

# $\alpha$ -Keto-Aldehyd-Peptide: ein Leitmotiv für die Entwicklung reversibler Proteasominhibitoren\*\*

Melissa Ann Gräwert, Nerea Gallastegui, Martin Stein, Boris Schmidt, Peter-Michael Kloetzel, Robert Huber und Michael Groll\*

Die Bedeutung des Proteasoms für essenzielle biologische Abläufe wie Stressantwort, Zellteilung, Apoptose und Antigenpräsentation ist gut dokumentiert.<sup>[1]</sup> Daher ist es nicht verwunderlich, dass sowohl staatliche Forschungseinrichtungen als auch die pharmazeutische Industrie großes Interesse haben, eine Reihe von niedermolekularen synthetischen Inhibitoren, die gegen diese molekulare proteolytische Maschinerie gerichtet sind, zu entwickeln (Schema SS1 in den Hintergrundinformationen führt einige Beispiele auf).<sup>[2]</sup> Ein umfassender Vergleich der Strukturen der bis jetzt charakterisierten Inhibitoren zeigt,<sup>[3]</sup> dass die meisten dieser Verbindungen kovalent an die N-terminale nukleophile Threonine (Thr1) binden,<sup>[4]</sup> die sich in den aktiven Zentren der zwei siebenzähligen Innenringe des 20S-Proteasoms befinden. Diese aktiven Zentren werden ihrer Anordnung in der Komplexstruktur entsprechend als  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 bezeichnet.<sup>[5]</sup>

MG-132, ein Tripeptidaldehyd, ist einer der am häufigsten verwendeten Proteasominhibitoren, und es konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung die Apoptose induziert.<sup>[6]</sup>

Andere Inhibitoren werden in klinischen Studien auf ihre Anwendbarkeit als Therapeutika für verschiedene Krebsformen oder als Immunsuppressiva untersucht. Beispielsweise wurde Velcade (Bortezomib),<sup>[7]</sup> ein Dipeptid mit Boronsäuregruppe, als erster Proteasom-Blocker von der US Food and Drug Administration zur Behandlung des rezidierten Multiplen Myeloms und des Mantelzell-Lymphoms zugelassen.<sup>[8]</sup> Die hochreaktive Boronsäure-Kopfgruppe bringt jedoch beträchtliche Nebenwirkungen mit sich, da sie auch mit anderen Enzymen reagiert.<sup>[9,10]</sup> Es ist daher nicht verwunderlich, dass konkurrierende Produkte und Naturstoffe mit höheren In-vivo-Spezifitäten gefunden wurden, z.B. Salinosporamid A (NPI-0052),<sup>[11,12]</sup> Carfilzomib, ein  $\alpha,\beta'$ -Epoxyketon-Tetrapeptid, dessen Wirksamkeit zur Behandlung des Multiplen Myeloms, Non-Hodgkin-Lymphoms und solider Tumoren gegenwärtig in klinischen Studien (Phase I und Phase II) untersucht wird.<sup>[13]</sup> Diese Verbindung stammt von dem Naturstoff Epoxomicin<sup>[14]</sup> ab (**2**, Schema 1a), einem höchst spezifischen irreversiblen Proteasom-Inhibitor.<sup>[15]</sup> Der hohe Grad an Spezifität konnte durch die Kristallstrukturanalyse des Hefe-20S-Proteasoms im Komplex mit **2** und dem davon abgeleiteten Bindemechanismus erklärt werden.<sup>[16]</sup> In einer zweistufigen Reaktion reagiert der Inhibitor nicht nur mit Thr1O<sup>γ</sup>, sondern auch irreversibel mit der N-terminalen Aminogruppe von Thr1.

[\*] Dr. M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, Prof. Dr. M. Groll  
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie  
Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85748 München (Deutschland)  
Fax: (+49) 892-891-3363  
E-Mail: michael.groll@ch.tum.de

Prof. Dr. B. Schmidt  
Clemens Schoepf-Institute for Organic Chemistry and Biochemistry,  
Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt (Deutschland)

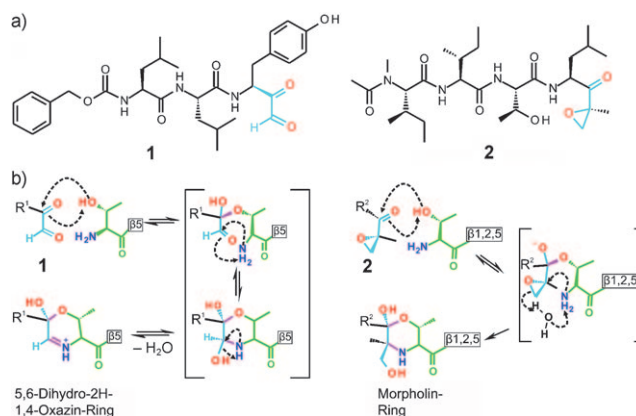
Prof. Dr. P.-M. Kloetzel  
Charité – Institut für Biochemie  
Oudenarder Straße 16, 13347 Berlin (Deutschland)

Prof. Dr. R. Huber  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18a, 82152 Martinsried (Deutschland)  
und  
Zentrum für Medizinische Biotechnologie  
Universität Duisburg-Essen, 45117 Essen (Deutschland)  
und

Cardiff University, School of Biosciences  
Cardiff CF10 3US (Großbritannien)

[\*\*] Wir danken Prof. Dr. L. Hintermann für hilfreiche Diskussionen, R. Feicht für die Präparation von Hefe-20S-Proteasom und den Mitarbeitern des PXI-Strahlengangs am Paul-Scherrer-Institut, Swiss Light Source, Villigen (Schweiz), für ihre Unterstützung bei der Datenaufnahme. Wir danken der Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung (M.A.G.) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft SFB595/TP A11 (M.G.) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201005488> zu finden.

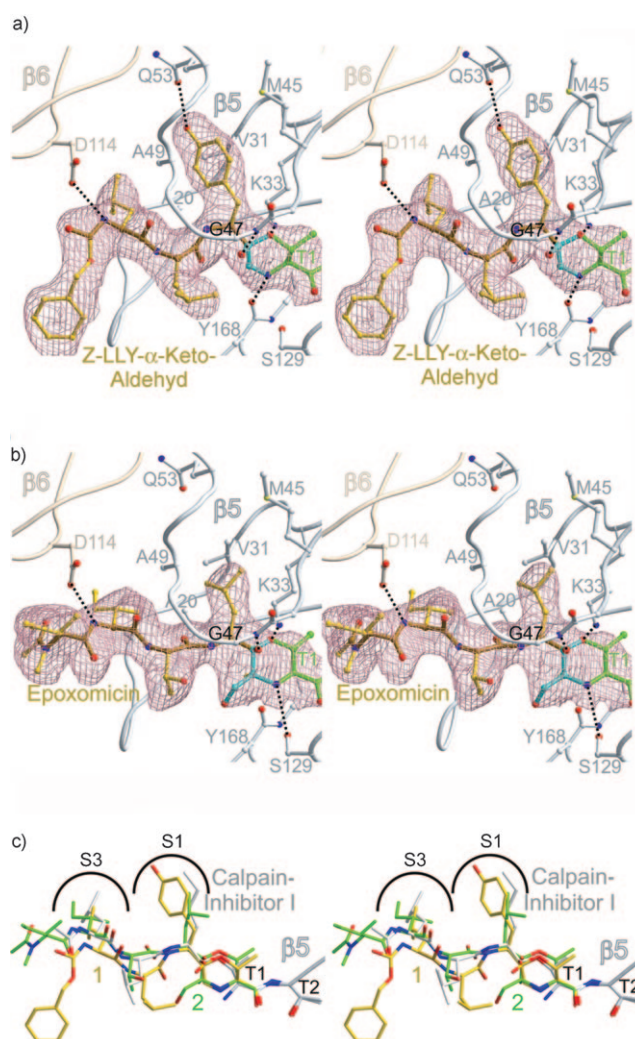


**Schema 1.** a) Der tripeptidische  $\alpha$ -Ketoaldehyd **1** (Z-Leu-Leu-Tyr-COCHO) und der Naturstoff Epoxomicin (**2**;  $\alpha,\beta'$ -Epoxyketon) mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen (in Cyan dargestellt). b) Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung des 5,6-Dihydro-2H-1,4-oxazin- und Morpholin-Rings durch die Bindung von **1** bzw. **2** an Thr1. R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> beziehen sich auf die Peptidanteile des entsprechenden Inhibitors. In Magenta sind die neu gebildeten kovalenten Bindungen zwischen dem Protein und den Liganden dargestellt. Die Elektronenübertragungen sind durch gestrichelte Pfeile angedeutet.

Peptidische  $\alpha$ -Keto-Aldehyde (Glyoxale) stellen eine weitere Proteasominhibitoren-Klasse mit hoher Selektivität dar.<sup>[17]</sup> In-vivo-Inhibitionsstudien haben gezeigt, dass peptidische Glyoxale zellgängige Inhibitoren sind,<sup>[18]</sup> die selektiv und reversibel eines der aktiven Zentren des Proteasoms ( $\beta 5$ ) mit  $K_i$ -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich blockieren. Interessanterweise wurde ihre Wirkungsweise noch nicht aufgeklärt, obwohl ihre Funktion als Proteasominhibitor längst bestätigt worden ist. Da sich ihr reversibler Binde-mechanismus jedoch von der irreversiblen Inhibition durch Epoxomicin unterscheidet,<sup>[16]</sup> bedarf es einer weiteren Aufklärung.

Wir haben daher das kommerzielle peptidische Glyoxal **1** (Schema 1a) im Komplex mit dem Hefe-20S-Proteasom kristallisiert und die Struktur mit einer Auflösung von 2.7 Å bestimmt. Hierzu wurde ein Proteasom-Einkristall sechs Stunden mit einer 5 mM Lösung von **1** inkubiert. Diffraktionsexperimente wurden mit Synchrotronstrahlung an der Swiss Light Source (Paul-Scherrer-Institut, Villigen) durchgeführt. Die Verfeinerung der Kristallstruktur erfolgte mithilfe der Koordinaten des Hefe-20S-Proteasoms (pdb-Nummer: 1RYP), gefolgt von einer umfassenden Korrektur der anisotropen Temperaturfaktoren und Positionsverfeinerung mit CNS sowie einer zyklischen zweifachen Symmetriemittelung mit MAIN ( $R_{\text{kris}}/R_{\text{frei}} = 23.9/26.6\%$ , siehe die Hintergrundinformationen). Die Elektronendichtekarte, die mit den Phaseninformationen nach dieser Mittelung berechnet wurde, ermöglicht eine detaillierte Interpretation des Inhibitors an beiden  $\beta 5$ -Untereinheiten (Abbildung 1a). Die Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten überein, die eine Präferenz von **1** für die Chymotrypsin-ähnliche Untereinheit ausweisen.<sup>[17]</sup> Die kristallographisch bestimmten Daten zeigen, dass das peptidische Glyoxal sogar bei einer sehr hohen Konzentration von 5 mM nur an die  $\beta 5$ -Untereinheit bindet. Vergleichbar mit dem Bindemechanismus von Epoxomicin (Abbildung 1b) und proteasominhibierenden Peptidaldehyden (z.B. Calpain-Inhibitor I (Ac-Leu-Leu-nLeu-CHO)), nimmt das Peptidrückrat von **1** eine  $\beta$ -Konformation an (Abbildung 1c).<sup>[4,5]</sup> Dadurch füllt es die Lücke zwischen den  $\beta$ -Strängen des Proteasoms und bildet ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, das durch eine Reihe von Wasserstoffbrücken zwischen den Stickstoffatomen des Peptids und den umliegenden Aminosäuren stabilisiert wird (Hintergrundinformationen, S1).

Des weiteren zeigt die Elektronendichtekarte einen gut definierten sechsgliedrigen Ring, sodass die Bindung von **1** über zwei Reaktionsstufen erfolgt (Schema 1b), was mit den kinetischen Studien übereinstimmt.<sup>[17]</sup> Die Reaktion umfasst die Bildung eines kovalenten Halbketals analog zu den Bindemechanismen von Epoxomicin und den Peptidaldehyden (Halbacetalbildung).<sup>[19]</sup> Das nucleophile N-terminale Thr1O $\gamma$  greift dabei am Carbonylkohlenstoffatom der  $\alpha$ -Keto-Gruppe des Inhibitors an. Die Reaktion wird durch Wechselwirkungen mit den umliegenden Aminosäuren der Substratbindetasche unterstützt. Desweiteren wird eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe des Halbketals und Gly47N gebildet, das während der Proteolyse von Peptidverbindungen als Oxyanion-Loch fungiert.<sup>[5]</sup> Die Reaktion beinhaltet auch eine nukleophile Addition des  $\beta 5$ -terminalen



**Abbildung 1.** a, b) Stereodarstellungen der  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte des Inhibitoraddukts in der  $\beta 5$ -Untereinheit. Die Elektronendichte wurde mit Phasen der ungebundenen Enzymstruktur bestimmt. a) Reversible Bindung von **1**. Die Temperaturfaktorverfeinerung deutet darauf hin, dass lediglich die  $\beta 5$ -Untereinheit vollständig mit **1** besetzt ist. **1** ist kovalent an Thr1 (grün) gebunden und bildet dadurch einen 5,6-Dihydro-2H-1,4-oxazin-Ring. b) Irreversible kovalente Bindung von **2**. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien dargestellt. c) Stereodarstellung einer Überlagerung von **1** (gelb), **2** (grün) sowie des Peptidaldehyds Calpain-Inhibitor I (Ac-Leu-Leu-nLeu-CHO, grau). Durch ähnliche Wirkungsweisen nehmen alle drei Inhibitoren eine antiparallele  $\beta$ -Strang-Struktur an und besetzen die S1- und S3-spezifische Binde-tasche (schwarze Halbkreise).

Thr1N an das Aldehyd-Carbonylkohlenstoffatom des Inhibitors mit anschließendem Protonentransfer zur Bildung eines Carbinolamin-Übergangszustands. Auf diese Reaktion folgt die Freisetzung eines Wassermoleküls unter Bildung eines 5,6-Dihydro-2H-1,4-oxazin-Rings, ein sechsgliedriger Heterocyclus mit integriertem Halbketal und Imin (Schiff-Base). Die Elektronendichtekarte zeigt deutlich, dass die Hydroxygruppe im Halbketal von Gly47N stabilisiert wird, während die des Carbinolamin-Intermediats unter Kondensation weiter zur Schiff-Base reagiert und somit den Oxazin-Ring konformativ einschränkt. Anders als beim Keto-Alde-

hyd-Peptid entsteht durch Epoxomicin-Bindung ein Morpholin-Ring (Schema 1).<sup>[16]</sup> Dieser Naturstoff übt seine Wirkung aus, indem er reversibel ein Halbketal bildet und zudem ein sekundäres Amin durch eine irreversible intramolekulare Cyclisierung. Während der zuletzt genannten Reaktion öffnet Thr1N durch nukleophilen Angriff das Epoxid, und es folgt eine intramolekulare Substitution unter Inversion an C2 (Schema 1b).

Solche zweistufigen Bindemechanismen, wie hier für  $\alpha',\beta'$ -Epoxyketone und für  $\alpha$ -Keto-Aldehyde gezeigt, sind einzigartig für N-terminale nukleophile Hydrolasen und erklären die hohe Selektivität der peptidischen Glyoxale für das Proteasom im Vergleich zu Peptidaldehyden. Die Inhibition von Serinproteasen wie Chymotrypsin oder Subtilisin durch peptidische Glyoxale ergab tausendfach höhere  $K_i$ -Werte ( $13\ \mu\text{M}$ <sup>[20]</sup> bzw.  $2.3\ \mu\text{M}$ <sup>[21]</sup>). Dies ist auf das Fehlen des N-terminalen nukleophilen Rests am aktiven Zentrum bei diesen Enzymen zurückzuführen, sodass diese ausschließlich mit der Keto- oder mit der Aldehydgruppe des Inhibitors reagieren können. Desweiteren kann die Spezifität für das Proteasom gegenüber andere Proteasen durch die Wahl geeigneter Peptidketten am Pharmakophor verbessert werden. Die S1- und die S3-Bindetaschen sind vor allem für die Substraterkennung durch das Proteasom relevant. Daher können Veränderungen des Peptidanteils zu Proteininhibitoren mit verbesserter Selektivität und verbesserten pharmakologischen Eigenschaften führen. Beispielhaft wurde diese Strategie bereits beim Design des Bortezomib-Analogons CEP-18770<sup>[22]</sup> oder des Epoxomicin-Derivats Carfilzomib angewendet.<sup>[10]</sup>

Obwohl peptidische Glyoxale und Epoxomicin auf ähnliche Weise über die Bildung eines sechsgliedrigen Rings wirken (Schema 1b), ist ein grundlegender Unterschied durch die reversible Anbindung von **1** gegeben. Dieses Ergebnis wird durch die kristallographischen Daten gestützt, denen zufolge beim Bindemechanismus der Glyoxale in zwei reversiblen Schritten der ungesättigte Heterocyclus entsteht (Schema 1b). Unsere Strukturdaten zeigen desweiteren eine  $3.0\ \text{\AA}$  lange Wasserstoffbrücke zwischen Tyr168O und dem Oxazin-Stickstoffatom (Abbildung 1a). Dies deutet darauf hin, dass das Stickstoffatom in der Schiff-Base protoniert vorliegt, was die Hydratisierung des benachbarten Kohlenstoffatoms begünstigt und damit auch die zweite Teilreaktion reversibel macht. Die Beobachtungen zur Struktur stimmen mit unseren Kinetikmessungen überein, die durch eine kompetitive Substratbindung belegen, dass die Inhibition nach vierstündiger Inkubation weiterhin reversibel ist (siehe die Hintergrundinformationen, Abbildung S2). Die gezeigten Ergebnisse erklären daher nicht nur die hohe Spezifität der peptidischen Glyoxale für das Proteasom im Vergleich zu den aktiven Zentren anderer Proteasen, sondern auch die reversible Wirkungsweise auf molekularer Ebene. Hierdurch bewirken die Glyoxale eine kurzzeitige Proteasominhibition, sodass sie deutlich weniger toxisch sind als  $\alpha',\beta'$ -Epoxyketone, da Apoptose nicht zwingend eingeleitet wird. Demgegenüber bewirkt eine irreversible Inhibition eine andauernde Proteasominhibition, die erst durch die Neusynthese des Enzyms aufgehoben wird.

Der Einfluss von Inhibitoren auf lebende Zellen und Organismen hängt entscheidend von der Wirkung ihrer funktionellen Gruppe in wässriger Lösung ab. Unter diesen Bedingungen sind peptidische Glyoxale hydratisiert<sup>[17]</sup> und tragen daher eine weniger reaktive Kopfgruppe als  $\alpha',\beta'$ -Epoxyketone,  $\beta$ -Lactone, Boronsäuren und Aldehyde, was gleichbedeutend mit geringeren Nebenwirkungen ist. Desweiteren sollte das Risiko für Nebenwirkungen durch das spezifische Binden von **1** ausschließlich an die proteasomale  $\beta 5$ -Untereinheit reduziert sein. Es konnte gezeigt werden, dass zum einen eine 25-prozentige Inhibition dieser Untereinheit mit Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität ausreicht, um Apoptose in Tumorzellen auszulösen, zum anderen jedoch eine 80-prozentige Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in normalen Zellen wie Blut-, Leber- und Milzzellen sehr gut vertragen wird.<sup>[23]</sup>

In der Vergangenheit wurden Proteasominhibitoren nicht nur zur Behandlung von Krebs durch die Induktion von Apoptose in sich schnell teilenden Tumorzellen eingesetzt, sondern auch als Immunsuppressiva (z. B. das Epoxomicin-Analogon PR-957, das bevorzugt an die  $\beta 5$ -Immunproteasom-Untereinheit bindet).<sup>[24]</sup> Nach Interferon- $\gamma$ -Behandlung wird in Antigen-präsentierenden Zellen diese Untereinheit für die aktive  $\beta 5$ -Untereinheit eingetauscht, wodurch das Repertoire an proteasomalen Spaltprodukten verändert und eine Immunantwort eingeleitet wird.<sup>[25]</sup> Daher könnten durch Modifikationen der Seitenketten von **1** neue reversible Inhibitoren der immunproteasomalen Untereinheiten entwickelt werden. Somit eröffnet der von uns untersuchte  $\alpha$ -Keto-Aldehyd-Inhibitor einen neuen Ansatz für die Entwicklung von Antikrebsmedikamenten und Entzündungshemmern.

Eingegangen am 1. September 2010

Online veröffentlicht am 9. Dezember 2010

**Stichwörter:** Peptidische Glyoxale · Proteasom · Proteinstrukturen · Reversible Inhibition · Wirkstoffentwicklung

- [1] N. Gallastegui, M. Groll, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, 35, 634–642.
- [2] E. Genin, M. Reboud-Ravaux, J. Vidal, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, 10, 232–256.
- [3] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 687–717.
- [4] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, 268, 533–539.
- [5] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463–471.
- [6] J. Adams, R. Stein, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, 31, 279–288.
- [7] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 333–338.
- [8] P. G. Richardson et al., *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 2487–2498.
- [9] A. A. Argyriou, G. Iconomou, H. P. Kalofonos, *Blood* **2008**, 112, 1593–1599.
- [10] S. D. Demo, C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlatti, K. D. Shenk, M. S. Smyth, C. M. Sun, M. K. Vallone, T. M. Woo, C. J. Molineaux, M. K. Bennett, *Cancer Res.* **2007**, 67, 6383–6391.
- [11] R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 369–371; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 355–357.

- [12] M. Groll, R. Huber, B. C. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136–5141.
- [13] F. Parlati, S. J. Lee, M. Aujay, E. Suzuki, K. Levitsky, J. B. Lorens, D. R. Micklem, P. Ruurs, C. Sylvain, Y. Lu, K. D. Shenk, M. K. Bennett, *Blood* **2009**, *114*, 343947.
- [14] M. Hanada, K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1746–1752.
- [15] L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403–10408.
- [16] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238.
- [17] J. F. Lynas, P. Harriott, A. Healy, M. A. McKerverey, B. Walker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 373–378.
- [18] L. J. Crawford, B. Walker, H. Ovaa, D. Chauhan, K. C. Anderson, T. C. Morris, A. E. Irvine, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6379–6386.
- [19] M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 58–66.
- [20] B. Walker, N. McCarthy, A. Healy, T. Ye, M. A. McKerverey, *Biochem. J.* **1993**, *293*, 321–323.
- [21] A. Djurdjevic-Pahl, C. Hewage, J. P. Malthouse, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2005**, *1749*, 33–41.
- [22] E. Sanchez, M. Li, J. A. Steinberg, C. Wang, J. Shen, B. Bonavida, Z. W. Li, H. Chen, J. R. Berenson, *Br. J. Haematol.* **2010**, *148*, 569–581.
- [23] S. Meiners, A. Ludwig, V. Stangl, K. Stangl, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 309–327.
- [24] T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S. D. Demo, M. K. Bennett, C. J. Kirk, M. Groettrup, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 781–787.
- [25] L. Borissenko, M. Groll, *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 947–955.