



Pseudoline: halogenierte, allosterische Inhibitoren des Enzyms IspD aus dem Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg**

Andrea Kunfermann, Matthias Witschel, Boris Illarionov, René Martin, Matthias Rottmann, H. Wolfgang Höffken, Michael Seet, Wolfgang Eisenreich, Hans-Joachim Knölker, Markus Fischer, Adelbert Bacher, Michael Groll und François Diederich*

Abstract: Die Enzyme des Mevalonat-unabhängigen Terpenbiosynthesewegs wurden als attraktive Zielstrukturen mit neuartigen Wirkmechanismen für die Entwicklung von Herbiziden zum Pflanzenschutz und Medikamente gegen Infektionskrankheiten identifiziert. Dieser Biosyntheseweg findet sich in vielen humanpathogenen Organismen und Pflanzen, kommt jedoch in Säugetieren nicht vor. Durch die Verwendung eines Hochdurchsatz-Screening-Verfahrens haben wir hochgradig halogenierte, marine Naturstoffe, die Pseudoline, als Inhibitoren gegen das dritte Enzym des Biosynthesewegs, IspD, entdeckt. Deren Aktivität gegen die IspD-Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* und *Plasmodium vivax* wurde in photometrischen und NMR-basierten Assays bestimmt. Kokristallstrukturen zeigten, dass Pseudoline in einer allosterischen Tasche binden und dabei sowohl divalente Metallionen koordinieren, als auch Halogenbindungen ausbilden. Der allosterische Wirkmechanismus, der die Bindung des Kosubstrats (CTP) in der aktiven Tasche verhindert, wurde untersucht. Pseudoline zeigen herbizide Aktivität in Pflanzen-Assays und antiplasmidale Aktivität in zellbasierten Assays.

Zwei der dringlichsten Herausforderungen der Menschheit sind der Kampf gegen Nahrungsmittelknappheit und Infektionskrankheiten, wie etwa Malaria^[1] und Tuberkulose.^[2] Leider erleben die Schlüsselwerkzeuge gegen diese Plagen (Herbizide, welche essenziell für Getreideernten sind und Antiinfektiva) einen rapiden Verlust an Wirksamkeit aufgrund wachsender Resistenzen der Zielorganismen. Um beide Felder zu bearbeiten, wurden Leitstrukturen aus der agrochemischen Forschung gegen infektiöse Keime getes-

tet.^[3] Während Säugetiere ausschließlich den Mevalonat-abhängigen Biosyntheseweg zu den Terpenoidvorstufen Isopentenyldiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) verwenden,^[4] benutzen Pflanzen und viele humane Pathogene den Mevalonat-unabhängigen (auch 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) genannten) Biosyntheseweg, der in den 1990er Jahren entdeckt wurde.^[5] Die sieben Enzyme des Mevalonat-unabhängigen Biosynthesewegs (Schema 1) sind anerkannte Zielstrukturen für Wirkstoffe.^[6] Auch haben jüngste Arbeiten in der Herbizidforschung die Bedeutung dieses Biosynthesewegs verdeutlicht.^[7] Das kommerzielle Herbizid Ketoclamazon hemmt Dxs, das erste Enzym des Mevalonat-unabhängigen Biosynthesewegs (Abkürzungen siehe Schema 1 und Abbildung 1SI (Hintergrundinformationen)),^[8] während der Naturstoff Fosmidomycin (der IspC hemmt) bereits in klinischen Studien gegen Malaria evaluiert wurde.^[9] Das dritte Enzym des Biosynthesewegs, IspD, setzt 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP, 1) zu 4-Di-phosphocytidyl-2C-Methyl-D-erythritol (CDP-ME, 2) um, und wir konnten kürzlich zeigen, dass synthetische Azolopyrimidinderivate IspD von *A. thaliana* (AtIspD) mit IC₅₀-Werten im niedrig nanomolaren Bereich inhibieren, was andeutet, dass IspD eine potentielle Zielstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist.^[10]

Hier beschreiben wir den Wirkmechanismus von Pseudolinderivaten (Schema 1), hochgradig halogenierten marinischen Alkaloiden^[11] mit Herbizid- und Antimalariaaktivität gegen IspD. Wir haben das Hemmpotential in photometrischen und NMR-basierten Aktivitätsassays anhand publizierter Methoden untersucht.^[12] Darüber hinaus wurden diese Derivate

[*] Dr. M. Seet, Prof. Dr. F. Diederich
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich
Vladimir-Prelog-Weg 3, HCI, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: diederich@org.chem.ethz.ch

A. Kunfermann,^[†] Prof. Dr. W. Eisenreich, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science Munich
Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)

Dr. M. Witschel,^[‡] Dr. H. W. Höffken
BASF SE
Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen (Deutschland)

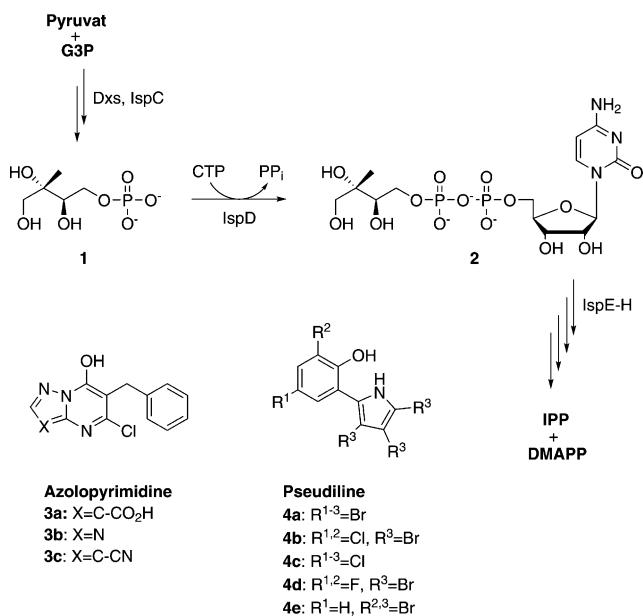
Dr. B. Illarionov, Prof. Dr. M. Fischer, Prof. Dr. A. Bacher
Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg
Grindelallee 117, 20146 Hamburg (Deutschland)

Dr. R. Martin, Prof. Dr. H.-J. Knölker
Department Chemie, Technische Universität Dresden
Bergstraße 66, 01069 Dresden (Deutschland)

Dr. M. Rottmann
Swiss Tropical and Public Health Institute (STPHI)
Socinstraße 57, 4051 Basel (Schweiz)
und
Universität Basel
Petersplatz 1, 4003 Basel (Schweiz)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
[**] Pseudoline 4a, 4b und 4e wurden ursprünglich von der BASF SE, Ludwigshafen (Deutschland) von Prof. H. Laatsch bereitgestellt.^[14a,c] F. Röhl (BASF SE) führte das Hochdurchsatz-Screening gegen AtIspD durch. C. Freymont (STPHI, Basel, Schweiz) führte die zellbasierten Assays gegen *P. falciparum* durch. Wir danken dem Personal der Beamline X06SA beim Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source, Villigen (Schweiz) für deren Hilfe bei der Datensammlung. Der Unterstützung durch den ETH Research Council wird an dieser Stelle gedankt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309557> zu finden.



Schema 1. IspD-katalysierte Reaktion mit den Zielverbindungen **3a–c** und **4a–e**. Liganden **4a–e** sind in der *syn*-Konformation gezeigt. G3P, Glyceraldehyd-3-phosphat; **1**, 2C-Methyl-d-erythritol-4-phosphat (MEP); **2**, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-d-erythritol (CDP-ME); IPP, Iso-pentenylidiphosphat; DMAPP, Dimethylallylidiphosphat.

in vitro auf ihre Wirksamkeit gegen *Plasmodium falciparum* getestet. Die herbizide Aktivität der Pseudoline wurde bereits beschrieben,^[3] und hier werden deren allosterische Bindungseigenschaften auf atomarer Ebene mittels Röntgenkristallographie an *AtIspD*-Komplexstrukturen aufgezeigt, wobei effektive Protein-Ligand-Halogenbindungsinteraktionen gefunden wurden.

Um neue chemische Einheiten als herbizide Leitstrukturen gegen IspD zu entdecken, wurde eine Bibliothek bestehend aus 100 000 Verbindungen mit wirkstoffähnlichen Eigenschaften mittels eines photometrischen Assays untersucht.^[12,13] Dieser Ansatz erlaubte es uns, Hits mit niedrig mikromolaren IC₅₀-Werten (<25 μM) gegen *AtIspD* zu identifizieren (Tabelle 1), namentlich Verbindungen **4a** und **4b**, welche zur Klasse der Pseudoline gehören, die in den 1960er Jahren aus dem marinem Bakterium *Pseudomonas bromotilis* isoliert wurden.^[11a,14] Das chemische Grundgerüst der Screening-Hits unterscheidet sich signifikant von dem der zuvor publizierten synthetischen Azolopyrimidine, was darauf hindeutet, dass die Pseudolinlderivate einen neuartigen Wirkmechanismus gegenüber IspD aufweisen.

Um die Pseudolin-basierten Inhibitoren weiter zu untersuchen, wurden die Verbindungen **4a–e** gemäß publizierten Vorschriften

synthetisiert.^[14,15] Wir führten kinetische Studien mit einem gekoppelten Assay durch, in welchem drei aufeinanderfolgende Enzyme und deren drei Substrate eingesetzt werden, um die Reaktion photometrisch verfolgen zu können (Tabelle 1). Die IC₅₀-Werte der Hilfsenzyme sind in Tabelle 1SI zusammengefasst. Unter den Versuchsbedingungen von 5 mM MgCl₂ und ohne weitere divalente Kationen zeigte **4a** einen apparenen IC₅₀-Wert von 13 μM. Wie anhand von Kristallstrukturen weiter unten verdeutlicht wird, liegt Cadmium(II) als Chelatkomplex mit den Pseudolinlderivaten vor. Aus diesem Grund wurde CdSO₄ zu den Pufferlösungen in zweistellig mikromolarer Konzentration zugefügt, was mit einer siebenfachen Steigerung des Inhibitionspotentials einherging. Ähnliche Effekte wurden mit Verbindungen **4b** und **4c** beobachtet. Im Vergleich mit den anderen Derivaten hemmte **4e** schwächer im photometrischen Assay, was im Einklang mit den kristallographischen Daten steht. Wie für Verbindung **4b** gezeigt wurde (Tabelle 2SI), konnte die Bindungsaffinität ebenfalls durch Zugabe anderer divalenter Kationen (Ca²⁺, Cu²⁺ oder Zn²⁺) in Konzentrationen von 20 μM verdoppelt werden. Wir konnten die photometrisch erhaltenen Ergebnisse durch quantitative ³¹P-NMR-Spektroskopie bestätigen, bei der simultan die Konzentrationen des IspD-Substrats **1** sowie des Produkts **2** und des Diphosphats gemessen wurden. Diese Experimente zeigten, dass das Gleichgewicht der IspD-katalysierten Reaktion nicht überwiegend auf der Produktseite liegt. Daher wurde der gesamte Freie-Energie-Gradient der katalysierten Reaktion durch Zugabe von anorganischer Diphosphatase erhöht, indem das Reaktionsprodukt Diphosphat in Orthophosphat umgesetzt wurde (siehe Hintergrundinformation für Details zu diesem Assay). Die IC₅₀-Werte, die durch die beiden unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, stimmen um einen Faktor von 3 überein (die IC₅₀-Werte betragen 1.4 ± 0.3 μM für Verbindung **4a** und 7.5 ± 0.3 μM für Verbindung **4e**), was die Bedeutung zweiwertiger Kationen für die starke IspD-Hemmung durch Pseudolinlderivate, außer **4e**, unterstreicht.

Wir haben die Pseudolin-Inhibitoren auch gegen die Blutstadien von *P. falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica,

Tabelle 1: IC₅₀-Werte der Verbindungen **4a–e**, gemessen im photometrischen Assay gegen *AtIspD* und *PvIspD* mit unterschiedlichen Metallionenkonzentrationen und zellbasierte EC₅₀-Werte gegen *P. falciparum*.

Ligand	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ <i>AtIspD</i> ^[a] [μM]		IC ₅₀ <i>PvIspD</i> ^[a] [μM]		EC ₅₀ <i>Pf</i> zellbasiert ^[c] [μM]
				ohne Metall	40 μM Cd ²⁺	ohne Metall	40 μM Cd ²⁺	
4a	Br	Br	Br	13 ± 2	1.4 ± 0.2	48 ± 9	57 ± 12	1.27
4b	Cl	Cl	Br	12 ± 1	2.2 ± 0.2	56 ± 8	41 ± 7	1.07
4c	Cl	Cl	Cl	19 ± 2	4.3 ± 0.8	46 ± 6	40 ± 7	n.b.
4d	F	F	Br	79 ± 6	13 ± 2	64 ± 15	51 ± 15	n.b.
4e	H	Br	Br	52 ± 6	19 ± 2	36 ± 10	24 ± 6	11.72

[a] Datensätze wurden mit dem Programm Dynafit bearbeitet, um IC₅₀-Werte zu berechnen.^[25] Die Angaben sind Mittelwerte von drei IC₅₀-Werten, die aus unabhängigen Messungen erhalten wurden.

[b] In-vitro-Aktivität gegen *P. falciparum* NF54-Stämme. Die Angaben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. n.b., nicht bestimmt.

getestet, dessen Überleben von der Aktivität des Mevalonat-unabhängigen Biosynthesewegs abhängt (Tabelle 1).^[16] Die EC₅₀-Werte aus diesem zellbasierten Assay lagen im Bereich von 1–12 µM, was darauf hindeutet, dass IspD die molekulare Zielstruktur ist, welche die antiplasmatische Aktivität der Pseudilinderivate bewirkt. Die Zytotoxizität von **4a** gegen Säugetierzellen (aus Ratten) lag bei 3.1 µM. Daher wurde IspD von *P. vivax* (*PvIspD*) im photometrischen Assay gegen die identifizierten Kandidaten getestet. Verglichen mit *AtIspD* wurde für die Pseudilinderivate gegen *PvIspD* eine schwächere Aktivität im zweistelligen mikromolaren Bereich gemessen. Dieser Befund, sowie die in Säugetierzellen gemessene Zytotoxizität^[14c] deuten darauf hin, dass an der Hemmung der *P. falciparum* Blut-Stadien durch die Pseudilinderivate höchstwahrscheinlich noch weitere molekulare Zielstrukturen als IspD beteiligt sind. Infolgedessen haben wir die Inhibitionsmechanismen der Pseudilinderivate, welche die unterschiedliche Bindung zu IspD verschiedener Spezies verursachen, auf atomarer Ebene untersucht.

Die kristallographischen Untersuchungen wurden mit der Bestimmung der *AtIspD*-Apostruktur bei einer Auflösung von 1.5 Å begonnen (PDB-Code: 4NAI). Details der Strukturbestimmung sind in der Hintergrundinformation in Tabelle 3SI bereitgestellt. *AtIspD* liegt physiologisch als Homodimer vor, und die Schnittstelle der beiden Untereinheiten wird maßgeblich aus einer Linkerregion, die von dem jeweiligen Monomer wegzeigt, ausgebildet (Abbildung 1a). Bemerkenswerterweise ist die Oligomerisierung wichtig für die

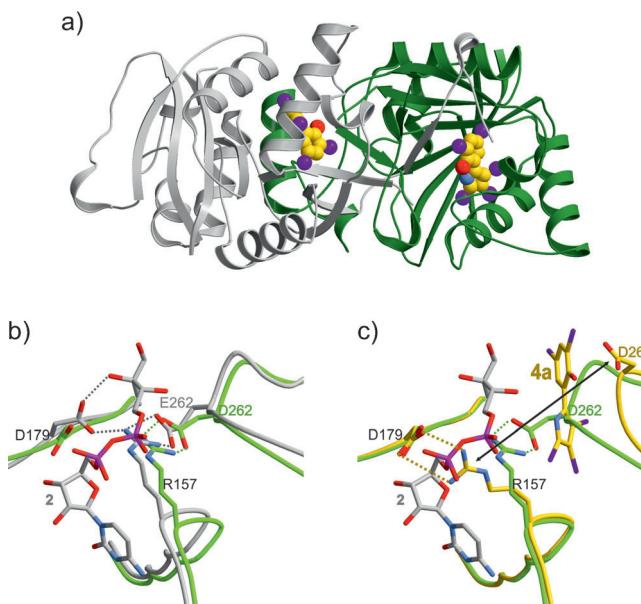


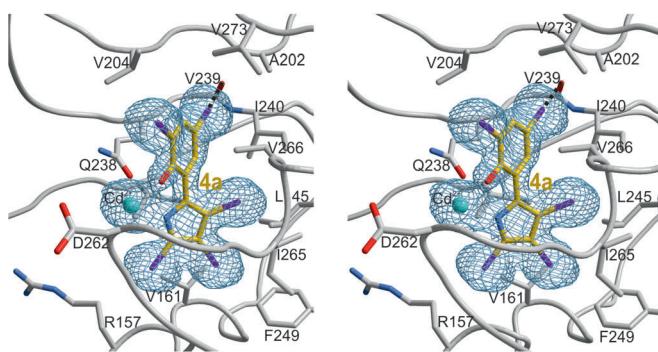
Abbildung 1. a) Gesamtstruktur des *AtIspD*-Dimers im Komplex mit Verbindung **4a**, dargestellt als Sekundärstrukturelemente. **4a** ist als Kalottenmodell gezeigt. b) Strukturelle Überlagerung der Apo-*AtIspD*-Struktur (grün) mit der *EcIspD*:**2**-Komplexstruktur (grau; PDB-Code: 1INI).^[18] Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind in schwarz (*AtIspD*-Nummerierung), wohingegen die verbleibenden Reste gemäß der Farbe des jeweiligen Enzyms gezeigt sind. c) Strukturelle Überlagerung der Apo-*AtIspD*-Struktur (grün) mit der *AtIspD*:**4a**-Komplexstruktur (goldfarben). Zusätzlich ist **2** aus PDB-Code: 1INI in grau abgebildet. Stereoansichten von (b) und (c) sind in Abbildung 3 SI zu sehen.

Bindung des Kosubstrats (CTP) und somit für die Enzymaktivität. Ein Vergleich der Gesamtstrukturen von Apo-*AtIspD* und IspD aus *Escherichia coli* (*EcIspD*) im Komplex mit dem Reaktionsprodukt **2** (PDB-Code: 1INI^[18]) zeigte, dass die Aminosäuren, die an der Dimerbildung beteiligt sind und jene, die an die Diphosphatgruppe des CTP koordinieren, zwischen den Spezies konserviert sind (Abbildung 1b, 2SI und 3SI). Der Einfachheit halber wird hier nur die Nummerierung von *AtIspD* verwendet, um Aminosäurereste zu beschreiben. Im aktiven Zentrum von *EcIspD* interagiert Asp179 sowohl mit dem Substrat **1** als auch dem Produkt **2** und stabilisiert somit beide. Die Bindung von **1** und CTP wird durch geringfügige strukturelle Umorientierungen ermöglicht, wie in der Überlagerung (Abbildung 1b) dargestellt ist. Bemerkenswerterweise zeigt der Vergleich zwischen *EcIspD* und *AtIspD*, dass Arg157 und Asp262, beide mittels H-Brücken nahe dem aktiven Zentrum gebunden, perfekt übereinander passen, obwohl Asp262 im Falle von *EcIspD* ein Glutamat ist. Es gibt jedoch einen Hauptunterschied zwischen dem prokaryontischen und dem eukaryontischen IspD-Homologen: In der *E. coli*-Struktur interagiert Arg157 sowohl mit Asp179 als auch mit Glu262 und stabilisiert somit die Kavität des aktiven Zentrums. Hierdurch wird die Substratbindung und -umsetzung erleichtert, während bei *AtIspD* Asp179 sich in seiner Orientierung unterscheidet, was darauf hindeutet, dass diese Position Spezies-spezifisch ist.

Als nächstes haben wir die Kristallstrukturen von *AtIspD* im Komplex mit **4a** (1.8 Å Auflösung, PDB-Code: 4NAK), **4b** (1.8 Å Auflösung, PDB-Code: 4NAL) und **4e** (1.8 Å Auflösung, PDB-Code: 4NAN) untersucht, wobei eindeutig interpretierbare Elektronendichten für jeden gebundenen Liganden erhalten wurden (Abbildung 2 und 4SI). Interessanterweise erfolgt die Ligandbindung in einer Kavität in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum, unabhängig vom benachbarten Monomer. Diese Bindetasche wurde bereits in Studien der Azolopyrimidin-Inhibitoren **3a–c** erstmals beschrieben.^[10]

Die hier vorgestellten Daten zeigen eine hohe Plastizität der Bindetasche, da sich die Pseudilinderivate in ihrer chemischen Struktur und im Wirkmechanismus deutlich von den Azolopyrimidinliganden unterscheiden (Abbildung 5SI). Sowohl mit den Pseudilinderivaten als auch mit den Azolopyrimidin-Inhibitoren erfolgt eine maßgebliche Konformationsänderung, die vor allem die Aminosäurereste Arg157 und Asp262 betrifft. Es gilt zu beachten, dass in allen bislang beschriebenen Apo-IspD-Strukturen diese allosterische Kavität fehlt.^[19] In den Apo- wie in den Holostrukturen interagiert Arg157 mit Asp262 und hält diese Bindetasche verschlossen. Wie in Abbildung 1c dargestellt, ruft die Bindung von **4a** eine gravierende strukturelle Umorientierung hervor. Asp262 wird zum Lösungsmittel hin exponiert, und die Interaktion zu Arg157 wird aufgehoben. Folglich bewegt sich Arg157 in Richtung der CTP-Bindestelle und geht spezifische H-Brücken mit Asp179 ein. Dieser Konformationswechsel verhindert die Bindung des Nukleotids durch einen Zusammenprall mit der Ribose und führt somit zur Inhibition des Enzyms. Unsere Ergebnisse legen dar, dass die Pseudilinderivate als allosterische Inhibitoren von IspD agieren.

a)



b)

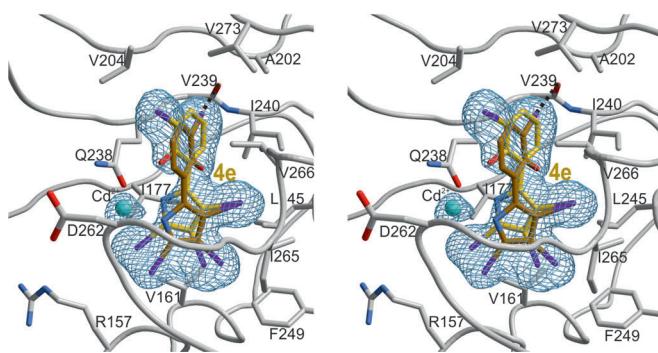


Abbildung 2. Stereoansicht der allosterischen Tasche von AtIspD im Komplex mit a) Verbindung **4a** (PDB-Code: 4NAK) und b) Verbindung **4e** (PDB-Code: 4NAN). **4e** ist mit 7:3 als *syn:anti*-Konformationsge misch populiert. Die $2F_O - F_C$ -Elektronendichte (blaue Maschen) ist auf 1.0σ konturiert. Der Ligand wurde vor der Phasenkalkulation herausge nommen, um Fehler im Modell zu vermeiden. Die Reste der allosterischen Tasche und Liganden **4a**, **4e** (goldfarben) sind als Stabmodell gezeigt, Cd^{2+} (türkis) ist als Sphäre gezeichnet. Die Halogenbindung zwischen dem Liganden (Bromatom, lila) und dem Hauptketten-Sauer stoffatom von Val239 ist als gestrichelte Linie dargestellt (Details zur Halogenbindung siehe Abbildung 3). Die Orientierung der Struktur ist gemäß Abbildung 1 a.

Die Kristallstrukturen von AtIspD im Komplex mit **4a** und **4b** zeigen, dass die Phenol- und Pyrrolringe der Liganden eine *syn*-Konformation einnehmen und an ein Metallion gebunden sind, welches wir aufgrund der Elektronendichte und der Kristallisationsbedingungen als Cadmium(II) interpretieren. Das Metallion ist tetraedrisch von der phenolischen Hydroxygruppe und dem Pyrrolstickstoff der Liganden, der Gln238-Seitenkette und einem Wassermolekül mit Ion-zu-Ligand-Abständen von 2.2–3.7 Å koordiniert (Abbildung 3). Neben dieser Chelatisierung des Metalls scheinen jeweils ein Brom- bzw. Chloratom der Pseudodilinderivate (C-X) in den Kokristallstrukturen mit **4a** und **4b** perfekt positioniert für Halogenbindungen mit dem Hauptketten-Carboxylsauerstoff des Enzyms (Val239; O-Y, Abbildung 3) zu liegen.^[20,21] Diese Interaktion zeichnet sich durch die Anforderung nach nahezu kolinearer Orientierung des Halogenbindungsakzeptors C-X zum Halogenbindungsdonoratom unterhalb des Van-der-Waals-Abstandes aus, was es dem Donoratom erlaubt, seine Elektronendichte in das σ -Loch der C-X-Bindung einzubringen, die dem σ^* -Orbital entspricht. Typischerweise liegt der Abstand zwischen dem Halogen- und dem Sauerstoffatom (X-O) im Bereich der Summe der Van-der-Waals-Radien (3.37 Å für Br-O, 3.27 Å für Cl-O)^[21] oder darunter, während die Winkel 165–180° für C-X-O und ca. 120° für X-O-Y betragen.^[21a,22] Der X-O-Abstand und die Winkel betragen 3.26 Å bzw. 164°/112° für Verbindung **4a** und 3.25 Å bzw. 164°/111° für Verbindung **4b**. Die Strukturdaten zeigen somit, dass eine Halogenbindung mit dem Enzym zusätzlich zur Metallionkoordinierung zur Stabilisierung der Liganden beiträgt und deren inhibitorischen Effekt verstärkt. Wir haben daraufhin die Kristallstruktur von AtIspD im Komplex mit Verbindung **4e** bestimmt, in der kein Halogenatom an der spezifischen *para*-Position zur phenolischen OH-Gruppe vor handen ist. Interessanterweise zeigen die Röntgenstrukturdaten, dass Verbindung **4e** zwei unterschiedliche Konformationen in der allosterischen Enzymtasche annimmt, 70% *syn* und 30% *anti* (Abbildung 2b, 3c). In der letzteren Konformation ist der Ligand nicht mehr in der Lage, mit seiner phenolischen OH-Gruppe das Cd^{2+} zu chelatisieren, wohl aber mit dem *ortho*-Brom eine Halogenbindung zum

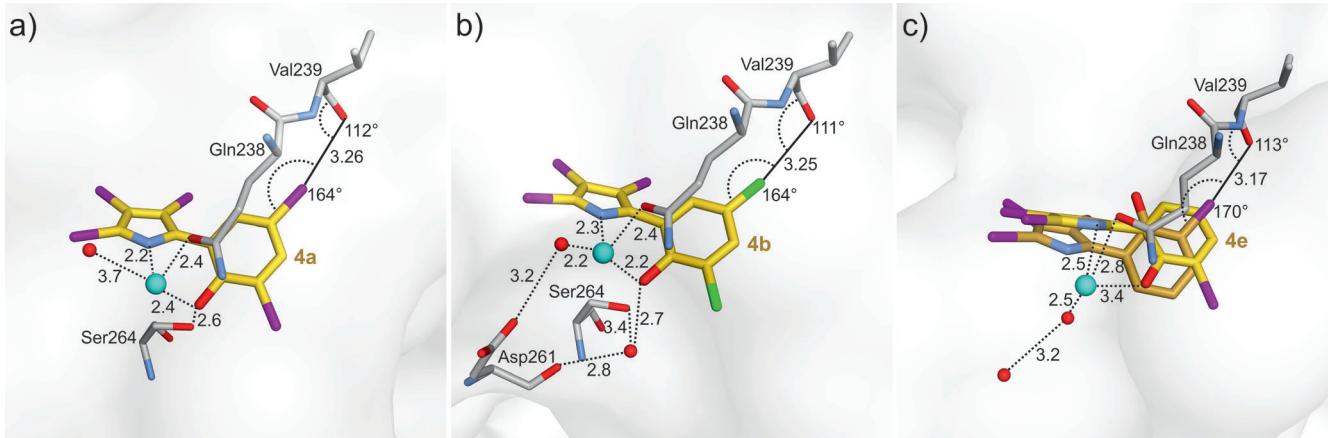


Abbildung 3. Halogenbindung und Metallion-Interaktionen von Verbindungen **4a**, **4b** und **4e** (*syn* und *anti*) mit AtIspD. Aminosäurereste und die Verbindungen sind als Stabmodell gezeigt, Wassermoleküle (rot) und Cd^{2+} (türkis) als Sphären. Abstände sind in Å angegeben.

Hauptketten-Sauerstoff des Proteins auszubilden (X···O Abstand und Winkel 3.17 Å bzw. 170°/113°). Zusätzlich treten hydrophobe Wechselwirkungen (C···C-Abstände ca. 3.7 Å) zwischen Protein und Pseudolinliganden in den drei Komplexen auf, insbesondere Van-der-Waals-Wechselwirkungen unter 4 Å mit den Seitenketten der Aminosäuren Gln238 und Val266, die den Phenolring der Liganden umschließen.

Wie in der Literatur beschrieben, gibt es noch weitere mögliche Zielstrukturen für Pseudolin-Inhibitoren: 12- und 15-Lipoxygenasen, nichtspezifische Leberesterase und Myosin-ATPasen.^[23] Da Pseudilinderivate mehr als nur eine zelluläre Zielstruktur haben, ist es wahrscheinlich, dass der Gesamteffekt dieser Klasse von Naturstoffen auf Organismen stark speziesabhängig ist, wie beispielsweise die alternierenden IC₅₀-Werte zwischen den IspD-Enzymen der Pflanze *A. thaliana* und des Protozoons *P. vivax* zeigen. Wir ziehen die Möglichkeit in Betracht, dass den IspD-Orthologen nebst *A. thaliana* entweder die allosterische Bindetasche fehlt oder die Loop-Region nicht die gleiche Flexibilität aufweist wie in *AtIspD*, und widmen uns diesen Fragestellungen in zukünftigen Mutationsstudien.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass halogenierte marine Pseudolin-Alkaloide in eine allosterische Tasche von *AtIspD* binden. Zudem inhibieren sie auch *PvIspD* und sind aktiv gegen *P. falciparum* in zellbasierten Assays. Die CTP-Bindung in *AtIspD* wird durch Konformationsänderungen verhindert, die das katalytisch aktive Zentrum verschließen. Es ist jedoch immer noch unklar, ob es eine allgemeine Regulierung des Mevalonat-unabhängigen Biosynthesewegs durch einen endogenen Rückkopplungsmechanismus an der allosterischen Tasche von IspD gibt. Diese Bindetasche wird durch die Pseudilinderivate besetzt, welche die Bildung der essentiellen Vorstufen IPP und DMAPP für die Terpenbiosynthese blockieren. Da halogenierte, marine Naturstoffe reichlich vorhanden sind,^[24] sollten deren Halogenatome in biostrukturellen Arbeiten auf unterschiedlichen Zielstrukturen hinsichtlich ihrer aktiven Beteiligung an molekularen Erkennungsprozessen wie Halogenbindungen näher untersucht werden.

Eingegangen am 3. November 2013,
veränderte Fassung am 15. Dezember 2013
Online veröffentlicht am 20. Januar 2014

Stichwörter: Allosterische Inhibition · Antiinfektiva · Halogenbindung · Herbizide · Pseudiline · Wirkstoffentdeckung

- [1] a) Y. V. Ershov, *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 115–138;
b) P. Gao, Y. Yang, C. Xiao, Y. Liu, M. Gan, Y. Guan, X. Hao, J. Meng, S. Zhou, X. Chen, J. Cui, *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *694*, 45–52; c) C. J. L. Murray, L. C. Rosenfeld, S. S. Lim, K. G. Andrews, K. J. Foreman, D. Haring, N. Fullman, M. Naghavi, R. Lozano, A. D. Lopez, *Lancet* **2012**, *379*, 413–431.
- [2] a) I. Abubakar, M. Zignol, D. Falzon, M. Raviglione, L. Ditiu, S. Masham, L. Adetifa, N. Ford, H. Cox, S. D. Lawn, B. J. Marais, T. D. McHugh, P. Mwaba, M. Bates, M. Lipman, L. Zijenah, S. Logan, R. McNerney, A. Zumla, K. Sarda, P. Nahid, M. Hoelscher, M. Pletschette, Z. A. Memish, P. Kim, R. Hafner, S. Cole, G. B. Migliori, M. Maeurer, M. Schito, A. Zumla, *Lancet Infect.*

- Dis.* **2013**, *13*, 529–539; b) A. Zumla, P. Nahid, S. T. Cole, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 388–404.
- [3] M. Witschel, M. Rottmann, M. Kaiser, R. Brun, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1805.
- [4] a) N. Qureshi, J. W. Porter in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 1* (Hrsg.: J. W. Porter, S. L. Spurgeon), Wiley, New York, **1981**; b) K. Bloch, *Steroids* **1992**, *57*, 378–383; c) T. J. Bach, *Lipids* **1995**, *30*, 191–202.
- [5] a) M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565–574; b) M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat, *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1079–1089; c) W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1401–1426; d) F. Rohdich, S. Lauw, J. Kaiser, R. Feicht, P. Köhler, A. Bacher, W. Eisenreich, *FEBS J.* **2006**, *273*, 4446–4458.
- [6] T. Masini, B. S. Kroesen, A. K. Hirsch, *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 1–7.
- [7] a) P. Mombelli, M. C. Witschel, A. W. van Zijl, J. G. Geist, M. Rottmann, C. Freymond, F. Röhl, M. Kaiser, V. Illarionova, M. Fischer, I. Siepe, W. B. Schweizer, R. Brun, F. Diederich, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 151–158; b) N. Scherr, K. Röltgen, M. Witschel, G. Pluschke, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 6410–6413.
- [8] Y. Matsue, H. Mizuno, T. Tomita, T. Asami, M. Nishiyama, T. Kuzuyama, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 583–588.
- [9] a) H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Turbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, E. Beck, *Science* **1999**, *285*, 1573–1576; b) M. A. Missinou, S. Borrman, A. Schindler, S. Issifou, A. A. Adegnika, P. B. Matsiegui, R. Binder, B. Lell, J. Wiesner, T. Baranek, H. Jomaa, P. G. Kremsner, *Lancet* **2002**, *360*, 1941–1942.
- [10] M. C. Witschel, H. W. Höffken, M. Seet, L. Parra, T. Mietzner, F. Thater, R. Niggeweg, F. Röhl, B. Illarionov, F. Rohdich, J. Kaiser, M. Fischer, A. Bacher, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8077–8081; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7931–7935.
- [11] a) P. R. Burkhold, R. M. Pfister, F. H. Leitz, *Appl. Microbiol.* **1966**, *14*, 649–653; b) R. J. Andersen, M. S. Wolfe, D. J. Faulkner, *Mar. Biol.* **1974**, *27*, 281–285.
- [12] V. Illarionova, J. Kaiser, E. Ostrozhenskova, A. Bacher, M. Fischer, W. Eisenreich, F. Rohdich, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8824–8834.
- [13] M. Witschel, F. Röhl, R. Niggeweg, T. Newton, *Pest Manage. Sci.* **2013**, *69*, 559–563.
- [14] a) H. Pudleiner, H. Laatsch, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 423–432; b) D. R. Baker, J. G. Fenyes, J. J. Steffens, *ACS Symp. Ser.* **1992**, *504*, 1–7; c) H. Laatsch, B. Renneberg, U. Hanefeld, M. Kellner, H. Pudleiner, G. Hamprecht, H. P. Kraemer, H. Anke, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 537–546.
- [15] a) R. Martin, A. Jäger, M. Böhl, S. Richter, R. Fedorov, D. J. Manstein, H. O. Gutzeit, H.-J. Knölker, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8186–8190; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8042–8046; b) M. Preller, K. Chinthalapudi, R. Martin, H.-J. Knölker, D. J. Manstein, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3675–3685.
- [16] E. Yeh, J. L. DeRisi, *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001138.
- [17] a) Da *P. falciparum* IspD nicht in einer aktiven Form exprimiert werden kann, wurde *PvIspD* des Erregers der Malaria tertiana verwendet. Beide Gene wurden Codon-optimiert; b) M. Fischer, wird anderweitig publiziert.
- [18] S. B. Richard, M. E. Bowman, W. Kwiatkowski, I. Kang, C. Chow, A. M. Lillo, D. E. Cane, J. P. Noel, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 641–648.
- [19] a) L. E. Kemp, C. S. Bond, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2003**, *59*, 607–610; b) J. Badger, J. M. Sauder, J. M. Adams, S. Antonysamy, K. Bain, M. G. Bergseid, S. G. Buchanan, M. D. Buchanan, Y. Batiyenko, J. A. Christopher, S. Emtage, A. Eroshkina, I. Feil, E. B. Furlong, K. S. Gajiwala, X. Gao, D. He, J. Hindle, A. Huber, K. Hoda, P. Kearins, C. Kissinger, B.

- Laubert, H. A. Lewis, J. Lin, K. Loomis, D. Lorimer, G. Louie, M. Maletic, C. D. Marsh, I. Miller, J. Molinari, H. J. Muller-Dieckmann, J. M. Newman, B. W. Noland, B. Pagarigan, F. Park, T. S. Peat, K. W. Post, S. Radojcic, A. Ramos, R. Romero, M. E. Rutter, W. E. Sanderson, K. D. Schwinn, J. Tresser, J. Winhoven, T. A. Wright, L. Wu, J. Xu, T. J. R. Harris, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, *60*, 787–796; c) J. Behnen, H. Köster, G. Neudert, T. Craan, A. Heine, G. Klebe, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 248–261; d) zusätzliche unpublizierte PDB-Codes: 2PX7, 3OKR, 4KT7.
- [20] a) O. Hassel, *Science* **1970**, *170*, 497–502; b) P. Politzer, P. Lane, M. C. Concha, Y. Ma, J. S. Murray, *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 305–311; c) T. Clark, M. Hennemann, J. S. Murray, P. Politzer, *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 291–296; d) P. Metrangolo, F. Meyer, T. Pilati, G. Resnati, G. Terraneo, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6206–6220; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6114–6127; e) J. S. Murray, P. Lane, P. Politzer, *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 723–729; f) Y. Lu, Y. Wang, W. Zhu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4543–4551; g) T. M. Beale, M. G. Chudzinski, M. G. Sarwar, M. S. Taylor, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1667–1680.
- [21] a) P. Auffinger, F. A. Hays, E. Westhof, P. S. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16789–16794; b) Y. Lu, T. Shi, Y. Wang, H. Yang, X. Yan, X. Luo, H. Jiang, W. Zhu, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2854–2862; c) L. A. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, J.-M. Plancher, G. Hartmann, D. W. Banner, W. Haap, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 329–334; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 314–318; d) L. A. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, J.-M. Plancher, G. Hartmann, Y. Isshiki, K. Morikami, N. Shimma, W. Haap, D. W. Banner, F. Diederich, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2048–2054.
- [22] A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441–451.
- [23] B. Zhang, K. M. Watts, D. Hodge, L. M. Kemp, D. A. Hunstad, L. M. Hicks, A. R. Odoms, *Biochemistry* **2011**, *50*, 3570–3577.
- [24] a) M. T. Cabrita, C. Vale, A. P. Rauter, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2301–2317; b) T. S. Elliott, A. Slowey, Y. Ye, S. J. Conway, *MedChemComm* **2012**, *3*, 735–751; c) G. W. Gribble, *The Alkaloids, Bd. 71*, Academic Press, Oxford, **2012**.
- [25] P. Kuzmić, *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 260–273.