

Regulation der Aktivität von humaner Carboanhydrase I (hCAI) durch einen photochromen Inhibitor**

Daniel Vomasta, Christina Högner, Neil R. Branda* und Burkhard König*

Für alle Organismen ist die Regulation der Enzymaktivität ein äußerst wichtiger Prozess im Metabolismus. In der Natur werden Enzyme üblicherweise durch allosterische Effektoren^[1] oder durch kovalente Veränderung des Enzyms (z. B. durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung)^[2] geregelt. Erste Versuche zur künstlichen Regulation der Enzymaktivität basierten auf chemischer Veränderung der Enzymstruktur.^[3–6] Diese Art der Regulation ist jedoch nicht reversibel. Licht als Stimulus ermöglicht eine einfache Kontrolle, und durch photochrome Verbindungen kann Reversibilität erreicht werden, was für praktische Anwendungen wichtig ist. Um diese Vorteile zu nutzen, werden beispielsweise Enzyminhibitoren verwendet, die auf Azobenzol^[7] basieren, oder Thiophenfulgiderivate kovalent an Enzyme geknüpft.^[8] Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Enzymaktivität ist die photoinduzierte Veränderung der Enzymumgebung. Dies kann z. B. durch photoinduzierte Änderung der Permeabilität eines Polymers für ein Substrat erreicht werden. Das Enzym wird dabei vom photoaktiven Polymer umschlossen.^[8] Auch kann die Konformation einer Enzymdomäne durch ein photoaktives Tensid reguliert werden,^[9] oder Eigenschaften des Mediums (z. B. pH-Wert, Viskosität) um das Enzym können durch Licht verändert werden.^[10]

Die Kontrolle der Aktivität der Carboanhydrase ist von besonderem Interesse, da diese ein wichtiges Enzym für den zellulären Transport und andere metabolische Prozesse ist. Die Carboanhydrase findet sich in fast jedem Gewebe und Zelltyp, in vielen subzellulären Organellen und kommt in vielen Organismen von einzelligen Blaualgen bis hin zu Säugetieren vor.^[11] Kürzlich gelang es, mit einer Azobenzolmarkierung die Aktivität der Carboanhydrase durch Licht ca. um den Faktor 2 zu modulieren.^[12] Der Einsatz von Azobenzolderivaten ist eine elegante Lösung zur Regulation der Enzymaktivität, aber die thermische Reversibilität dieser

Verbindungen schränkt ihren praktischen Nutzen deutlich ein. Verbindungen, die aus dem Grundgerüst 1,2-Dithienylethen (DTE) bestehen, könnten hier Vorteile gegenüber vielen anderen photochromen Strukturen bieten, da ihre photoinduzierten Ringschluss- und Ringöffnungsreaktionen thermisch irreversibel sind (als Beispiel siehe **1a** ⇌ **1b** in Schema 1; **a**: offene Form, **b**: geschlossene Form).^[13]

Wir beschreiben hier die reversible Regulation der Carboanhydraseaktivität durch ein DTE-Derivat. Dabei wird der DTE-Grundkörper mit einer Sulfonamid- sowie einer Kupfer(II)-iminodiessigsäuregruppe, {Cu(ida)}, verknüpft. Diese zwei Einheiten wurden nach einer Publikation von Mallik et al. ausgewählt, die kürzlich berichteten, dass die Inhibitorstärke des schwachen Enzyminhibitors Sulfanilamid (4-Aminobenzolsulfonamid, **4**) durch kovalente Verknüpfung mit {Cu(ida)} zunimmt.^[14]

Während die Sulfonamideinheit in **1a** als der eigentliche Enzyminhibitor fungiert, koordiniert die {Cu(ida)}-Einheit reversibel an die Imidazoleseitenketten der Histidinreste auf der Proteinoberfläche nahe des aktiven Zn^{II}-Zentrums. Dadurch werden die Bindung des Sulfonamidrestes an das katalytische Zentrum und die Inhibitorwirkung verstärkt. Die Stärke eines divalenten Enzyminhibitors hängt direkt vom Abstand und der relativen Orientierung der beiden Einheiten (in diesem Fall {Cu(ida)} und Sulfonamid) zueinander ab; zudem kann der DTE-Grundkörper zwischen einem flexiblen Isomer mit offenem Ring (**1a**) und einem starren Isomer mit geschlossenem Ring (**1b**) hin- und hergeschaltet werden.^[15] Daher haben wir Verbindung **1** konstruiert, um die Enzymaktivität reversibel mit Licht zu regulieren, ohne dass dabei chemische Veränderungen am Enzym vorgenommen werden müssen oder dessen natürliche Umgebung verändert wird. Die Synthese von **1a**^[16] beginnt mit der schrittweisen Verknüpfung des Säurechlorids des Cyclopentenderivats **2**^[17] mit dem Diester **3** und Sulfanilamid (**4**; Schema 1). Die saure Abspaltung der beiden *tert*-Butylschutzgruppen und anschließende Komplexierung mit CuCl₂ im basischen Milieu liefern **1a** in guter Ausbeute.

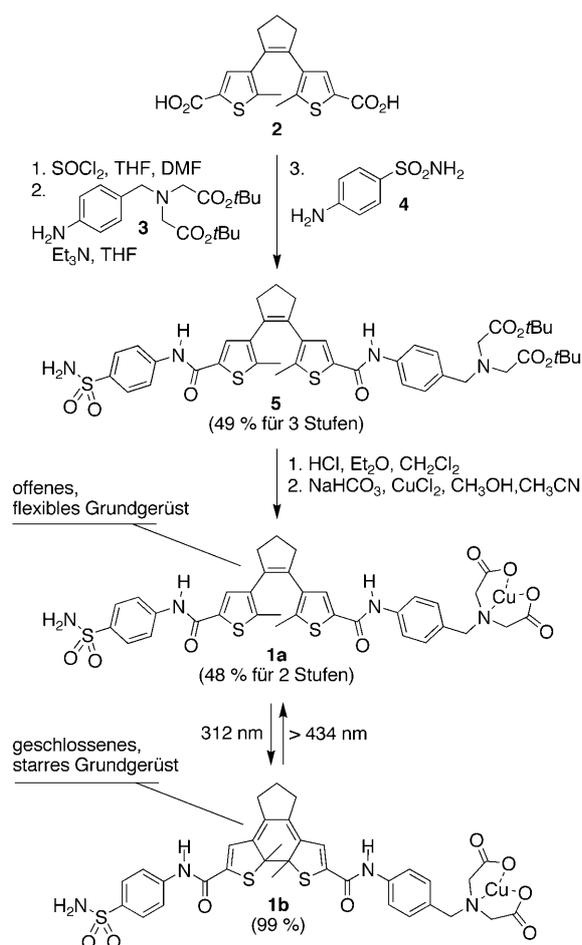
Die Bestrahlung einer wässrigen Lösung von **1a** (5% DMSO; Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)-Sulfat-Puffer, 20 mM, pH 8.3 bei 25 °C) mit Licht der Wellenlänge 312 nm^[18] führt zu einer sofortigen Änderung des UV/Vis-Absorptionsspektrums, die charakteristisch für DTE-Derivate ist: Die Intensität der Bande im kurzwelligen Bereich ($\lambda_{\text{max}} = 290$ nm) nimmt ab, und jene der Absorptionsbande im Sichtbaren ($\lambda_{\text{max}} = 545$ nm) nimmt zu; außerdem entsteht eine schwächere Absorptionsbande bei $\lambda_{\text{max}} \approx 360$ nm (Abbildung 1). Diese Änderungen, die die Umwandlung in das Isomer **1b** mit geschlossenem Ring anzeigen (wobei die Farbe der Lösung von Farblos nach Violett umschlägt), sind nach

[*] Prof. N. R. Branda
4D LABS at Simon Fraser University
8888 University Drive, Burnaby, BC V5A 1S6 (Kanada)
E-Mail: nbranda@sfu.ca

D. Vomasta, C. Högner, Prof. B. König
Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-1717
E-Mail: burkhard.koenig@chemie.uni-regensburg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der chemischen Industrie, der Universität Regensburg, dem Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, dem Canada Research Chair Program und der Simon Fraser University unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802242> zu finden.



Scheme 1. Synthese und reversibler photochemischer Ringschluss des DTE-Inhibitors **1a**.

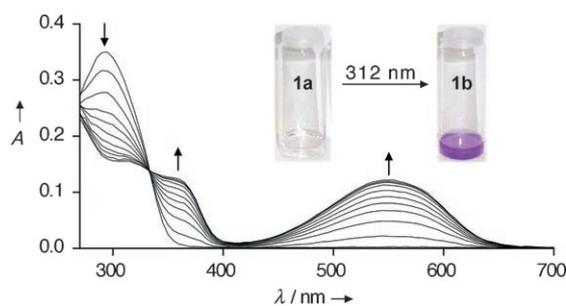
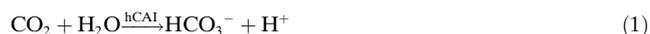


Abbildung 1. Veränderung der UV/Vis-Absorption einer wässrigen Lösung von **1a** (1.08×10^{-5} M) in DMSO (5% v/v) und Tris-Sulfat-Puffer (20 mM, pH 8.3) nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 312 nm. Bestrahlungszeiten sind 0, 3, 5, 8, 10, 14, 17, 20 und 34 s. Gezeigt ist auch der Farbumschlag von Farblos nach Violett, der durch Bildung der geschlossenen Form von **1** hervorgerufen wird.

einer Bestrahlungsdauer von 34 s (bei einer Konzentration von 1.08×10^{-5} M) beendet. Mit HPLC wurde nachgewiesen, dass im photostationären Zustand mindestens 99% geschlossenes Isomer vorliegen. Der effiziente Umsatz durch Bestrahlung belegt die Praktikabilität des Dithienylethenrückgrats als photochromer Grundkörper, aus dem nützliche

Moleküle für Anwendungen aufgebaut werden können. Eine geringere Menge an **1b** in der bestrahlten Mischung würde zu einem viel geringeren Unterschied in der Enzyminhibition führen. **1b** ist in Lösung bei Raumtemperatur äußerst stabil (mindestens sechs Monate), solange es im Dunkeln aufbewahrt wird. Wird die farbige Lösung mit sichtbarem Licht ($\lambda > 420$ nm) bestrahlt, reagiert das geschlossene Isomer zurück zu **1a**, und die Lösung zeigt wieder das ursprüngliche Absorptionsspektrum. Diese Ringschluss-/Ringöffnungszyklen können mindestens siebenmal wiederholt werden, ohne dass Zersetzung auftritt.^[16]

Die von der humanen Carboanhydrase I (hCAI) katalysierte Reaktion von Kohlendioxid mit Wasser [Gl. (1)] ist ein



geeignetes System, um die Inhibition des photochromen DTE-Derivats in der offenen (**1a**) sowie in der geschlossenen Form (**1b**) zu untersuchen.^[16] Der bekannte Inhibitor Sulfanilamid (**4**)^[19] und die photoaktiven Verbindungen **6–8** sind geeignete Kontrollverbindungen. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 2 und Tabelle 1 zusammengestellt.

Sulfanilamid (**4**) zeigt einen IC_{50} -Wert von $0.46 \mu\text{M}$, der dem Literaturwert entspricht.^[20] **1b** bewirkt eine ähnliche Inhibition ($\text{IC}_{50} = 0.4 \mu\text{M}$) wie Sulfanilamid. Die ähnliche

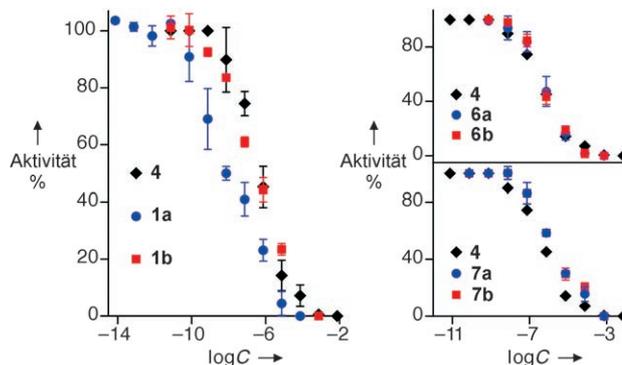
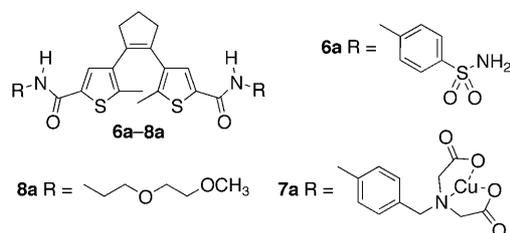


Abbildung 2. Änderung der Aktivität von hCAI in Prozent bei zunehmender Konzentration C von **1**, **4**, **6** und **7** in jeweils offener und geschlossener Form.^[16] Die Daten wurden durch einen Enzymassay erhalten, bei dem die Reaktion von Kohlendioxid mit Wasser zu Hydrogencarbonat untersucht wurde [Gl. (1)].^[22]



Stärke der Inhibition durch **4** und **1b** deutet darauf hin, dass in **1b** nur die Sulfonamideinheit mit dem aktiven Zentrum wechselwirkt. Dies ist höchstwahrscheinlich eine Folge des planaren und starren Rückgrats von **1b**, das eine simultane

Tabelle 1: IC_{50} -Werte und K_i -Bindungsaffinitäten von **1**, **4**, **6–8** in offener und geschlossener Form.

| Inhibitor | IC_{50} [μM] | | K_i [μM] ^[a] | |
|-----------|-----------------------|------------------|----------------------------------|------------------|
| | offen | geschlossen | offen | geschlossen |
| 4 | | 0.46 ± 0.01 | | 0.29 ± 0.007 |
| 1 | 0.008 ± 0.0003 | 0.40 ± 0.005 | 0.005 ± 0.0002 | 0.30 ± 0.003 |
| 6 | 0.53 ± 0.007 | 0.57 ± 0.01 | 0.34 ± 0.005 | 0.35 ± 0.008 |
| 7 | 1.55 ± 0.8 | 1.46 ± 0.15 | 1.16 ± 0.05 | 1.00 ± 0.01 |
| 8 | – | – | – | – |

[a] Die K_i -Werte wurden mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung erhalten.^[16]

Bindung von {Cu(ida)} und Sulfonamid unterbindet. Wir werden darauf noch genauer eingehen.

Die Inhibition durch **1a** ist um zwei Zehnerpotenzen stärker ($IC_{50} = 8$ nM) als die durch **4** und **1b**. Dies kann der höheren Flexibilität von **1a** zugeschrieben werden, das beiden Bindungseinheiten eine gleichzeitige Koordination an das Enzym ermöglicht und somit eine höhere Bindungsaffinität hat. Das photochrome Bis(sulfonamid) **6** wirkt ähnlich inhibierend wie **4**, und es konnte kein Unterschied zwischen offener ($IC_{50} = 0.53$ μM) und geschlossener Form ($IC_{50} = 0.57$ μM) festgestellt werden.^[21] Bei der Bis(iminodiessigsäure) **7** ist der IC_{50} -Wert niedriger als bei **4**, und erneut war kein Unterschied zwischen offener ($IC_{50} = 1.55$ μM) und geschlossener Form ($IC_{50} = 1.46$ μM) messbar. Das Bis(ethylenglycol) **8** wurde hergestellt, um das Inhibitionsverhalten des Dithienylethengrundgerüsts zu bestimmen. Diese Verbindung hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, was bedeutet, dass alle Veränderungen der Enzymaktivität dem Zusammenspiel von Sulfonamid und {Cu(ida)} sowie deren relativer Orientierung zueinander zugeschrieben werden können. Die Bindungsaffinitäten (K_i) aller Verbindungen zeigen ähnliche Tendenzen (Tabelle 1). Die Ausnahme bildet die offene Form **1a**, die viel stärker an das Enzym bindet ($K_i = 0.005$ μM für **1a** gegenüber 0.29 – 1.16 μM für **1b**, **4**, **6a,b** und **7a,b**). Der reversible Schaltprozess aus DTE-Ringöffnung und -Ringchluss zwischen **1a** und **1b** ist auch in Gegenwart des Enzyms möglich.^[16]

Die Unterschiede in der Inhibitorstärke und den Bindungsaffinitäten der beiden Photoisomere von **1** erklären wir mit ihrer unterschiedlichen Flexibilität. Die flexible, offene Form **1a** ermöglicht gleichzeitiges Binden von Sulfonamid und {Cu(ida)} an die Enzymoberfläche. Dies ist nur möglich, wenn eine freie Drehbarkeit um die C-C-Einfachbindung, die die zwei Thiophenheterocyclen mit dem zentralen Cyclopentenring verknüpft, gewährleistet ist. Somit kann der Inhibitor nur in der offenen Form eine Konformation annehmen, die eine divalente Bindung an das Enzym ermöglicht. Die Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms (mit Sulfonamid und {Cu(ida)}; Abbildung 3) erfordert klar ersichtlich eine Anpassung des Inhibitors. Der nötige Abstand der beiden Bindungseinheiten zueinander (ca. 10 Å) und ihre relative Ausrichtung können nur in **1a** realisiert werden.

Da sich der Abstand zwischen Sulfonamid und {Cu(ida)} durch die Umwandlung der antiparallelen Konformation von **1a** zur geschlossenen Form nicht ändert (Abbildung 3) und dieser Abstand für eine bidentale Bindung zu groß ist, bindet sehr wahrscheinlich die parallele Konformation von **1a** bi-

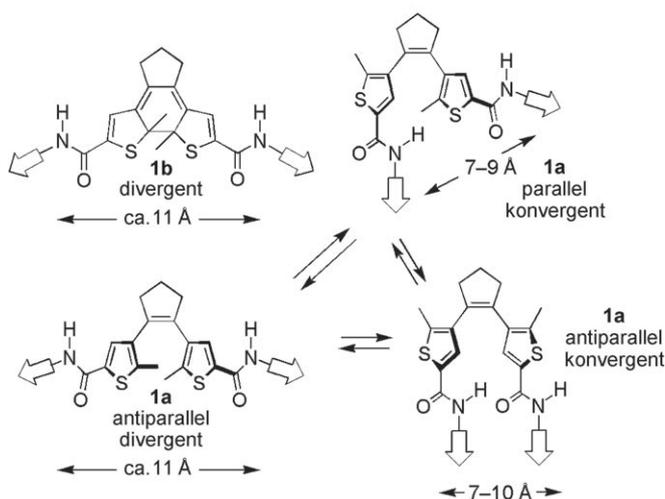
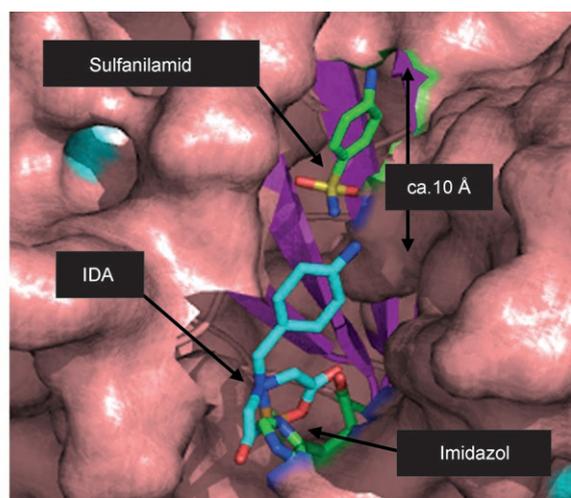


Abbildung 3. Aktives Zentrum von hCAI mit Sulfanilamid, einer IDA- und einer der an der Oberfläche zugänglichen Imidazolgruppen (oben); grün/türkis C, blau N, rot O, gelb S, orange Cu. Der erforderliche Abstand und die relative Orientierung der Sulfanilamid- und IDA-Gruppe können nur durch **1a** erreicht werden, das eine parallele Konformation einnehmen kann (unten). Die Struktur des Enzyms mit Sulfanilamid im aktiven Zentrum wurde röntgenkristallographisch erhalten und mit dem Programm PYMOL von Graph Pad^[23] bearbeitet. Der für eine hohe Bindungsaffinität erforderliche Abstand im Inhibitor war durch die Ergebnisse von Mallik^[14] bereits bekannt.

dental an das Enzym. Der planare, starre Grundkörper im Isomer **1b** mit geschlossenem Ring positioniert die zwei Bindungseinheiten weit voneinander entfernt, sodass eine gleichzeitige Wechselwirkung mit dem Enzym unterbunden wird. Dies verringert die Stärke der Bindung und der Inhibition.

Wir konnten zeigen, dass die Enzymaktivität reversibel durch einen photochromen divalenten Inhibitor beeinflusst werden kann. Dies gelingt durch Hin- und Herschalten des DTE-Photoschalters zwischen seiner offenen und geschlossenen Form. Seine thermische Stabilität, eine fast quantitative Bildung der Photoisomere sowie seine Aktivierung mit sichtbarem Licht machen ihn zu einem nützlichen Hilfsmittel für die reversible Regulierung der Enzymaktivität durch

Licht. Sichtbares Licht zur Inhibitoraktivierung ermöglicht eine größere Eindringtiefe in Zellgewebe; zudem wird eine Verletzung durch hochenergetisches UV-Licht verhindert.

Eingegangen am 13. Mai 2008

Online veröffentlicht am 2. September 2008

Stichwörter: Carboanhydrasen · Enzymkatalyse · Inhibitoren · Molekulare Schalter · Photochromie

-
- [1] E. R. Stadtman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1966**, *28*, 41–154.
- [2] A. H. Corbett, R. F. DeVore, N. Osheroff, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20513–20518.
- [3] J. Ybarra, A. R. Prasad, J. S. Nishimura, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7174–7178.
- [4] I. M. Pavlenko, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2005**, *31*, 535–542.
- [5] T. Oda, M. Tokushige, *J. Biochem.* **1988**, *104*, 178–183.
- [6] A. Sadana, J. P. Henley, *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28*, 256–268.
- [7] D. Fujita, M. Murai, T. Nishioka, H. Miyoshi, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6581–6586.
- [8] S. Rubin, I. Willner, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1994**, *246*, 201. Übersicht zur Regulierung der Struktur und Funktion von Biomolekülen durch Licht: I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 419–439; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 367–385.
- [9] S.-C. Wang, C. T. Lee, Jr., *Biochemistry* **2007**, *46*, 14557–14566.
- [10] S. D. Varfolomeyev, N. F. Kazanskaya, N. L. Ereemeev, *BioSystems* **1996**, *39*, 35–42.
- [11] R. P. Henry, *Annu. Rev. Physiol.* **1996**, *58*, 523–538.
- [12] H. Harvey Jessica, D. Trauner, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 191–193.
- [13] Spezialausgabe über Photochromie: M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685–1716; M. Irie in *Molecular Switches* (Hrsg.: B. L. Feringa), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, S. 37–62; M. Irie in *Photochromic and Thermochromic Compounds, Vol. 1* (Hrsg.: J. C. Crano, R. J. Guglielmetti), Plenum, New York, **1999**, S. 207–222; H. Tian, S. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 85–97; H. Tian, S. Wang, *Chem. Commun.* **2007**, 781–792.
- [14] A. L. Banerjee, D. Eiler, B. C. Roy, X. Jia, M. K. Haldar, S. Mallik, D. K. Srivastava, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3211–3224. Übersicht zur Verwendung reversibler koordinativer Bindungen in der molekularen Erkennung: M. Kruppa, B. König, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3520–3560.
- [15] In Lösung liegen zwei Konformationen (parallel und antiparallel) der offenen Form des DTE-Grundgerüsts nebeneinander und typischerweise in einem 1:1-Verhältnis vor (siehe Hintergrundinformationen). Die photoaktive Form ist die antiparallele Konformation.
- [16] Weitere Angaben sind in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [17] T. B. Norsten, N. R. Branda, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1784–1785.
- [18] Standardlampen wurden zur Detektion der DC-Platten (Herolab, 6 W) und ebenfalls für die Ringschlussreaktion bei 312 nm verwendet. Die Ringöffnung wurde mit einer 200-W-Wolframlampe durchgeführt, deren Licht durch einen 420-nm-Cut-off-Filter geleitet wurde, um hochenergetische Anteile auszublenden.
- [19] D. J. Anderson, L. C. Thomson, *J. Physiol.* **1948**, *107*, 203–210.
- [20] M. Franchi, D. Vullo, E. Gallori, J. Antel, M. Wurl, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2857–2861.
- [21] Die Photoreaktionen von **6a**, **7a** und **8a** sind in den Hintergrundinformationen gezeigt.
- [22] Während der enzymkatalysierten Reaktion fällt der pH-Wert einer gepufferten Lösung (5% DMSO; Tris-Sulfat-Puffer, pH 8.3), die einen pH-Indikator enthält (Phenolrot, 5.6×10^{-4} M), von 8.3 auf 6.3. Dies ist der Endpunkt der Reaktion. Die Zeit bis zum Farbumschlag wird für jede einzelne Inhibitor-konzentration gemessen und daraus die Enzymaktivität berechnet.
- [23] S. Chakravarty, K. K. Kannan, *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 298–309.
-