eine Brücke zwischen der Carbonylgruppe des Lactams und dem Serin-Oy in der modellierten Struktur von CAVII bilden kann; dieser zusätzliche Kontakt verstärkt wahrscheinlich die Ligandbindung. In einer kürzlich an Aldose-Reduktase durchgeföhrten Studie konnten wir nachweisen, dass ein Inhibitor, der ein kontaktvermittelndes Wassermoleköl aufnimmt, einen deutlichen Affinitätsgewinn gegenüber einem nahe verwandten Liganden, der keinen entsprechenden wasservermittelten Kontakt hat, erzielen kann.<sup>[9]</sup>

Aus einem Sequenz-Alignment ist ersichtlich, dass dieser Ala/Ser-Austausch auch für CAI, CAIV, CAVb, CAIX, CAXII und murine CAXIII gegeben ist. CAIX und CAXII zeigen ebenfalls eine stärkere Bindung von Saccharin, während bei CAI und CAXIII eine deutliche Affinitätsabnahme zu beobachten ist. Bei den beiden letztgenannten Isoformen ist Thr200 durch His oder Val ersetzt. Beide benötigen erheblich mehr Platz in der Nähe der Lactam-Carbonylgruppe. Daher ist zu erwarten, dass sie in sterischen Konflikt mit dem gebundenen Saccharin geraten, womit eine starke Affini-

tätsabnahme erklärbar wird. Für CAVa wurde ebenfalls nur eine schwache Hemmung gemessen. In diesem Enzym ist Ala nicht durch Ser, sondern durch ein räumlich anspruchsvolles Leu ersetzt. Außerdem ist diese Aminosäure nicht in der Lage, den wasservermittelten Kontakt zu bilden. Ebenso wie ein Ala reduziert auch ein Leu in dieser Position die Bindungsaffinität von Saccharin. CAVI und CA XIV werden von Saccharin deutlich gehemmt. Interessanterweise enthalten sie ein Thr anstelle von Ala65. Auch dieser Rest sollte gut geeignet sein, einen wasservermittelten Kontakt zum Liganden aufzubauen.

Es stellt sich die Frage, ob die in vitro beobachtete Hemmung einiger CA-Isoformen pharmakologisch relevant ist, z.B. in Bezug auf erwünschte oder unerwünschte Kreuzreaktivitäten oder Nebenwirkungen. Saccharin soll nur die Süß-Rezeptoren der Zunge stimulieren. Darüber hinaus sollte es als idealer Süßstoff den Magen-Darm-Trakt ohne weitere unerwünschte Absorption in den Blutkreislauf und ohne Transport über die Blut-Hirn-Schranke passieren. CAVII, die am stärksten inhibierte Isoform, ist im Gehirn lokalisiert. In Anbetracht des sauren Charakters von Saccharin ist es unwahrscheinlich, dass es durch passiven Transport in signifikanten Konzentrationen ins Gehirn gelangt. Nur unter den sauren Bedingungen des Magens liegt eine nennenswerte Menge an Saccharin im ungeladenen, hydrophoben Zustand vor. In diesem Zustand wäre eine passive Penetration möglich, allerdings ist eine Absorption bei pH 6–8 relativ unwahrscheinlich. Dennoch wurde nachgewiesen, dass Saccharin nahezu vollständig über den Darm aufgenommen und rasch unverändert über den Urin ausgeschieden wird.<sup>[10]</sup> In Ratten wurde eine Verteilung von Saccharin über die meisten Organe beschrieben; es wird angenommen, dass dies über einen aktiven Transportmechanismus geschieht.<sup>[10]</sup> Offenbar ist die Substanz chemisch relativ inert und wird in vivo kaum metabolisiert. Die Abnahme der Plasmaspiegel nach oraler Gabe erfolgt langsam und wird durch die Geschwindigkeit der Absorption aus dem Darm begrenzt.<sup>[11]</sup>

Es kann nur spekuliert werden, inwieweit diese Beobachtung auf eine Hemmung von CAs in unterschiedlichen Kompartimenten des Organismus zurückzuführen ist. Vor kurzem wurde die Beteiligung von CAVI, der einzigen sezernierten CA, an der Geruchs- und Geschmackswahrnehmung sowie an der pH-Regulation des Mundraumes diskutiert.<sup>[12]</sup> Sie trägt zur Ansäuerung des Zahnschmelzes bei, weshalb über eine mögliche Bedeutung für die Kariesprophylaxe gemutmaßt wird.<sup>[13,14]</sup> Wie auch andere klinisch

eingesetzte Carboanhydrase-Inhibitoren hat Saccharin einen unangenehmen bitteren oder metallischen Nachgeschmack.<sup>[15]</sup> Dieser könnte von einer Inhibition der im Speichel vorkommenden CAVI herrühren, die ebenfalls von Saccharin im submikromolaren Bereich gehemmt wird. Angesichts der Tatsache, dass CAs immer wieder als mögliche Targets einer Pharmakotherapie zur Diurese, von Glaukom, Tumoren oder Adipositas diskutiert werden, könnte Saccharin als Beispiel dienen, wie Moleküle verändert werden könnten, um ihnen ausreichende Selektivität zu verleihen.

Eingegangen am 17. März 2007,  
veränderte Fassung am 5. Juni 2007  
Online veröffentlicht am 17. August 2007

**Stichwörter:** Carboanhydrasen · Homologiemodelle · Isoformen · Saccharin · Strukturaufklärung

- [1] C. Fahlberg, I. Remsen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. A* **1879**, 12, 469.
- [2] M. R. Weihrauch, V. Diehl, *Ann. Oncol.* **2004**, 15, 1460.
- [3] C. T. Supuran, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, 7, 825–833.
- [4] C. T. Supuran, A. Scozzafava, A. Casini, *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 146.
- [5] R. G. Khalifah, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 2561.
- [6] Details der Röntgenkristallstrukturbestimmung finden sich in den Hintergrundinformationen, in denen alle Daten in Tabelle 1 aufgelistet sind. Ein Datensatz, der mit einer Auflösung von 1.7 Å aufgenommen wurde, wurde zu  $R = 0.147$ ,  $R_{\text{free}} = 0.216$  verfeinert und in der PDB hinterlegt (PDB-Code: 2Q1B). Ein zweiter Datensatz mit einer Auflösung von 1.95 Å und  $R = 0.182$ ,  $R_{\text{free}} = 0.260$  wurde ebenfalls verfeinert und in der PDB hinterlegt (PDB -Code: 2Q38), da er eine leicht verbesserte Dichte für den Saccharinligand aufweist, wahrscheinlich infolge einer etwas höheren Besetzung. In beiden Strukturen ist Saccharin in nahezu identischer Position gebunden.
- [7] F. Abbate, C. T. Supuran, A. Scozzafava, P. Orioli, M. T. Stubbs, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3583.
- [8] <http://swissmodel.expasy.org/repository>.
- [9] H. Steuber, A. Heine, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, 368, 618.
- [10] A. G. Renwick, *Fd. Chem. Toxic.* **1985**, 23, 429.
- [11] A. G. Renwick, T. W. Sweatman, *J. Pharm. Pharmacol.* **1979**, 31, 650.
- [12] C. E. Smith, A. Nanci, P. Moffatt, *Eur. J. Oral Sci.* **2006**, 114 Suppl 1, 147.
- [13] I. Nishimori, T. Minakuchi, S. Onishi, D. Vullo, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 381.
- [14] M. Kimoto, M. Kishino, Y. Yura, Y. Ogawa, *Arch. Oral Biol.* **2006**, 51, 117.
- [15] C. T. Supuran, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2000**, 10, 575.