

Nutzung natürlicher Proteinsymmetrie zum Design lichtschtbarer Enzyminhibitoren**

Bernd Reisinger, Natascha Kuzmanovic, Patrick Löffler, Rainer Merkl, Burkhard König* und Reinhard Sterner*

Abstract: Die Aktivität des metabolischen Schlüsselenzyms *PriA* aus *Mycobacterium tuberculosis* (*mtPriA*) kann reversibel durch Licht kontrolliert werden. Auf der Grundlage des Dithienylethen-Gerüsts wurden entsprechend der zweifachen Rotationssymmetrie des Proteins symmetrische Inhibitoren mit terminalen Ankern entworfen. Durch Schalten vom flexiblen, offenen Isomer zur starren, geschlossenen Form wurde die Inhibitionsaktivität um eine Größenordnung reduziert.

Die künstliche Steuerung biologischer Prozesse durch Licht ist ein Bereich des Proteindesigns mit zunehmender Bedeutung.^[1] Bei der Lichtregulation von Biomolekülen kamen bislang drei grundlegende Strategien zum Einsatz: Schlüsselpositionen wurden mit photolabilen Schutzgruppen versehen,^[2] natürliche Photorezeptoren wurden umprogrammiert,^[3] und Proteine oder Zellen wurden mit kleinen Molekülen gesteuert, die durch Licht reversibel geschaltet werden können (so genannte Photoschalter).^[4] Mithilfe dieser Steuereinheiten konnten kürzlich licht-induzierbare Liganden für Ionenkanäle und Rezeptoren entworfen und so erhebliche Fortschritte bei der Regulation neuronaler Aktivität erzielt werden.^[5] Da die spezifische Erkennung bestimmter Teile der Liganden zu nichtlinearen Signalweiterleitungen innerhalb von neuronalen Systemen führt, beeinflussen selbst kleine Änderungen der Bindungsstärke infolge der Bestrahlung mit Licht die zelluläre

Antwort erheblich.^[6] Im Gegensatz dazu muss sich bei der Lichtregulation enzymatischer Aktivität die Schaltung des steuerbaren Moleküls beträchtlich auf das aktive Zentrum des Enzyms auswirken. Dazu kann der Photoschalter entweder an die Peripherie der katalytischen Bindetasche gekuppelt^[4,7] oder in einen nichtkovalent bindenden Inhibitor integriert werden.^[4,8]

Wir wollten einen lichtsteuerbaren Inhibitor für die Phosphoribosyl-Isomerase A aus *Mycobacterium tuberculosis* (*mtPriA*) entwerfen. Als Schlüsselenzym der Aminosäurebiosynthese katalysiert *mtPriA* zwei chemisch äquivalente Isomerisierungsreaktionen bei der Herstellung von Tryptophan und Histidin.^[9] In der Histidinbiosynthese wird die Aminoaldose *N'*-[(5'-Phosphoribosyl)formimino]-5-amino-

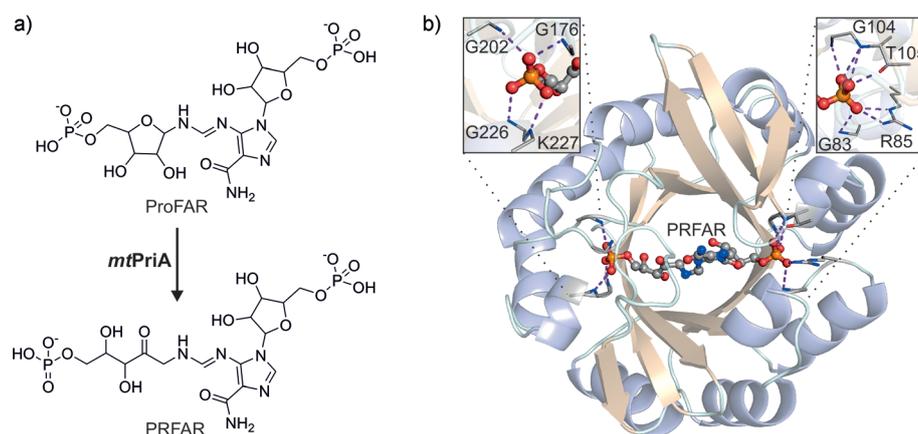


Abbildung 1. Reaktion und Struktur von *mtPriA*. a) *mtPriA* katalysiert die Umwandlung von ProFAR zu PRFAR in der Histidinbiosynthese. b) Blick auf die zweifache Symmetrieachse der $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Struktur von *mtPriA* mit gebundenem Produkt PRFAR (PDB ID 3ZS4^[12a]). PRFAR wird durch zwei gegenüberliegende Phosphatbindetaschen fixiert, die in den Kästchen vergrößert dargestellt sind. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien gezeigt.

[*] B. Reisinger,^[1] P. Löffler, Prof. Dr. R. Merkl, Prof. Dr. R. Sterner
Institut für Biophysik und physikalische Biochemie
Universität Regensburg, 93040 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: Reinhard.Sterner@ur.de

N. Kuzmanovic,^[1] Prof. Dr. B. König
Institut für Organische Chemie
Universität Regensburg, 93040 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: Burkhard.Koenig@ur.de

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

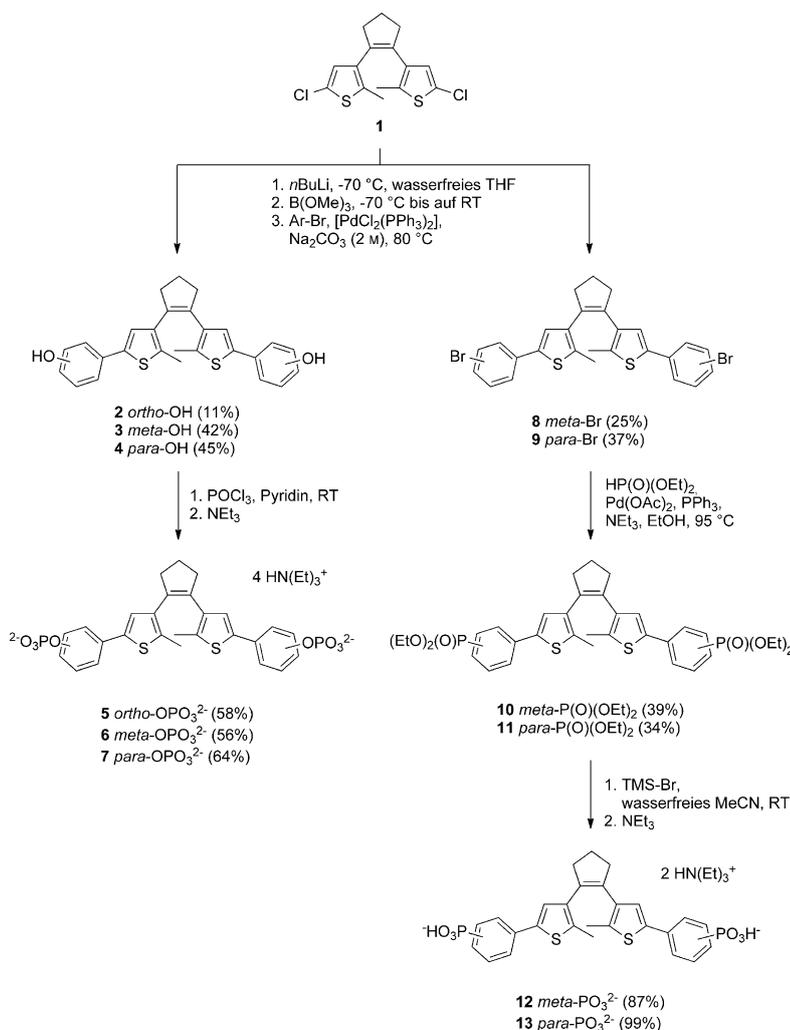
[**] B.R. wurde durch ein Promotionsstipendium des Cusanuswerks gefördert. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (GRK 1910) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201307207> zu finden.

imidazol-4-carboxamidribonukleotid (ProFAR) in die entsprechende Aminoketose *N'*-[(5'-Phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid (PRFAR) umgewandelt (Abbildung 1a). Da Menschen weder Histidin noch Tryptophan produzieren können, stellt *mtPriA* ein potenzielles Target zur Entwicklung von Antituberkulotika dar.^[10] Strukturell gesehen gehört *mtPriA* zur Klasse der $(\beta\alpha)_8$ -Fässer – ein häufiger und vielseitiger Faltungstyp unter Enzymen.^[11] Das Protein weist eine ausgeprägte zweifache Symmetrie auf (Abbildung 1b),^[12] welche auf die Evolution aus einem $(\beta\alpha)_4$ -Halbfass-Vorläufer zurückzuführen ist.^[13] Entsprechend fixieren zwei gegenüberliegende Phosphatbindetaschen das Substrat ProFAR bzw. das Produkt PRFAR

(Abbildung 1b). Daher sollte ein C_2 -symmetrischer Photoschalter mit terminalen Phosphat-Ankern eine hervorragende Grundlage zur Konstruktion von lichtsteuerbaren *mtPriA*-Inhibitoren bilden.

Nur Stilben^[14] und Azobenzol^[15] sowie das Diarylethen-Gerüst^[16] verfügen über die gewünschte zweifache Rotationsasymmetrie. Zur Lichtsteuerung von biologischen Systemen wurde bislang weitestgehend Azobenzol verwendet, obwohl seine Derivate den Nachteil einer unvollständigen und thermisch reversiblen Photoisomerisierung aufweisen.^[1] Dagegen führt die Bestrahlung von Verbindungen, die auf 1,2-Dithienylethen (DTE) basieren, üblicherweise zu Ausbeuten von über 90%, wobei beide Photoisomere thermisch stabil sind.^[8b,16] Daher entschieden wir uns für DTE als Lichtschalter und versahen den Moleküllern mit unterschiedlichen Phosphat- und Phosphonat-Ankern (Schema 1). Durch Suzuki-Kupplung wurden aus Bischloridithienylethen **1** entweder die aromatischen Hydroxide **2–4** oder die aromatische Bromide **8** und **9** hergestellt. Die Hydroxide wurden direkt zu den *ortho*-, *meta*- und *para*-Phosphaten **5–7** umgewandelt, während die Bromide zunächst zu den Phosphonsäureestern **10** und **11** umgesetzt werden mussten, um nach



Schema 1. Synthese der DTE-Phosphate und DTE-Phosphonate.

Tabelle 1: Photochemische Schaltung und berechnete P-P-Abstände der DTE-Phosphate und DTE-Phosphonate **5–7**, **12** und **13**.

Verbindung	$d(\text{P-P})$ [Å]	
	offen	geschlossen
5	12.3	11.3
6	16.7	16.2
7	19.6	18.4
12	16.9	15.8
13	18.9	18.1

anschließender Hydrolyse die *meta*- und *para*-Phosphonate **12** und **13** zu erzeugen.

Das DTE-Gerüst kann reversibel zwischen einer offenen und einer geschlossenen Ringstruktur geschaltet werden (Tabelle 1), wodurch vor allem die konformative Flexibilität beeinflusst wird.^[8b] Die Phosphor-Phosphor-Abstände der potenziellen Inhibitoren betragen Energieminimierungen zufolge zwischen 15.8 und 19.6 Å (Tabelle 1) und stimmen entsprechend gut mit den 16.9 Å überein, die zwischen den Phosphoratomen im *mtPriA*-PRFAR-Komplex liegen (PDB ID 3ZS4^[12a]; siehe die Hintergrundinformationen). Lediglich das offene und das geschlossene Isomer von *meta*-Phosphat **5** weisen in den Konformationen niedrigster Energie sehr kleine P-P-Abstände auf (12.3 Å bzw. 11.3 Å); darüber hinaus können jedoch höherenergetische, längere Konformere beobachtet werden.

Sobald die offenen Formen der Verbindungen **5–7**, **12** und **13** mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt wurden, nahm die Absorptionsbande bei 280 nm ab. Gleichzeitig entstanden neue Extinktionsmaxima bei 350 nm und 525 nm, wodurch sich die anfangs farblose Lösung rosa färbte (Abbildung S1). Die spektralen Änderungen waren jeweils nach 30-sekündiger Bestrahlung abgeschlossen. Gemäß HPLC-Analysen lagen in den photostationären Zuständen zwischen 93% und 97% der geschlossenen Isomere vor (Abbildung S2). Die offenen Formen konnten durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (> 420 nm) regeneriert werden, wobei alle Photoschalter über mehrere Ringschluss-Ringöffnungs-Zyklen stabil waren (Abbildung S3).

Die *mtPriA*-Aktivität kann in einem gekoppelten enzymatischen Assay spektralphotometrisch bei 300 nm bestimmt werden (Schema S1).^[17] Da alle synthetisierten Moleküle unter den verwendeten Reaktionsbedingungen stabil waren, konnte ihre inhibitorische Wirkung

mit „Steady-state“-Enzymkinetiken untersucht werden. Dazu wurden Substrat-Sättigungskurven in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der offenen und geschlossenen Verbindungen **5–7**, **12** und **13** gemessen. (Kurven für **6** sind in Abbildung S4 gezeigt.) Tatsächlich hemmen alle untersuchten DTE-Phosphate und -Phosphonate die *mtPriA*-Reaktion und unterstreichen somit die Funktionsfähigkeit des Design-Konzepts. Bei genügend hohen Substratkonzentrationen wurde in allen Fällen die wildtypische Wechselzahl erreicht, was auf eine kompetitive Inhibition schließen lässt (Tabelle S1). Aus der beobachteten Erhöhung der Michaelis-Konstanten (Tabelle S1) wurden schließlich die Inhibitionskonstanten K_i durch Formel S1 berechnet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Inhibitionskonstanten K_i der Verbindungen **5–7**, **12** und **13** in ihren offenen und geschlossenen Formen.

Inhibitor	K_i [μM] ^[a]	
	offen	geschlossen
5	8.1 ± 2.1	7.0 ± 1.2
6	0.55 ± 0.12	4.4 ± 0.3
7	3.5 ± 0.3	3.7 ± 0.4
12	1.6 ± 0.1	4.9 ± 0.3
13	6.8 ± 0.6	22.7 ± 4.7

[a] Die K_i -Werte wurden aus den in Tabelle S1 gezeigten Daten mit Formel S1 bestimmt.

Die so bestimmten Inhibitionskonstanten liegen im mikromolaren Bereich (Tabelle 2) und sind vergleichbar mit oder sogar niedriger als der K_M -Wert für das natürliche Substrat ProFAR ($K_M^{\text{ProFAR}} = 8.6 \mu\text{M}$; Tabelle S1). In Übereinstimmung mit dem passenden Abstand seiner Phosphat-Atome (Tabelle 1), zeigt das offene Isomer der Verbindung **6** die höchste Bindungsaffinität ($K_i = 0.55 \mu\text{M}$). Sobald es jedoch in die starre, geschlossene Form überführt wird, verringert sich die Inhibitionsaktivität um etwa eine Größenordnung ($K_i = 4.4 \mu\text{M}$). Eine ähnliche Tendenz wird für das entsprechende Phosphonat **12** beobachtet: die inhibitorische Wirkung der offenen Form ($K_i = 1.6 \mu\text{M}$) wird durch den Ringschluss ungefähr dreifach verschlechtert ($K_i = 4.9 \mu\text{M}$). Dagegen weisen beide Photosomere der Phosphate **5** und **7** nahezu vergleichbare K_i -Werte auf (Tabelle 2). Interessanterweise hat die Einführung einer Phosphonat-Gruppe in *para*-Position (Verbindung **13**) einen dreifachen Unterschied zwischen den Inhibitionsaktivitäten der offenen ($K_i = 6.8 \mu\text{M}$) und der geschlossenen Form ($K_i = 22.7 \mu\text{M}$) zur Folge. Hier scheint sich das Fehlen der flexiblen Sauerstoffbrücke zwischen dem endständigen Anker und dem schaltbaren Molekülkern überwiegend auf die Bindung des bereits starren, geschlossenen Isomers auszuwirken.

Die *mtPriA*-Aktivität kann auch direkt während der Katalyse durch Licht gesteuert werden. Nachdem die Reaktion in Anwesenheit der stark inhibierenden, offenen Form von Verbindung **6** gestartet wurde, konnte die Reaktionsgeschwindigkeit durch Schaltung zum weniger aktiven, geschlossenen Isomer etwa dreifach erhöht werden (Abbildung 2).

Wie bereits zuvor erwähnt, beruhen die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der entsprechenden Photosomere auf

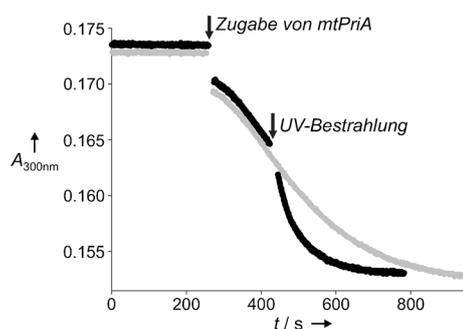


Abbildung 2. Erhöhung der *mtPriA*-Aktivität durch Ringschluss von Verbindung **6**. Der Umsatz von $5 \mu\text{M}$ ProFAR in Anwesenheit von $4 \mu\text{M}$ des offenen Isomers von **6** wurde unter typischen Reaktionsbedingungen (25°C , 50 mM Tris/Acetat pH 8.5, 100 mM Ammoniumacetat, $0.18 \mu\text{M}$ HisF und $0.15 \mu\text{M}$ *mtPriA*) spektralphotometrisch bei 300 nm verfolgt. Nach Erreichen der Maximalgeschwindigkeit wurde die Reaktionsmischung entweder im Photometer belassen (grau) oder entfernt und 10 s lang mit UV-Licht bestrahlt (schwarz). Die unterschiedliche Absorption der beiden Photoisomere bei 300 nm (vergleiche Abbildung S1) führte zu einer Verschiebung der Basislinie, die mithilfe einer Referenzlösung ohne Enzyme korrigiert wurde.

einer Änderung der konformativen Flexibilität.^[8b] DTE-Phosphat **6** kann in seiner offenen Form diverse Geometrien annehmen, da die C-C-Bindungen der Thiophen-Heterocyclen zu dem zentralen Cyclopenten-Ring und den endständigen Phenylgruppen frei rotierbar sind. Das geschlossene Isomer ist hingegen vollständig konjugiert und deswegen weit mehr in seiner Beweglichkeit eingeschränkt. Um tiefere Einblicke in die Bindungsmodi der Inhibitoren zu erhalten, wurde die Wechselwirkung von *mtPriA* mit der offenen und geschlossenen Form der Verbindung **6** in Moleküldynamik(MD)-Simulationen untersucht. Obwohl beide Isomere durch die Phosphatbindetaschen fixiert werden (Abbildungen 3a und 3c), weichen ihre Molekülkerne deutlich voneinander ab. Während drei unabhängige Berechnungen im Fall des offenen Isomers zu ähnlichen, C_2 -symmetrischen Konformeren führten (Abbildung 3b), nahm das geschlossene Isomer verschiedenartige Bindungsmodi an (Abbildung 3d). So verdrehte sich einer der beiden terminalen Phenylringe unterschiedlich stark, um die adäquate Koordination der daran verknüpften Phosphatgruppe zu gewährleisten. Diese Differenzen spiegeln sich auch in den Bindungsenergien wider, die während der Simulationen bestimmt wurden: die Wechselwirkung mit der offenen Form ist durchweg energetisch günstiger (Tabelle S2). Insgesamt ermöglicht die höhere Flexibilität des offenen Isomers eine bessere Anpassung an das aktive Zentrum des Enzyms und scheint so den mit der Bindung einhergehenden Entropieverlust überzukompensieren.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die natürliche Symmetrie eines Proteins zum Design lichtregulierbarer Enzyminhibitoren genutzt werden kann. Die doppelt verankerten DTE-Photoschalter können zwischen einer hoch- und niederaffinen Form wechseln. Dabei werden beide Isomere beinahe quantitativ gebildet und sind zudem thermisch stabil. Folglich wird die enzymatische Aktivität durch die Bestrahlung mit UV-Licht oder sichtbarem Licht abwechselnd erhöht

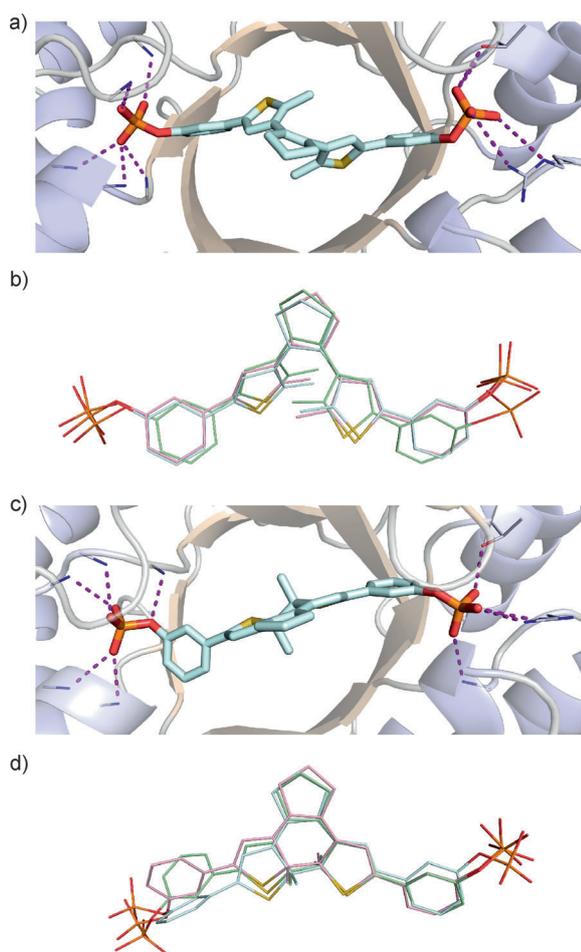


Abbildung 3. MD Simulationen von *mtPriA* und gebundenem *meta*-Phosphat **6**. Repräsentative Enzymstrukturen für das offene (a) und geschlossene Isomer (c). In beiden Fällen wurden drei unabhängige Berechnungen durchgeführt. Nach jeder Simulation wurde das energetisch günstigste Konformer bestimmt und die so erhaltenen offenen (b) und geschlossenen Geometrien (d) überlagert.

bzw. reduziert. Dieses Konzept kann im Grunde auf weitere Enzymsysteme übertragen werden. Da Phosphat ein weit verbreiteter Baustein unter metabolischen Substraten ist, verfügen auch andere Enzyme mit $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Struktur über zwei Phosphatbindestellen. Demnach könnten durch eine ähnliche Vorgehensweise Inhibitoren für die Pyridoxin-5'-phosphat-Synthase^[18] oder verschiedene Aldolasen^[19] entworfen und so mehrere zelluläre Prozesse unabhängig voneinander durch Licht räumlich und zeitlich gesteuert werden.

Eingegangen am 16. August 2013

Online veröffentlicht am 25. November 2013

Stichwörter: Biosynthese · Enzyminhibitoren · Enzymkatalyse · Photochromie · Photoschalter

- [1] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [2] A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47–53.
- [3] a) U. Krauss, T. Drepper, K. E. Jaeger, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2552–2560; b) O. Yizhar, L. E. Fenno, T. J. Davidson, M. Mogri, K. Deisseroth, *Neuron* **2011**, *71*, 9–34; c) F. Zhang, J. Vierock, O. Yizhar, L. E. Fenno, S. Tsunoda, A. Kianianmomeni, M. Prigge, A. Berndt, J. Cushman, J. Polle et al., *Cell* **2011**, *147*, 1446–1457.
- [4] W. Szymanski, J. M. Beierle, H. A. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178.
- [5] a) T. Fehrentz, M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182; b) I. Tochitsky, M. R. Banghart, A. Mourrot, J. Z. Yao, B. Gaub, R. H. Kramer, D. Trauner, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 105–111.
- [6] M. R. Banghart, A. Mourrot, D. L. Fortin, J. Z. Yao, R. H. Kramer, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9261–9265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9097–9101.
- [7] S. Muramatsu, K. Kinbara, H. Taguchi, N. Ishii, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3764–3769.
- [8] a) S. Herre, T. Schadendorf, I. Ivanov, C. Herrberger, W. Steinle, K. Rück-Braun, R. Preissner, H. Kuhn, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1089–1095; b) D. Vomasta, C. Högner, N. R. Branda, B. König, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7756–7759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7644–7647; c) D. Vomasta, A. Innocenti, B. König, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1283–1286.
- [9] F. Barona-Gomez, D. A. Hodgson, *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 296–300.
- [10] a) K. Mdluli, M. Spigelman, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 459–467; b) H. Shen, F. Wang, Y. Zhang, Q. Huang, S. Xu, H. Hu, J. Yue, H. Wang, *FEBS J.* **2009**, *276*, 144–154.
- [11] a) B. Höcker, C. Jürgens, M. Wilmanns, R. Sterner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 376–381; b) R. K. Wierenga, *FEBS Lett.* **2001**, *492*, 193–198.
- [12] a) A. V. Due, J. Kuper, A. Geerlof, J. P. von Kries, M. Wilmanns, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3554–3559; b) J. Kuper, C. Doenges, M. Wilmanns, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 134–139.
- [13] F. List, R. Sterner, M. Wilmanns, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1487–1494.
- [14] D. H. Waldeck, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415–436.
- [15] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [16] M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685–1716.
- [17] T. J. Klem, V. J. Davisson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5177–5186.
- [18] M. G. Franco, B. Laber, R. Huber, T. Clausen, *Structure* **2001**, *9*, 245–253.
- [19] a) E. Lorentzen, E. Pohl, P. Zwart, A. Stark, R. B. Russell, T. Knura, R. Hensel, B. Siebers, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47253–47260; b) T. Wagner, I. A. Shumilin, R. Bauerle, R. H. Kretsinger, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 389–399.