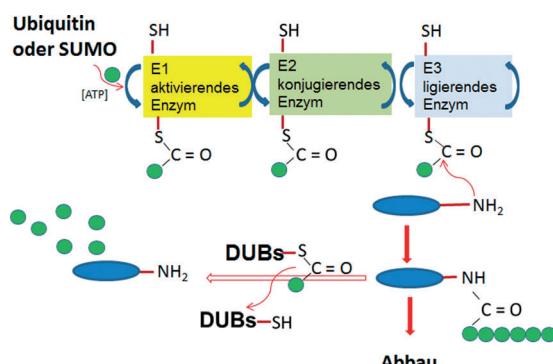


Propargylamide als irreversible Inhibitoren von Cysteinproteasen – zur biologischen Reaktivität von Alkinen**

Christoph Arkona und Jörg Rademann*

Bioorthogonalität · Irreversible Inhibitoren · Proteasen · Protein-katalysierte Reaktionen · Ubiquitin

Oligomere des kleinen Proteins Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlicher Proteine wie SUMO finden sich gebunden an zelluläre Proteine und sind ein wichtiges Signal für die Regulierung von Proteinumsatz und -halbwertszeit in Zellen.^[1,2] Aus diesem Grund sind die entgegenwirkenden Mechanismen der Ubiquitinierung und Desubiquitinierung in Zellen sorgfältig reguliert. Während übertragende Enzyme Ubiquitin-Oligomere an Lysin-Resten intrazellulärer Proteine aufbauen, werden diese Proteinmodifikationen von desubiquitinierenden Enzymen (DUBs) wieder hydrolysiert (Schema 1).



Schema 1. Ubiquitin-ähnliche Proteine werden auf ihre Zielproteine in ATP-abhängiger Reaktion mit Thioester-Intermediaten unter Bildung von Isopeptidbindungen übertragen. Die so modifizierten Proteine unterliegen oft der Degradation. DUBs sind in der Lage, die Isopeptidbindungen zu hydrolysern und dadurch Ubiquitin-ähnliche Proteine aus der Bindung an die Targetproteine wieder freizusetzen.

DUBs sind cysteinabhängige Isopeptidasen und können nach ihrem Protein-Modifizierungssubstrat in verschiedene Subklassen eingeteilt werden. Man vermutet, dass diese Enzyme durch ihre Wirkung auf modifizierte Zellproteine wichtige

Zellprozesse beeinflussen, so z. B. Genexpression, DNA-Replikation, Reparatur von DNA-Schäden, Kontrolle des Zellzyklus, Proteinsortierung, Halbwertszeit von Proteinen und viele andere. Das Wissen darüber, wie DUBs bei Gesundheit und Krankheit wirken, wächst gegenwärtig rasch an.^[3]

Chemisch modifizierte Ubiquitin-Derivate hatten eine große Bedeutung für die Erforschung der DUBs. So wurden chemische Methoden entwickelt, um diese DUB-spezifischen „Sonden“ zu entwickeln. Dazu gehören fluorogene Substrate und kovalente ebenso wie kovalent-reversible und -irreversible Inhibitoren.^[4] Die letztgenannten, z. B. Ubiquitinvinylsulfone, haben sich als so genannte Aktivitätstaschen-gerichtete Sonden (active-site directed probes) für Pull-down-Experimente sowie für die Identifizierung und eventuell auch die Quantifizierung wechselwirkender Proteine als nützlich erwiesen. Die meisten dieser Ubiquitin-Derivate mit modifiziertem Carboxyterminus wurden durch Kombination von biochemischen und chemischen Methoden hergestellt, doch auch die chemische Totalsynthese ist eine Möglichkeit für die Herstellung von Ubiquitin-Derivaten.^[5] Vor kurzem wurde über die Synthese von Ubiquitin-Derivaten durch dipolare Cycloadditionen von Aziden und Alkinen berichtet.^[6]

Nun aber haben die Arbeitsgruppen von Ovaal^[7] und Mootz^[8] unabhängig voneinander C-terminale Propargylamide als Alkin-Baustein für dipolare Cycloadditionen hergestellt – und dies mit vollkommen unerwarteten Resultaten. Sobald nämlich C-terminale Propargylamide von Ubiquitin oder von SUMO, einem Ubiquitin-ähnlichen Protein-Modifizierer, spezifisch von DUB-Isopeptidasen erkannt wurden, erwiesen sie sich als potente irreversible Inhibitoren dieser Cysteinproteasen mit stöchiometrischer Wirkung. Obwohl erwartet wurde, dass sich die Alkinfunktion unter den Bedingungen des Experiments biochemisch und chemisch inert verhält, beobachteten beide Forschergruppen die Addition der Thiolgruppe des Cysteins aus der aktiven Tasche des Enzyms an die Kohlenstoffdreifachbindung des Propargylamids. Durch Kristallisation des Proteinkomplexes konnte ein Vinylthioetherprodukt identifiziert werden. Die Beteiligung des aktiven Cysteinrestes konnte zusätzlich durch ortspezifische Mutagenese nachgewiesen werden. Da über Alkine als Inhibitoren der aktiven Tasche von Cysteinproteasen nie zuvor berichtet worden war, untersuchten die Autoren, ob Propargylamide generell als Cysteinprotease-Inhibitoren

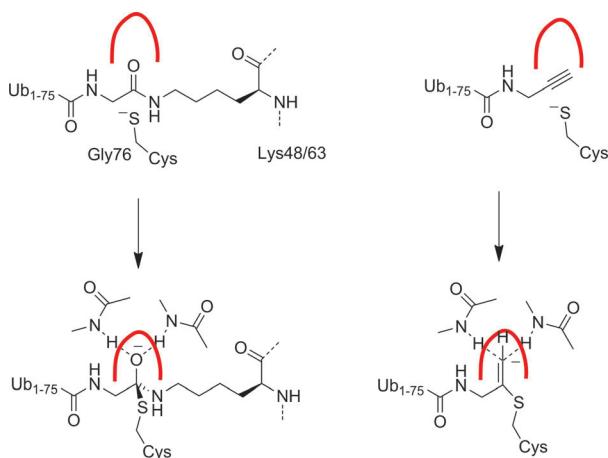
[*] Dr. C. Arkona, Prof. Dr. J. Rademann

Freie Universität Berlin, Institut für Pharmazie,
Medizinische Chemie
Königin-Luise-Straße 2–4, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: j.rademann@fu-berlin.de

[**] Wir danken für die Unterstützung dieser Arbeit durch die DFG (Ra895/5-2, 11-1).

verwendet werden könnten. Wenn das Propargylamidmotiv C-terminal an Ubiquitin gebunden war, reagierten Mitglieder aller vier Familien von Cystein-DUBs damit. Die Situation veränderte sich aber, sobald man zu Caspase-1 als Cysteinprotease wechselte, einem Proteinziel, das in keiner Beziehung zu Ubiquitin-abgeleiteten Substraten steht. Für dieses Enzym kannte man bereits einen Tetrapeptidylaldehyd als Inhibitor im niedrigen nanomolaren Bereich.^[9,10] Dennoch erwies sich das Propargylamid dieses kurzen Peptids in Inhibitionsexperimenten als inaktiv. Eine Verlängerung des Peptidyl-Propargylamids auf sechzehn Aminosäuren war erforderlich, um die zuvor beobachtete potente Inhibition wieder herzustellen.

Aus den Befunden von Ovaa et al. und Mootz et al. ergeben sich interessante Fragen zur Bioorthogonalität sowie zur Inertheit von Alkinen in biologischen Systemen.^[11] Während die Markownikow-selektive Hydrothiolierung terminaler Alkine mit Basenkatalyse Temperaturen von 170–180°C erfordert^[12a] (und immer noch 120°C mit einem Lewis-Säurekatalysator^[12b]), verläuft die Reaktion in Gegenwart eines Protein-Thiols offenbar bei milden Bedingungen, wenn die Protease das Thiolat und das Alkin in räumliche Nähe zueinander bringt und so die Reaktion begünstigt. In diesem Zusammenhang kann die beobachtete Reaktivität des Propargylamids auf einen Templateffekt zurückgeführt werden: Die Erkennung des Ubiquitin-Derivats durch die DUB-Isopeptidase begünstigt die Bildung des Übergangszustandes und somit die Entstehung des Vinylthioetherproduktes. Wenn man die Struktur des Proteinkomplexes betrachtet, scheint tatsächlich das terminale Alkin des modifizierten Ubiquitinsubstrates in der Lage zu sein, mit der Oxoanion-Grube im aktiven Zentrum des Enzyms zu wechselwirken, denn diese Grube ist mit positiven Partialladungen auskleidet, die aus Wasserstoff-Donorgruppen stammen (Schema 2).



Schema 2. Hydrolyse einer Ubiquitin-Isopeptid-Bindung durch ein Desubiquitinierungsenzym (DUB). Links: Das Thiolat-Anion greift das Amid-Kohlenstoffatom an, das durch Bindung an die acide, positiv geladene Oxoanion-Grube (rot) aktiviert wurde. Rechts: Die gleiche H-Donor-ausgekleidete Proteintasche könnte auch das Propargylamid für den nukleophilen Angriff aktivieren. Dabei wird das intermediaire Carbanion stabilisiert und/oder die Elektrophilie am Kohlenstoffatom 2 erhöht.

Diese Partialladungen könnten die negative Polarisierung des terminalen Alkin-Kohlenstoffatoms stabilisieren, die aus dem Angriff des Enzym-Thiolats auf das Kohlenstoffatom 2 des Alkins resultiert. Auf diese Weise begünstigt die DUB-Isopeptidase die Bildung eines thermodynamisch eher nicht begünstigten Produkts durch eine so genannte Templatreaktion. Prinzipiell betonen diese Resultate die generelle Bedeutung von räumlicher Erkennung für enzymatische Aktivitäten, mit dem einzigen Unterschied, dass hier der Netto-Effekt in der irreversiblen Addition des Enzyms an das modifizierte Substrat-Derivat besteht. Im Falle des Ubiquitin-Propargylamids genügt die Erkennung der vollständigen Peptidsequenz, um einen Isopeptidase-Ubiquitin-Komplex zu generieren, der stabil genug ist, um die Thiol-Addition an das Alkin auszulösen. Im Fall der Caspase-1 bindet das Tetrapeptid-Alkin offensichtlich nicht stark genug, um die Reaktion zu starten. Hier bedarf es des 16-meren Peptides, um die Bindungsaffinität so zu steigern, dass eine Templat-unterstützte Thiol-Addition überhaupt möglich wird. Insgesamt stellen die Resultate aus den Gruppen von Ovaa und Mootz also nicht generell die biologische Inertheit von Alkinen in Frage. Nur dann, wenn die Bindung stark genug ist, um eine Templatreaktivität zu induzieren, wird die C-C-Dreifachbindung aktiviert.

Als Perspektive stellen die Arbeiten das besondere Potenzial von Protein-Templatreaktionen für die Entdeckung neuartiger Proteinliganden klar heraus. Bereits früher wurde darüber berichtet, dass nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Proteintemplat dynamisch-kovalente Gleichgewichte auf den Proteinoberflächen verändern und dass dieser Effekt gezielt für die Identifizierung neuartiger Protein-bindender Liganden eingesetzt wurde.^[11] Im Unterschied dazu induziert das Proteintemplat in den hier diskutierten Beispielen eine irreversible Reaktion, die in freier Lösung kaum auftreten würde. Diese Beispiele können möglicherweise auch auf andere wenig reaktive funktionelle Gruppen ausgedehnt werden. Zukünftige Forschungen müssen zeigen, wie allgemein dieses Prinzip einer Umwandlung stark bindender Proteinliganden in relativ spezifisch wirkende irreversible Inhibitoren umsetzbar ist.

Die größte praktische Bedeutung von Protein-Propargylamiden wird vermutlich auf dem Gebiet der katalytischen Sonden liegen. Bereits in diesen ersten Arbeiten haben die Autoren die Reaktivität von Propargylamid mit den vier Hauptklassen der DUBs nachweisen können. Was aber noch fehlt, sind Sonden mit Selektivität für einzelne DUBs oder wenigstens für definierte Subgruppen von DUBs. Solche weiterentwickelten Sonden würden es ermöglichen, die chemische Biologie einzelner Enzyme oder definierter Enzymgruppen zu beschreiben und dabei die Hypothesen über ihre physiologische und pathologische Relevanz zu validieren. Bis dahin bleibt die zentrale Frage für die experimentelle Anwendung von katalytischen Sonden in der Erforschung von DUBs bestehen: Wie kann eine verbesserte Spezifität der Sonden erreicht werden, d. h., wie können Sonden entworfen werden, die nicht mit jeglicher DUB reagieren, sondern nur mit einer definierten Subgruppe? Neue Befunde aus unserer eigenen Forschung zeigen, dass dieses Ziel möglicherweise bereits durch die sorgfältige Auswahl des chemischen Cha-

rakters der reaktiven Gruppe erzielt werden kann, die an das Ubiquitin angefügt wird. Ein weiterer Ansatz zum Erreichen verbesserter Spezifität könnte darin bestehen, in die proteinmodifizierenden Substrate (Ubiquitin, SUMO, Nedd 8) wenigstens eine Isopeptidbindung einzuführen, die eine der natürlich vorkommenden Verzweigungspunkte imitiert. Auch nach mehr als dreißig Jahren Forschung über Ubiquitin ist dieses Gebiet noch immer voller fundamentaler Fragen, zu deren Beantwortung kreative Ideen erforderlich sind.

Eingegangen am 25. April 2013

Online veröffentlicht am 21. Juni 2013

-
- [1] J. F. Burrows, J. A. Johnston, *Front. Biosci.* **2012**, *17*, 1184–1200.
 - [2] J. H. Kim, S. H. Baek, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2009**, *1792*, 155–162.
 - [3] D. Komander, M. J. Clague, S. Urbé, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 550–563.
 - [4] A. Borodovsky, H. Ovaa, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K. D. Wilkinson, H. L. Ploegh, B. M. Kessler, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1149–1159.
 - [5] F. El Oualid, R. Merkx, R. Ekkebus, D. S. Hameed, J. J. Smit, A. de Jong, H. Hilkmann, T. K. Sixma, H. Ovaa, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10347–10351; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 10149–10153.
 - [6] S. Eger, M. Scheffner, A. Marx, M. Rubini, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *832*, 589–596.
 - [7] R. Ekkebus, S. I. van Kasteren, Y. Kulathu, A. Scholten, I. Berlin, P. P. Geurink, A. de Jong, S. Goerdayal, J. Neefjes, A. J. Heck, D. Komander, H. J. Ovaa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2867–2870.
 - [8] S. Sommer, N. D. Weikart, U. Linne, H. D. Mootz, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2511–2517.
 - [9] M. Garcia-Calvo, E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson, N. A. Thornberry, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32608–32613.
 - [10] M. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6464–6467; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6346–6349.
 - [11] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
 - [12] a) M. F. Shostakovskii, E. P. Gracheva, N. K. Kulbovskaya, *Zh. Obshch. Khim.* **1960**, *30*, 383–388; b) C. J. Weiss, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10553–10564.
-