

# Rationales Design eines Proteasominhibitors als Anti-Malaria-Wirkstoff

Camille Le Chapelain\* und Michael Groll\*

Kryo-Elektronenmikroskopie · Malaria · Proteasom ·  
Struktur-Aktivitäts-Beziehungen · Wirkstoffdesign

Malaria zählt noch heute zu den am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten in den Entwicklungsländern. Die für den Menschen schwerste Form wird von dem Parasiten *Plasmodium falciparum* verursacht. Zur Behandlung von Malaria wird bevorzugt der Naturstoff Artemisinin in Kombination mit weiteren Medikamenten, die längere Halbwertszeiten und auch unterschiedliche Wirkprinzipien aufweisen, eingesetzt (Artemisinin-basierte Kombinationstherapien, ACTs). Die Effektivität dieser Behandlungsmethode gerät jedoch durch die zunehmende Entwicklung von Resistenzen in Gefahr. Durch Bestimmung der Konzentration ubiquitinerter Proteine konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Stressantwort auf die von Artemisinin eingeleiteten Schädigungen in wirkstoffresistenten Parasiten deutlich erhöht ist.<sup>[1]</sup> Somit ist das Ubiquitin-Proteasom-System, dessen Aufgabe der Abbau und die Wiederverwertung fehlgefalteter und defekter Proteine ist, ein geeignetes Angriffsziel zur Bekämpfung von *P. falciparum*, dem Erreger der Malaria.

Das Kernstück des Ubiquitin-Abbauweges, das 20S-Proteasom (Kernpartikel, KP), hält das biologische Gleichgewicht aufrecht und reguliert zudem eine Vielzahl lebensnotwendiger Zellprozesse durch die Spaltung nahezu aller intrazellulären Proteine. Es setzt sich aus zwei äußeren  $\alpha$ - und zwei inneren  $\beta$ -Ring in einer  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ -Stöchiometrie zusammen.<sup>[2]</sup> Die proteolytische Aktivität dieser N-terminalen Protease wird von drei der 14 verschiedenen Untereinheiten ausgeübt:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ . Jedes dieser katalytischen Zentren hat eine eindeutige Substratspezifität, die durch die Struktur der Selektivitätstaschen im nichtgestrichenen Bereich des Substratbindekanals (als S1, S2, ... bezeichnet) bestimmt wird.

Seit vielen Jahren ist das humane Proteasom ein vielversprechendes Angriffsziel in der Krebstherapie. Dies hatte die Entdeckung und Entwicklung zahlreicher Inhibitoren, wie die von der FDA zugelassene dipeptidische Boronsäure Velcade und das Epoxyketon Kyprolis, zur Folge. In neuerer Zeit

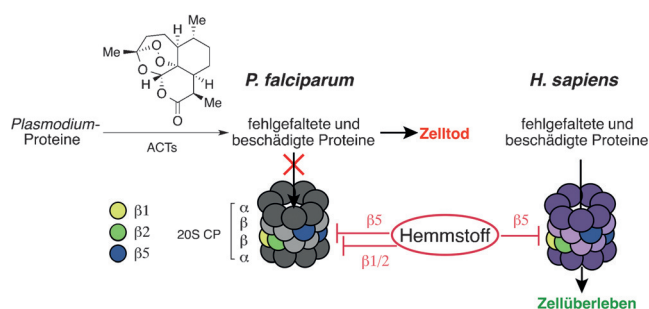
wurden auch Verbindungen entwickelt, die selektiv das Immunproteasom hemmen und somit für die Behandlung chronischer Entzündungs- sowie Autoimmunerkrankungen in Frage kommen.<sup>[3]</sup> Interessanterweise inhibieren mehrere dieser Wirkstoffe auch das Proteasom von *P. falciparum*. Da die Protease für die verschiedenen Phasen des Lebenszyklus des Parasiten essentiell ist, rückte sie als attraktives Angriffsziel für die Behandlung von Malaria in den Fokus der Forschung.<sup>[4]</sup> Einblicke in die strukturellen Unterschiede zwischen dem parasitären und humanen KP auf molekularer Ebene sollten das Design spezifischer Inhibitoren ermöglichen, die das Protozoon abtöten, während der Wirt nicht betroffen ist. Bis 2016 war keinerlei Information zur Struktur des *Plasmodium*-Proteasoms verfügbar, sodass die Entdeckung geeigneter Liganden nur mittels eines Hochdurchsatz-Screenings möglich war. Trotz allem konnten in verschiedenen Studien KP-Hemmstoffe identifiziert werden, die eine größere Potenz für das parasitäre als für das menschliche Proteasom aufwiesen.

Eine umfassende Analyse durch die Arbeitsgruppen um Bhanot, Overkleeft und Bogoy erbrachte erste Erkenntnisse in Bezug auf die Selektivität.<sup>[5]</sup> Die Wissenschaftler konnten zeigen, dass die Blockierung der Untereinheit  $\beta 5$  von *P. falciparum* während der Vermehrungsphase (Schizogenie) ausreichend ist, um das Parasitenwachstum zu verringern; doch erst die gemeinsame Inhibition von  $\beta 2$  und  $\beta 5$  bewirkte ein Absterben des Protozoons in allen Stadien des Blutkreislaufs. Für eine bessere Bewertung der Bedeutung dieser In-vitro-Befunde wurden daraufhin In-vivo-Versuche durchgeführt. Mäuse wurden mit *P. chabaudi* infiziert und im Folgenden mit einer Kombination aus zwei für  $\beta 2$  oder  $\beta 5$  bekannten spezifischen KP-Inhibitoren behandelt. Es zeigte sich, dass die Gabe des Wirkstoffs das Parasitenwachstum verlangsamte und reduzierte. Des Weiteren wurden bei den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe nur wenige Nebenwirkungen beobachtet.<sup>[5]</sup> Aus den durchgeführten Untersuchungen schlossen die Autoren, dass die Hemmung mehrerer Untereinheiten des KP aus dem Protozoon zu dessen Eliminierung führen kann. Für den Wirt hingegen besteht lediglich eine geringe Toxizität, insofern in diesem nur eine der Untereinheiten inaktiviert wird (Schema 1).

Kurze Zeit später identifizierten Bogoy und Mitarbeiter eine Serie von Verbindungen, die eine beeindruckende Selektivität für das *Plasmodium*-Proteasom aufwiesen.<sup>[6]</sup> Diese Reagenzien wurden aus einer Bibliothek nichtkovalent bin-

[\*] Dr. C. Le Chapelain, Prof. Dr. M. Groll  
Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)  
Department Chemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)  
E-Mail: camille.le-chapelain@tum.de  
michael.groll@tum.de

Die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201602519> zu finden.



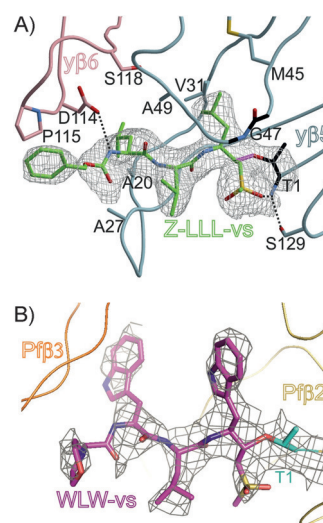
**Schema 1.** Modell des Wirkmechanismus von Proteasominhibitoren gegen Malaria.

dender Liganden ausgewählt. In einem zellbasierten Testverfahren zeigte ein cyclisches Tripeptid mit einer Homophenyl-Seitenkette in der P3-Position den besten Treffer mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 35 nM für *P. falciparum*. Zudem wies die Verbindung eine hervorragende Verträglichkeit gegenüber humanen Vorhaut-Fibroblasten auf (HFF,  $EC_{50} > 50 \mu M$ ). Um die Selektivität eines Liganden für eine Spezies besser zu erklären, wurde die Verbindung in ein Homologie-Modell des *P. falciparum*-Proteasoms eingepasst und der einzigartige Bindemodus mit bereits beschriebenen KP-Strukturen aus Hefe und Maus verglichen. Unter Zuhilfenahme von Strukturüberlagerungen wurde gefolgert, dass die S3-Spezifitätstasche des Parasiten für die selektive Bindung ausschlaggebend ist. Die Verbindung wies eine In-vitro-Aktivität gegenüber den drei Untereinheiten aus dem Protozoon auf, während sie im Menschen ausschließlich die  $\beta 5$ -Untereinheit inaktivierte. In Übereinstimmung mit früheren Befunden verursachte ein kurzer Induktionspuls mit dem Inhibitor ein Absterben des Parasiten in den verschiedenen Entwicklungsstadien des Blutkreislaufs.

In einem früheren Bericht betonten auch Nathan et al. die Bedeutung der S3-Tasche bezüglich der Spezies-Selektivität von proteasomalen Hemmstoffen.<sup>[7]</sup> Die Arbeitsgruppe erforschte die Aktivität von nichtkovalent bindenden N,C-geschützten Dipeptiden gegenüber *Mycobacterium tuberculosis*, das über ein eubakterielles Proteasom verfügt. Es stellte sich heraus, dass das Tuberkulose-KP strukturell anspruchsvolle aromatische Reste in P1 und N-substituierten Asparagin-Seitenketten in P3 bevorzugt. Weitere Optimierungsverfahren ergaben letztendlich eine potente Verbindung, die in vitro eine Inhibitionskonstante ( $K_i$ -Wert) von 15 nM erreichte und kaum Einfluss auf die Aktivität des konstitutiven und Immunoproteasoms besitzt. Der Vergleich der KP-Kristallstrukturen aus *M. tuberculosis*, Hefe und Proteasome aus Säugern führte schließlich zu der Erkenntnis, dass die Spezies-Selektivität bei Bindung der Liganden im Wesentlichen von den Wechselwirkungen mit der S3-Tasche hervorgerufen wird.

Durch Kombination struktureller und biochemischer Experimente setzten Bogoy, da Fonseca und Mitarbeiter im Jahr 2016 einen Meilenstein zur Erklärung des Ursprungs der Spezifität einer kleinen peptidischen Vinylsulfonsäure (vs) für das Proteasom aus *P. falciparum*.<sup>[8]</sup> Sie bestimmten zunächst die Substratpräferenz des parasitären KP indem sie das Spaltmuster von 228 divergenten Peptiden analysierten.

Hierdurch wurde ihre vorausgegangene Hypothese bestätigt, dass sich die S1- und S3-Spezifitätstaschen zwischen Mensch und *Plasmodium* voneinander maßgeblich unterscheiden. Da eine Tryptophan-Seitenkette in diesen Positionen in dem Protozoon bevorzugt ist, wurden drei peptidische Vinylsulfonsäuren synthetisiert (WLW-vs, WLL-vs und LLW-vs) und die entsprechenden Aktivitäten in vitro mit gereinigtem KP aus *P. falciparum* untersucht. Bemerkenswerterweise bewirkten die Verbindungen eine überwiegende Inhibition der parasitären Untereinheit  $\beta 2$ , während das humane  $\beta 2$ -Zentrum hierdurch kaum beeinträchtigt wurde. Für ein tiefgehendes Verständnis dieser interessanten Beobachtungen führten da Fonseca und Mitarbeiter hochauflösende kryoelektronenmikroskopische (Kryo-EM) Analysen von WLW-vs gebunden an das parasitäre Proteasom durch. Abbildung 1



**Abbildung 1.** A) Die kristallographische  $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte (grau, Konturierung bei  $1 \sigma$ , 3.1 Å Auflösung) zeigt Z-LLL-vs (grün) gebunden an das nukleophile Thr1 (schwarz) des aktiven Zentrums der Untereinheit  $\beta 5$  (blau) des KP aus Hefe.<sup>[9]</sup> B) Die Kryo-EM-Elektronendichtekarte (3.6 Å Auflösung) illustriert WLW-vs (violett) gebunden an das nukleophile Thr1 (cyan) des aktiven Zentrums der Untereinheit  $\beta 2$  (gelb) des KP aus *P. falciparum*.<sup>[8]</sup>

spiegelt die EM-Struktur (3.6 Å Auflösung) des Liganden im Komplex mit  $\beta 2$  aus *Plasmodium falciparum*<sup>[8]</sup> wider. Im Vergleich ist die Kristallstruktur von Z-LLL-vs gebunden an die  $\beta 5$ -Untereinheit aus Hefe dargestellt.<sup>[9]</sup> Die Gegenüberstellung mit der EM-Struktur des humanen konstitutiven Proteasoms<sup>[10a]</sup> zeigte ferner, dass die  $\beta 2$ -Bindetaschen im Parasiten breiter und offener sind als im Menschen. Grund hierfür ist das bessere Binden eines Tryptophans in der P3-Position des KP aus *P. falciparum*. Die  $\beta 1$ -Untereinheiten beider Spezies sind für eine Inhibitorbindung zu eng konzipiert, während die  $\beta 5$ -Untereinheiten eher geeignet sind, einen Tryptophan-Rest in der S3-Tasche unterzubringen. Die Verabreichung von WLW-vs gemeinsam mit Dihydroartemisinin tötete ART-resistente Parasiten in Kulturen von frühen *P. falciparum*-Trophozoiten ab. Dies wurde erreicht in einem Konzentrationsbereich, in dem WLW-vs nur die para-

sitäre  $\beta$ 2-Aktivität blockiert – entgegen den Erwartungen, dass dies das Wachstum des Parasiten beeinträchtigt.

Im Gegensatz dazu inhibiert WLL-vs die *Plasmodium*-Untereinheiten  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 in vitro, ebenso wie die humane Untereinheit  $\beta$ 5. Zellbasierte Aktivitätsversuche der Substanz ergaben sogar eine Blockierung der parasitären Untereinheit  $\beta$ 1, jedoch benötigte es ohne das Auftreten von Nebenwirkungen, deutlich höhere Ligandenkonzentrationen, um das KP in HFF-Zellen außer Kraft zu setzen. In Anbetracht dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde WLL-vs einmalig in Mäuse injiziert, die mit *P. chabaudi* infiziert waren. Aus diesen Untersuchungen resultierte ein nahezu vollständiges Verschwinden der Parasiten ohne ernstzunehmende Begleiterscheinungen im Wirt.

Diese kürzlich durchgeführten Studien stellen erneut die zukunftssträchtige Anwendung der Kryo-EM in den Vordergrund. Mit der Methode konnten wichtige Erkenntnisse in der Bestimmung einer Ligandkonformation, gebunden an das entsprechende Zielprotein, erhalten werden.<sup>[10b]</sup> Für diese detaillierten molekularen Einblicke stand bislang überwiegend die Röntgenkristallographie zur Verfügung. Ein weiteres richtungsweisendes Beispiel wurde unlängst mit der hochaufgelösten EM-Struktur des menschlichen 20S-Proteasoms im Komplex mit einem gebundenen Substratanalog vorgestellt.<sup>[10a]</sup> Die geringen Ausbeuten bei der Reinigung von KP aus *P. falciparum* schließen die Durchführung von Kristallisationsversuchen aus. Die rasanten technologischen Fortschritte von Elektronendetektoren und der digitalen Bildverarbeitung bieten neuerdings die Möglichkeit einer Strukturermittlung mittels EM bei einer Auflösung, die vergleichbar mit NMR-Methoden oder Röntgenkristallographie ist.<sup>[10b]</sup> Kryo-EM, im Besonderen, ist für die Strukturbestimmung großer Moleküle bestens geeignet (> 100 kDa). Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist es, dass das Protein beim Experimentieren in seiner physiologischen Umgebung vorliegt. Hierdurch bleiben natürliche Protein-Ligand-Wechselwirkungen erhalten und unterliegen keinen kristallographischen Artefakten. Nichtsdestotrotz kann die durch Kryo-EM gewonnene Information bestens mit der Kristallographie kombiniert werden, um präzisere Erkenntnisse auf atomarer Ebene zu erlangen.

Die gegenwärtige Arbeit von Bogoy, da Fonseca und Mitarbeitern<sup>[8]</sup> ebnet einen Weg für die Entwicklung von neuen Inhibitoren zur Bekämpfung der Malaria. Die durch Kryo-EM erzielten strukturellen Einblicke versprechen ein rationales Design von Liganden mit hervorragender Selektivität für das Proteasom aus *P. falciparum* und nur minimalen

Nebenwirkungen für den Menschen. Somit bietet sich nun die Gelegenheit, alle verschiedenen Stadien des Parasiten-Lebenszyklus mit den peptidischen Vinylsulfonsäure-Verbindungen zu bekämpfen. Die Synergie mit der ACT-Behandlung offenbart eine attraktive therapeutische Herangehensweise und ebnet den Weg für zukünftige Forschungsprojekte im molekularen Wirkstoffdesign.

## Danksagung

Wir bedanken uns bei Paula da Fonseca für die freundliche Bereitstellung der Abbildung 1 B.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6370–6372  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 6478–6480

- [1] C. Dogovski, S. C. Xie, G. Burgio, J. Bridgford, S. Mok, J. M. McCaw, K. Chotinaich, S. Kenny, N. Gnädig, J. Strainer, Z. Bozdech, D. A. Fidock, J. A. Simpson, A. M. Donsorp, S. Foote, N. Klonis, L. Tilley, *PLoS Biol.* **2015**, 13, e1002132.
- [2] a) J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, 268, 533–539; b) M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463–471.
- [3] Eine Übersicht zu Inhibitoren des konstitutiven und Immunproteasoms: E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8708–8720; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8838–8850.
- [4] H. Li, E. L. Ponder, M. Verdoes, K. H. Asbjornsdottir, E. Deu, L. E. Edgington, J. T. Lee, C. J. Kirk, S. D. Demo, K. C. Williams, M. Bogoy, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 1535–1545.
- [5] H. Li, W. A. van der Linden, M. Verdoes, B. I. Florea, F. E. McAllister, K. Govindaswamy, J. E. Elias, P. Bhanot, H. S. Overkleef, M. Bogoy, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 1869–1876.
- [6] H. Li, C. Tsu, C. Blackburn, G. Li, P. Hales, L. Dick, M. Bogoy, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 13562–13565.
- [7] G. Lin, T. Chidawanyika, C. Tsu, T. Warrier, J. Vaubourgeix, C. Blackburn, K. Gigstad, M. Sintchak, L. Dick, C. Nathan, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9968–9971.
- [8] H. Li, A. J. Donoghue, W. A. van der Linden, S. C. Xie, E. Yoo, I. T. Foe, L. Tilley, C. S. Craik, P. C. A. da Fonseca, M. Bogoy, *Nature* **2016**, 530, 233–238.
- [9] M. L. Stein, H. Cui, P. Beck, C. Dubiella, C. Voss, A. Krüger, B. Schmidt, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 1679–1683; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 1705–1709.
- [10] a) P. C. A. da Fonseca, E. P. Morris, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 7573–7578; b) W. Kühlbrandt, *Science* **2014**, 343, 1443–1444.

Eingegangen am 11. März 2016  
Online veröffentlicht am 15. April 2016