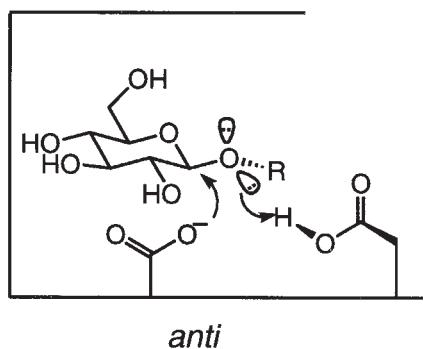
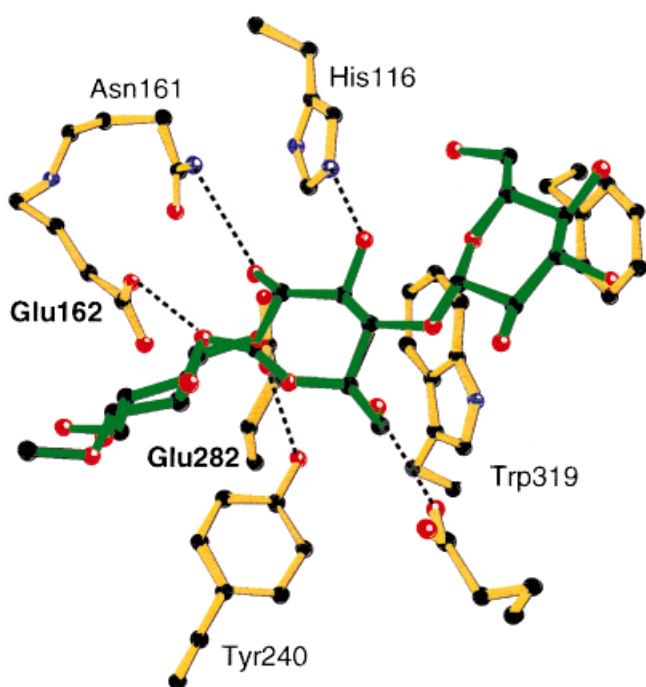
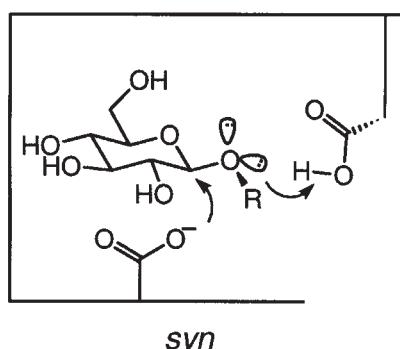


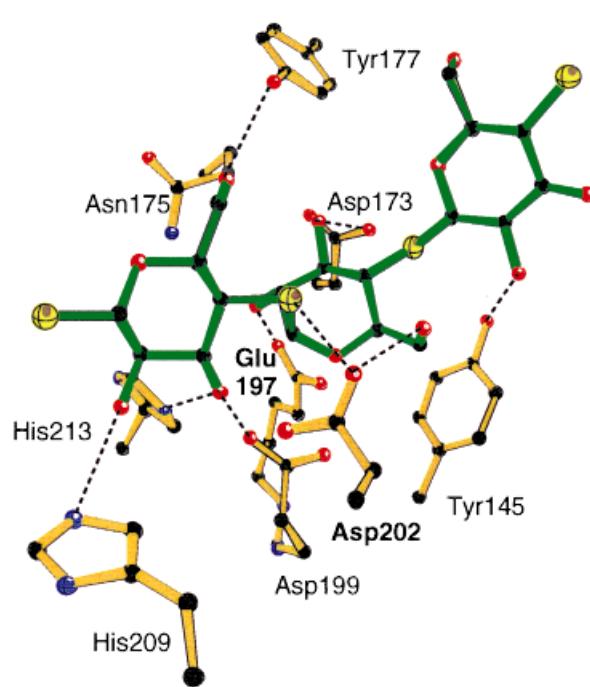
A



B



Komplex der Endocellulase aus *Acidothermus cellulolyticus* mit Cellotetraose



Komplex der Cellobiohydrolase aus *Fusarium oxysporum* mit einem Thioglycosid

**ANGEWANDTE** CHEMIE © WILEY-VCH Einzelheiten der Wirkungsweise von Glycosidasen ließen sich aufklären durch Kombination der enzymkinetischen Untersuchung von Glycosidasehemmern vom Typ der Verbindungen **1 – 4** mit der Analyse von Kristallstrukturen von Glycosidasen und Glycosidase-Ligand-Komplexen. Konfigurationserhaltende  $\beta$ -Glycosidasen protonieren das Substrat nicht „von oben“, sondern „von der Seite“, entweder **anti**- (**A**) oder **syn**-ständig zur endocyclischen C1 – O-Bindung (**B**).

# Neue Erkenntnisse über Hemmung, Struktur und Mechanismus konfigurationserhaltender Glycosidasen

Tom D. Heightman und Andrea T. Vasella\*

Professor Duilio Arigoni zum 70. Geburtstag gewidmet

Das Design starker und selektiver Glycosidasehemmer beruhte bis in jüngste Zeit auf der Analogie zur Struktur von Naturprodukten mit nachgewiesener Wirkung als Glycosidasehemmer oder zur Struktur des wahrscheinlichsten reaktiven Zwischenproduktes, das dem Übergangszustand der enzymatischen Glycosidspaltung am ähnlichsten ist, also einem Oxycarbénium-Ion. Die Beziehungen zwischen der Struktur der Hemmer und der Kinetik der Hemmung wurden kaum einer systematischen Betrachtung unterzogen, und die chromogenen Substrate, Puffer, pH-Bereiche der Untersuchung und Enzyme sind nicht standardisiert. Die systematische Abwandlung entscheidender Strukturparameter der Inhibitoren und die Interpretation standardisierter kinetischer Daten ermöglichen eine effiziente

Analyse enzymatischer Wirkungsmechanismen. Die zusätzliche Berücksichtigung der zunehmenden Zahl an Kristallstrukturanalysen von Glycosidasen und in einzelnen Fällen von Glycosidase-Ligand-Komplexen ermöglicht darüber hinaus eine Korrelation der Hemmwirkung mit der Struktur der Inhibitoren und der Enzyme. Solchen Korrelationen und ihren mechanistischen Interpretationen kommt angesichts der Beziehung zwischen den Strukturen einzelner Glycosidasen im Kristall und den Strukturen von Glycosidasen derselben Familien, von denen nur die Aminosäuresequenz bekannt ist, ein exemplarischer Wert zu; sie sind zudem anhand der wachsenden Zahl von Kristallstrukturdaten von Glycosidasen leicht zu überprüfen. Die Strukturinformation und Interpretationen des Reaktionsmechanismus

bilden ihrerseits eine detaillierte Grundlage für den rationalen Entwurf selektiver und starker Hemmer sowie für die Aufklärung weiterer Aspekte des Reaktionsmechanismus. Solche Analysen sind von grundlegendem Interesse, ungeachtet der möglichen Anwendung starker und selektiver Glycosidasehemmer, etwa zur Behandlung von Diabetes oder als antivirale und fungizide Wirkstoffe. Unser Beitrag beschreibt neue Fortschritte beim Stuktorentwurf, der Synthese und der Charakterisierung von Hemmern der O-Pyranosidasen unter dem Gesichtspunkt der zunehmenden Verfügbarkeit von Strukturdaten für diese Enzyme.

**Stichwörter:** Azole • Enzyminhibitoren • Glycosidasen • Lactame • Protonierungen

## 1. Einleitung

Glycosidasen und ihre Hemmung haben im letzten Jahrzehnt beträchtliches Forschungsinteresse auf sich gezogen. Die Ergebnisse sind in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefaßt worden.<sup>[1-22]</sup> Die Anwendung natürlich vorkommender Glycosidasen in der Enzymersatz-Therapie, bei der Verarbeitung von Pulpe, Textilien und Nahrungsmitteln sowie als Katalysatoren zur Synthese von Oligosacchariden hat der künstlichen Herstellung von Glycosidasen mit verbesserten

Eigenschaften Vorschub geleistet. Man darf erwarten, daß Glycosidasehemmer, die zur Behandlung von Diabetes und der HIV-Infektion sowie als fungizide Wirkstoffe eingesetzt oder getestet werden, in dem Maß erhöhtes Interesse als Therapeutika beanspruchen werden, wie unser Verständnis der Rolle von Glycosidasen in zellulären Erkennungsprozessen wächst.

Die Spaltung der glycosidischen Bindung erfolgt unter Freisetzung eines Zuckers, der entweder die gleiche Konfiguration wie das Substrat aufweist (Retention) oder – seltener – die entgegengesetzte Konfiguration (Inversion). Der 1953 von Koshland vorgeschlagene Mechanismus der Wirkung konfigurationserhaltender (retentiver) Glycosidasen<sup>[23]</sup> hat sich trotz Verfeinerungen mancher Einzelheiten bewährt. Gemäß dieser geläufigen Vorstellung (Abbildung 1a) wird das Aglycon durch die Koordination des exocyclischen,

[\*] Prof. Dr. A. T. Vasella, Dr. T. D. Heightman  
Laboratorium für Organische Chemie  
ETH-Zentrum  
Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 1-632-11-36  
E-mail: vasella@sugar.org.chem.ethz.ch

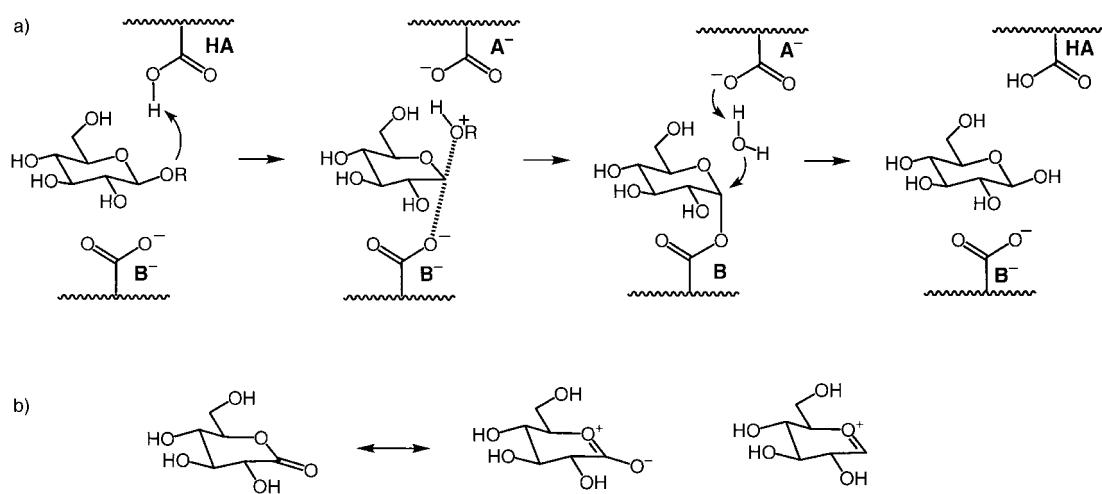


Abbildung 1. a) Mechanismus der Katalyse für konfigurationserhaltende Glycosidasen nach Koshland.<sup>[23]</sup> b) Glucono-1,5-lacton **1** als Übergangszustandsanalogon.

glycosidischen Sauerstoffatoms mit einer sauren funktionellen Gruppe des Enzyms – der katalytischen Säure HA – als Abgangsgruppe aktiviert, also durch partielle Protonierung durch eine Carboxygruppe.<sup>[24, 25]</sup> Ein mehr oder weniger konzertierter nucleophiler Angriff durch eine Carboxylatgruppe (das katalytische Nucleophil B<sup>-</sup>) von der anderen Seite des Pyranoseringes führt zunächst zur Bildung eines Glycosylesters.<sup>[26, 27]</sup> Es ist nicht klar, in welchem Ausmaß Bindungsbruch und Bindungsbildung am anomeren Zentrum konzertiert verlaufen, obschon die Extremfälle eines reinen S<sub>N</sub>1- oder S<sub>N</sub>2-Mechanismus kaum in Frage kommen.<sup>[28]</sup> Das Aglycon diffundiert nun vom aktiven Zentrum weg und wird durch ein Wassermolekül ersetzt, das unter Deprotonierung durch die korrespondierende Base der katalytischen Säure nucleophil am anomeren Zentrum angreift und die eben gebildete Esterbindung spaltet. Diese Substitutionen laufen beide unter Konfigurationsumkehr ab und führen insgesamt zur Erhaltung der Konfiguration. In diesem Aufsatz werden die wesentlichen Befunde und Interpretationen vorgestellt, die unser Verständnis einiger Aspekte dieses Mechanismus in den letzten Jahren verändert haben.

## 2. Lactone und Piperidine: neutrale und basische Inhibitoren

### 2.1. Die Frage nach Ladung und Struktur

Die verhältnismäßig starke Hemmung von  $\beta$ -Glycosidasen durch Glyconolactone vom Typ der Verbindung **1** (Abbildung 1b, Tabelle 1) wurde erstmals 1940 von Ezaki fest-

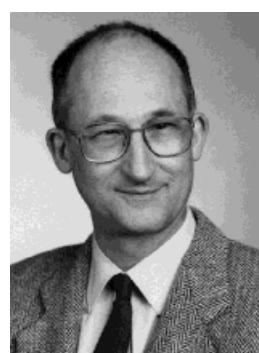
Tabelle 1.  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für das Lacton **1** und die Piperidine **3–5**.

Enzym (Herkunft)	<b>1</b>	<b>3</b> <sup>[29]</sup>	<b>4</b> <sup>[30, 31]</sup>	<b>5</b> <sup>[32]</sup>
$\alpha$ -Glucosidase (Bierhefe)	2000	330	14.6	> 1500
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	400	2.8	18	1.5
$\beta$ -Glucosidase ( <i>Agrobacterium faecalis</i> )	1.4	–	–	–

gestellt.<sup>[33]</sup> Sie wurde 1942 von Horikoshi bestätigt, der die Hemmung der  $\beta$ -Glucosidasen aus *Aspergillus* und aus Süßmandeln untersuchte.<sup>[34]</sup> Später zeigten Levvy und Conchie, daß dieser Befund auch für andere Glycosidasen gilt.<sup>[35–37]</sup> Leaback wies auf die „stereochemical and conformational similarities between the lactone and the transition

*Andrea T. Vasella studierte Chemie und Biologie in Fribourg (Schweiz). 1971 promovierte er an der ETH Zürich bei Duilio Arigoni, arbeitete danach in den Arbeitsgruppen von Jack Baldwin und R. B. Woodward und kehrte 1974 als Oberassistent an die ETH zurück. 1977 wurde er Assistentenprofessor in Fribourg. Von 1981 bis 1993 war er Professor an der Universität Zürich. Seither arbeitet er an der ETH Zürich auf dem Gebiet der Organischen Chemie, wo seine besondere Liebe den Kohlenhydraten gilt.*

*Tom D. Heightman, geboren 1971 in Chelmsford, erhielt 1993 seinen M.A. in Chemie an der Universität Oxford und ging anschließend an die ETH Zürich, wo er 1998 bei Professor Vasella mit einer Arbeit über Glycosidasehemmer und DNA-Liganden promovierte. Er arbeitet jetzt in der Forschung bei SmithKline Beecham Pharmaceuticals in Harlow.*



A. T. Vasella

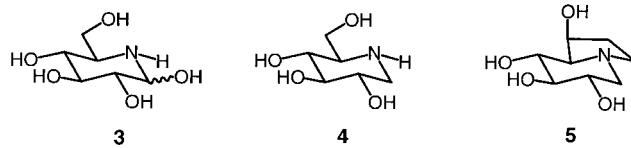


T. D. Heightman

state in the enzyme-catalysed pyranoside hydrolysis“ hin,<sup>[38]</sup> und Reese et al.<sup>[39]</sup> fügten die Bemerkung hinzu, daß die polare Oxo-Gruppe die positive Ladung des Oxycarbenium-Zwischenproduktes **2** teilweise nachahmt (Abbildung 1b). Die relative Bedeutung der beiden Faktoren, Struktur<sup>[40]</sup> und Ladung, blieb Gegenstand ausgedehnter Auseinandersetzungen, stärker noch als ihre Beziehung zu Einzelheiten des enzymatischen Mechanismus.<sup>[41–45]</sup> Pauling hat die Wichtigkeit der Struktur („shape“, eigentlich „Gestalt“) betont, indem er ausführte, daß ein Enzym die Übergangszustands-Zwischenstufe stärker binden sollte als das Substrat, um eine Reaktion wirksam katalysieren zu können, und daß folglich Analoga des Übergangszustandes starke Hemmer sein sollten.<sup>[41]</sup> Der Übergangszustand der Glycosidspaltung muß dem hypothetischen Zwischenprodukt (dem Oxycarbenium-Ion) recht ähnlich sein, und Lactone sollten nach den Überlegungen von Leaback und Reese Analoga des Zwischenproduktes und somit des Übergangszustandes sein.

Die Wichtigkeit der Ladung wurde betont, als auf der Grundlage der Kristallstrukturanalyse die Modellierung von Substrat und Hemmer im aktiven Zentrum von Lysozym möglich wurde. Diese Modellierung führte zur Vermutung, daß eine Carboxylatgruppe an der Stabilisierung des intermediären Oxycarbenium-Ions beteiligt sei, ohne daß es dabei zur Bildung eines Esters komme.<sup>[46]</sup> Allgemein galt die Ansicht, die analoge Wechselwirkung zwischen der katalytisch wirksamen Carboxylatgruppe und dem Dipol der Lacton-Carbonylgruppe trage zur starken Hemmung von Lysozym durch geeignete Lactone bei.<sup>[47–50]</sup>

Später wurde nachgewiesen – durch eine Kombination aus irreversibler Markierung durch Inhibitoren, gerichteter Mutagenese und Sequenzvergleichen – daß die katalytisch wirksamen Carboxy- und Carboxylatgruppen in fast allen Glycosidasen zu finden sind.<sup>[51, 52]</sup> Die protonierten Formen der natürlich vorkommenden basischen Glycosidasehemmer, zu denen Nojirimycin **3**, Desoxynojirimycin **4** und Castanospermin **5** gehören, müssen also durch Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen mit einer Carboxylatgruppe gebunden werden.<sup>[53]</sup> Mit ihrem  $sp^3$ -hybridisierten anomeren Zentrum



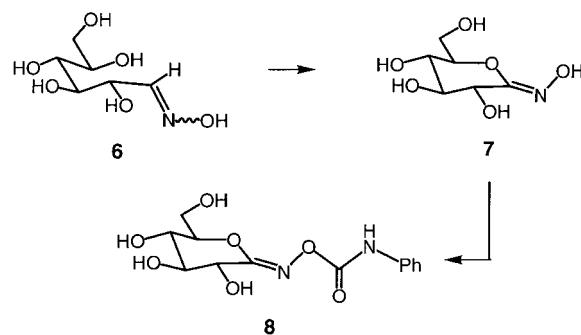
und der bevorzugten Sesselkonformation ähneln diese Hemmer der Struktur des Oxycarbenium-Ions allerdings weniger als die Lactone. Die Wechselwirkungen mit den katalytisch wirksamen Carboxy- und Carboxylatgruppen bildeten somit eine Grundlage für den rationalen Strukturentwurf neuer Glycosidasehemmer, obschon man nicht wußte, welche der beiden Carboxylatgruppen mit den basischen, protonierten Hemmern in Wechselwirkung steht: diejenige, die der (deprotonierten) katalytischen Säure entspricht, oder diejenige, die dem katalytischen Nucleophil entspricht.<sup>[50, 54]</sup>

Eine dabei oft gestellte Frage lautet: Warum ist das neutrale Lacton **1** ein ebensoguter Hemmer von  $\beta$ -Glycosidasen wie die geladenen (protonierten) Piperidine **3–5**, und warum

ist im Unterschied dazu das Lacton ein so viel schwächerer Hemmer von  $\alpha$ -Glycosidasen, die wiederum von den Piperidinen stärker gehemmt werden (Tabelle 1)? Welcher Faktor ist für die starke Hemmung einer bestimmten Glycosidase wichtiger, die Ladung oder die „Gestalt“, die bei gegebener Konfiguration von der Hybridisierung des anomeren Zentrums und von der Konformation des Hemmers abhängt? Sind Lactone und Piperidine – und auch andere basische Hemmer – wirklich Übergangszustands-Analoga? Nur dann nämlich wird die Untersuchung dieser Inhibitoren auf rationale Weise zu einem tieferen Verständnis des enzymatischen Reaktionsmechanismus führen. Wir werden im folgenden aus unserer Perspektive auf neuere Ergebnisse von Synthesestudien sowie von Enzymkinetik- und Strukturuntersuchungen eingehen, die sich die Beantwortung dieser Fragen zum Ziel gesetzt haben.

## 2.2. Synthese und Untersuchung von neutralen und basischen Lacton-Analoga: Protonierung der Inhibitoren?

Glycono-1,5-lactone haben den Nachteil, bereits unter schwach basischen Bedingungen unter Ringöffnung verseift zu werden und unter schwach sauren Bedingungen in inaktive 1,4-Lactone überzugehen. Dieses Verhalten erschwert die Messung von Hemmkonstanten<sup>[39, 55]</sup> und trübt die Aussicht auf die Bildung kristalliner Enzym-Inhibitor-Komplexe für die Röntgenstrukturanalyse.<sup>[56]</sup> Vermutlich ist das der Grund dafür, daß der Übergangszustandscharakter der Glyconolactone spekulativ blieb. Es ist auch der Grund dafür, daß wir uns dem Entwurf und der Untersuchung von Lacton-Analoga zugewandt haben. Zuerst stellten wir das Hydroximsäurelacton **7** durch Oxidation der Hydroxyoxime **6** her, die mit den entsprechenden cyclischen Hydroxylaminen im Gleichgewicht stehen.<sup>[57]</sup> Wie Glucono-1,5-lacton weist **7** eine abgeflachte Sesselkonformation auf, ist jedoch stabil gegen



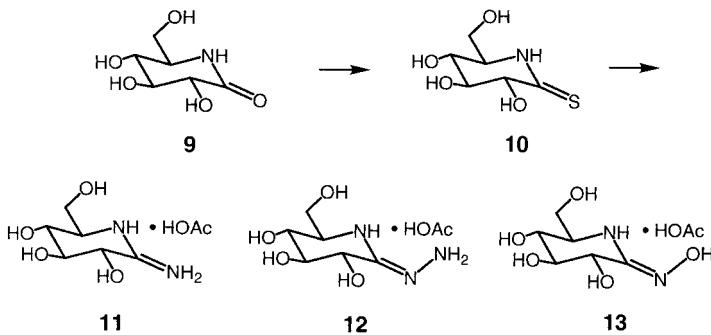
schwach saure und basische Hydrolyse sowie gegen Ringumwandlung. Die zusätzliche Hydroxygruppe ermöglicht die Einführung von Substituenten, welche das Aglycon nachahmen können. Das unsubstituierte Hydroximsäurelacton **7** hemmt die  $\beta$ -Glucosidasen aus Süßmandeln zehnmal schwächer als das Lacton **1** (Tabelle 2), aber das Phenylcarbamat **8** erwies sich als stärkerer Hemmer, wie man auf Grund der bekannten Affinität der Süßmandel-Glycosidasen für Arylglycoside erwarten durfte.<sup>[59]</sup> Der Charakter dieser Hemmer als Übergangszustands-Analoga blieb allerdings spekulativ.

Tabelle 2.  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] bei pH 6.8 für die Lactonoxime **7** und **8**, das Amidin **11**, das Amidrazon **12** sowie das Lactamoxim **13**.

Enzym (Herkunft)	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>11</b> <sup>[58]</sup>	<b>12</b> <sup>[58]</sup>	<b>13</b> <sup>[58]</sup>
$\alpha$ -Glucosidase (Bierhefe)	6800	—	—	—	2.9
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	4300	43	10	8.4	14
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln) <sup>[a]</sup>	98	2.3	—	—	—
$\beta$ -Glucosidase ( <i>Agrobacterium faecalis</i> )	30	1.4	—	—	0.6
$\beta$ -Galactosidase (Rinderleber)	—	—	—	19	—
$\alpha$ -Mannosidase (Schwertbohnen)	—	—	9.0	3.1	—

[a] Bei pH 4.5.

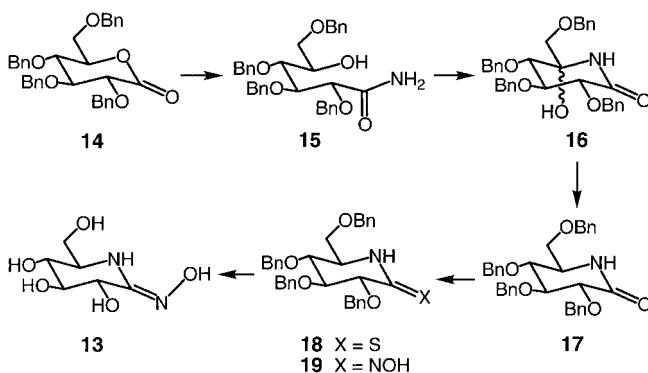
Der nächste Typ von Glyconolacton-Analoga wurde mit dem Ziel hergestellt, das  $\text{sp}^2$ -hybridisierte anomere Zentrum mit der positiven Ladung der Piperidine zu kombinieren. Die Arbeitsgruppe von Ganem synthetisierte das Gluconoamidin **11**, das analoge Lactamhydrazon **12** und das Hydroximsäurelactam **13** durch Oxidation von natürlich vorkommendem Nojirimycin und Aktivierung des dabei gebildeten Lactams **9** durch Überführen in das Thiolactam **10**, welches die Umsetzung mit den gewünschten Stickstoffnucleophilen ermöglichte.<sup>[44, 58, 60]</sup>



Die drei Lacton-Analoga **11**–**13** erwiesen sich als Hemmer mehrerer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosidasen im mikromolaren Bereich (Tabelle 2), was Ganem et al. zu ihrer Bezeichnung als „broad spectrum transition state analogues“ veranlaßte.<sup>[44]</sup> Die im zweiten Teil des Zitats ausgedrückte Behauptung stützte sich auf die Annahme, daß diese Lacton-Analoga Isomere von **11**–**13** mit einer endocyclischen Doppelbindung seien, eine Halbsesselkonformation aufweisen und somit dem Oxycarbenium-Ion und dem Übergangszustand ähnlicher sein sollten als das entsprechende Lacton **1** und das Hydroximsäurelacton **7**. Die Arbeitsgruppe von Ganem zeigte, daß die Hemmung durch das im untersuchten pH-Bereich vollständig protonierte Amidin **11** und das Lactamhydrazon **12** nicht vom pH-Wert abhängig ist, wohl aber die Hemmung durch das weniger stark basische Hydroximsäurelactam **13**, die bei pH-Werten über 6 schwächer wird. Die Ergebnisse dieser Hemmversuche wurden auf eine herausfordernde Art interpretiert, die Anlaß zu Diskussionen gab. Einmal wurde die Bedeutung der Konfiguration stark relativiert. Dann wurde ungeachtet der hohen  $K_i$ -Werte von **13** bei pH 7 der Befund, daß die  $K_i$ -Werte von **11**–**13** (bei pH 5) einander trotz großer Unterschiede in den  $\text{p}K_a$ -Werten dieser Verbindungen recht ähnlich sind, folgendermaßen gedeutet: „Mimicking the incipient charge buildup proved less important for enzyme inhibition than a flattened chair conformation, since even the relatively neutral amidoxime effectively blocked glycoside hydrolysis“.<sup>[58]</sup> Eine Interpolation

(ähnliche Hemmwirkung durch das Amidiniumsalz und die ungeladene Form von **13**) würde bedeuten, daß eine Protonenübertragung auf den Inhibitor nicht wichtig sein kann.

Wir fühlten uns durch die Behauptung, daß diese Hemmer „Breitband-Übergangszustands-Analoga“ sein sollten, herausgefordert: Einmal, weil viele Glycosidasen selektiv für die Konfiguration des Substrates sind und diese Selektivität im Übergangszustand besonders stark ausgeprägt sein sollte, und dann, weil Ganem et al. die Protonierung des Hemmers durch das Enzym als verhältnismäßig unwichtig einstuften, während doch das Substrat auf dem Weg zum Übergangszustand vom Enzym mindestens teilweise protoniert werden muß. Offensichtlich waren die Struktur, der  $\text{p}K$ -Wert und die Hemmwirkung des Hydroximsäurelactams **13** sowie die Wahl der Glycosidasen<sup>[61]</sup> bei dieser Interpretation von ausschlaggebender Bedeutung. Um die Struktur von **13** eindeutig festzulegen, arbeiteten wir zuerst eine praktische Synthese von **13** und seinen beiden selektiv mit  $^{15}\text{N}$  markierten Isotopomeren aus. Das benzilierte Gluconolactam **17** ( $\text{Bn} = \text{Benzyl}$ ) wurde in einer Gesamtausbeute von 70% durch Ammonolyse des entsprechenden Lactons **14** zum Amid **15** und nachfolgende Oxidoreduktion zugänglich gemacht.<sup>[62]</sup> Die Umwandlung von **17** in das Hydroximsäurelactam **13** erfolgte über das



Thiolactam **18**.<sup>[63]</sup>  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -NMR-spektroskopische Untersuchungen sowie eine Röntgenstrukturanalyse belegten eindeutig, daß **13** eine exocyclische Doppelbindung und eine abgeflachte Sesselkonformation hat (Abbildung 2). Die Protonierung von **13** führt zum Übergang der Konformation in

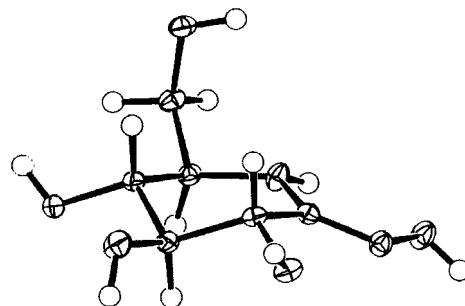


Abbildung 2. Struktur von **13** im Kristall.

einen Halbsessel, was den Gedanken nahelegt, daß die Protonierung durch das Enzym ein bedeutender Faktor bei der Bindung von **13** sein könnte. Daß das Hydroximsäurelacton **7** schwächer hemmt als das Hydroximsäurelactam **13**

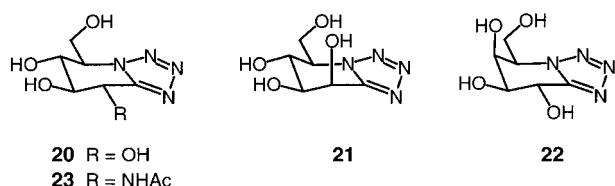
würde dann dessen geringere Basenstärke widerspiegeln. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese hemmt **7** bei pH 4.5 stärker als bei pH 6.8 (Tabelle 2).

Die Bindung der basischen Hemmer **11** und **12**, die mindestens bis zu einem pH-Wert von 7 protoniert sind, wird höchstwahrscheinlich von elektrostatischen Wechselwirkungen begünstigt, ähnlich wie bei den Piperidinen, und führt auch hier zu einer geringen Konfigurationsselektivität. Die schwache pH-Abhängigkeit bedeutet, daß die hauptsächlichen elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem katalytischen Nucleophil erfolgen, das über den ganzen untersuchten pH-Bereich deprotoniert bleibt. Die mangelnde Konfigurationsselektivität weist darauf hin, daß diese Hemmer bestensfalls teilweise Übergangszustands-Analoga sind. Dabei muß die Selektivität des Hemmers mit jener des Enzyms verglichen werden. Man weiß, daß die  $\beta$ -Glucosidasen aus Süßmandeln und die  $\beta$ -Galactosidasen aus Rinderleber, die beide von Ganem et al. eingesetzt wurden, *gluco*- und *galacto*-konfigurierte Substrate etwa gleich gut hydrolysieren.<sup>[64, 65]</sup> Für die Mandel-Glucosidase ist das Verhältnis  $V_{\max} K_M^{-1}$  (Glucosid) zu  $V_{\max} K_M^{-1}$  (Mannosid) größer als 300,<sup>[30]</sup> während die Hemmung durch das *manno*-Amidrazon und das *manno*-Lactamoxim nur 24- bzw. 15mal schlechter ist als die Hemmung durch die entsprechenden *gluco*-Verbindungen, was ebenfalls gegen eine Analogie zwischen diesen Hemmern und dem Übergangszustand spricht.

### 2.3. Tetrazole: konfigurationsselektive Übergangszustands-Analoga

Die im vorigen Abschnitt vorgestellten Ergebnisse führten uns zu den Fragen: Sind neutrale Hemmer vom Lactontyp konfigurationsselektiv, und sind sie Übergangszustands-Analoga? Wie wirkt sich die Ringkonformation (Sessel oder Halbsessel) auf die Stärke und Selektivität der Hemmung aus?

Wir haben das Tetrazol **20** als neutrales, stabiles Lacton-Analogon entworfen, dessen sechsgliedriger Ring wegen der Anellierung eines aromatischen Fünfring-Heterocyclus eine Halbsesselkonformation einnehmen sollte. Der Schlüssel-



schritt der ersten Synthese dieses Tetrazols war die intramolekulare 1,3-dipolare Cycloaddition eines geschützten Azidonitrils.<sup>[66]</sup> Dieses Nitril wurde hergestellt durch Umwandlung von Tetrabenzylglucose in ein offenketiges Nitril, Inversion der Konfiguration an C5 durch Oxidoreduktion und Einführung der Azidogruppe unter erneuter Inversion. Die Tetrazole **21**, **22** und **23**, die Mannose, Galactose bzw. *N*-Acetyl-glucosamin entsprechen, wurden auf analoge Weise hergestellt.<sup>[67, 68]</sup> Inzwischen haben wir geschützte Glyconolactame durch Umsetzung mit Natriumazid und Trifluormethansulfonsäureanhydrid in einer Stufe in diese und weitere Tetrazole überführt.<sup>[69]</sup>

Diese entschützten Tetrazole liegen in  $D_2O$  tatsächlich als Halbsessel vor. Die Halbsessel- bzw. Sofakonformation wurde für die kristallinen Tetrazole **20** und **21** durch Röntgenstrukturanalysen belegt (Abbildung 3). Diese Tetrazole lassen

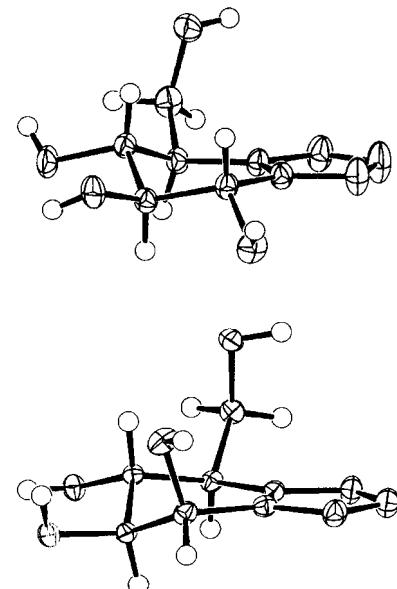


Abbildung 3. Strukturen von **20** (oben) und **21** im Kristall (unten).

sich unzersetzt aufbewahren; in Lösung sind sie im pH-Bereich von 1–14 stabil. Sie hemmen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosidasen etwa gleich stark (Tabelle 3) wie Glucono-1,5-lacton **1** (Tabelle 1) und Mannono-1,5-lacton (1.7  $\mu\text{M}$  bezogen auf Schnecken  $\beta$ -Mannosidase)<sup>[70]</sup>.

Tabelle 3.  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für die *gluco*- und *manno*-Tetrazole **20** bzw. **21**.

Enzym (Herkunft)	<b>20</b>	<b>21</b>
$\alpha$ -Glucosidase (Hefe)	1300	100 000
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	200	–
$\beta$ -Glucosidase ( <i>Agrobacterium faecalis</i> )	1.4	6000
$\beta$ -Galactosidase (Rinderleber)	1.5	14 000
$\alpha$ -Mannosidase (Schwertbohnen)	8500	180
$\alpha$ -Mannosidase (Mandeln)	13 800	700
$\beta$ -Mannosidase (Schnecke)	47 000	160

Um die Frage nach der Konfigurationsselektivität dieser Hemmer zu beantworten, testeten Withers und seine Mitarbeiter die Hemmwirkung der *gluco*- und *manno*-Tetrazole **20** bzw. **21** auf drei Mannosidasen und drei Glucosidasen.<sup>[67]</sup> Jede dieser Glucosidasen und Mannosidasen hydrolysiert sowohl Glucoside als auch Mannoside; allerdings werden die Substrate mit korrekter Konfiguration weit besser umgesetzt, wie durch die ( $V_{\max} K_M^{-1}$ )-Werte quantitativ erfaßt wird. Dementsprechend werden auch alle Enzyme durch beide Tetrazole gehemmt, aber das richtig konfigurierte Tetrazol ist ein bedeutend stärkerer Hemmer als das falsch konfigurierte Isomer. So werden  $\beta$ -Glucosidasen durch **20** stärker gehemmt als durch **21** und die  $\beta$ -Mannosidase besser durch **21** als durch **20**.  $\alpha$ -Glycosidasen werden schwach gehemmt (die Hemmkonstanten liegen nur im millimolaren Bereich); auch hier wird die Konfiguration an C2 erkannt. Dies belegt die Konfigurationsselektivität dieser Glycosidasen und Hemmer.

Die Beantwortung der Frage, ob es sich bei den Tetrazolen um Übergangszustands-Analoga handelt, erschien nun um so dringender, als solche Untersuchungen für Glyconolactone ausstanden. Dazu wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt. Zunächst wurde die freie Aktivierungsenthalpie ( $V_{\max} K_M^{-1}$ ) für jedes Substrat und das entsprechende Enzym mit der freien Bindungsenthalpie für den Inhibitor ( $K_i^{-1}$ ) verglichen (Abbildung 4).<sup>[67]</sup> Die Beschleunigung des

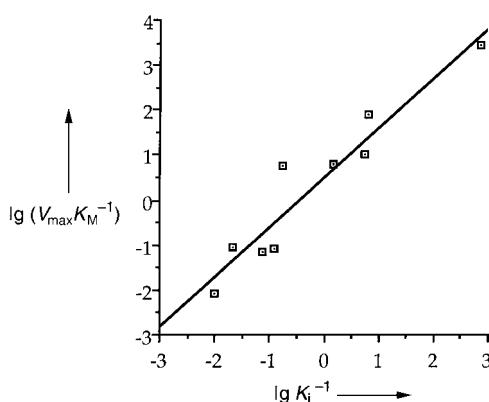


Abbildung 4. Auftragung der Inhibitionskonstanten  $K_i$  der Tetazole gegen die freien Bindungsenthalpien  $V_{\max} K_M^{-1}$  der Substrate.

enzymatischen Umsatzes des Substrats spiegelt die Stabilisierung des Übergangszustands durch das Enzym wider, und diese sollte ihr Gegenstück finden in der Bindung eines Übergangszustands-analogen Hemmers, aber nicht in der Bindung eines Grundzustands-Analogons. Die graphische Auftragung der Meßwerte für die Bindung von Substraten und Hemmern an die Enzyme ist durch eine Steigung von 1.1 und einen Korrelationskoeffizienten  $r=0.9$  gekennzeichnet, wie man es für einen Übergangszustands-analogen Hemmer erwartet, während die  $K_M$ - und ( $V_{\max} K_M^{-1}$ )-Werte nicht miteinander korrelieren. Daß ungeachtet der verschiedenen Glycosidasen eine so gute Korrelation beobachtet wird, muß bedeuten, daß die Tetazole zu einer Eigenschaft der Struktur des Übergangszustands, die diesen Glycosidasen gemeinsam ist, komplementär sind.

Weitere Indizien für den Übergangszustandscharakter der Tetazole ergaben sich aus der Untersuchung einer Mutante der  $\beta$ -Glucosidase aus *Agrobacterium faecalis*, in welcher die Glutaminsäure 358 gegen einen Asparaginsäurerest ausgetauscht wurde.<sup>[71]</sup> Die Glutaminsäure 358 ist das katalytische Nucleophil; seine Rolle ist ausschlaggebend für die Bindung des Übergangszustands, aber nur untergeordnet für die Bindung des Grundzustands. Dementsprechend führt diese Mutation zu einem Abfall der Enzymaktivität um etwa das 10000fache (entsprechend einem  $\Delta\Delta G$ -Wert von ca. 5.6 kcal mol<sup>-1</sup>), während die Bindung des Substrats, also des Grundzustands, nur etwa um das Fünffache ( $\Delta\Delta G \approx 1$  kcal mol<sup>-1</sup>) und jene des Tetrazols um das 200fache ( $\Delta\Delta G \approx 3.2$  kcal mol<sup>-1</sup>) geschwächt wird. Dies belegt und quantifiziert den Charakter des Tetrazols **20** als – wenn auch unvollkommenes – Übergangszustands-Analogon. Dieser Befund läßt sich auf Glyconolactone, Glyconolactame und ihre Oxime übertragen.

Mit diesen Versuchen ist gezeigt, daß die Behauptung, die Konfiguration der Hemmer sei verhältnismäßig unwichtig, nur für Übergangszustands-analoge Hemmer jener Glycosidasen gilt, die selber nicht konfigurationsselektiv sind.

## 2.4. Protonierung der Inhibitoren durch die Glycosidasen?

### 2.4.1. C-Glucosylimidazole

Die von Li et al. und von Field et al. beschriebene Hemmung der Süßmandel- $\beta$ -Glucosidasen durch Imidazole<sup>[72, 73]</sup> legten den Gedanken nahe, daß die Protonierung durch die Glycosidasen für die Aktivität dieser Hemmer tatsächlich von Bedeutung ist. Die Hemmung durch Imidazole ließ sich ohne weiteres auf der Grundlage des allgemein angenommenen Reaktionsmechanismus interpretieren. Imidazole können synergistisch mit einer Säure und einer Base wechselwirken (Abbildung 5a). Demnach sollte das C-Glucosylimidazol **27**,

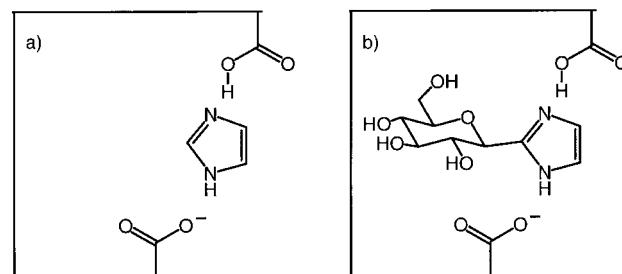
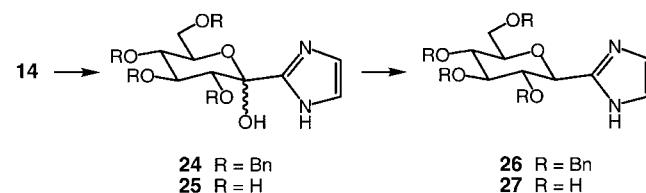


Abbildung 5. Mechanismus der Inhibition von Glycosidasen durch Imidazol (a) und  $\beta$ -D-Glucopyranosylimidazol (b).

bei dem der Imidazolring Kraftfeldrechnungen zufolge mehr oder weniger senkrecht zum Pyranosering steht, in idealer Weise mit der katalytischen Säure und dem katalytischen Nucleophil, die sich auf entgegengesetzten Seiten der gemittelten Ringebene der Pyranose befinden, in Wechselwirkung treten<sup>[74]</sup> (Abbildung 5b).

Die C-Glucosylimidazole **25** und **27** wurden durch Addition eines N-geschützten 2-Lithioimidazols an das Gluconolacton **14**, Reduktion des dabei gebildeten Halbacetals **24** zu den isomeren Diolen, selektive O-Acylierung und basenkatalysierten Ringschluß zu **26** hergestellt.<sup>[74]</sup> Zu unserer Über-



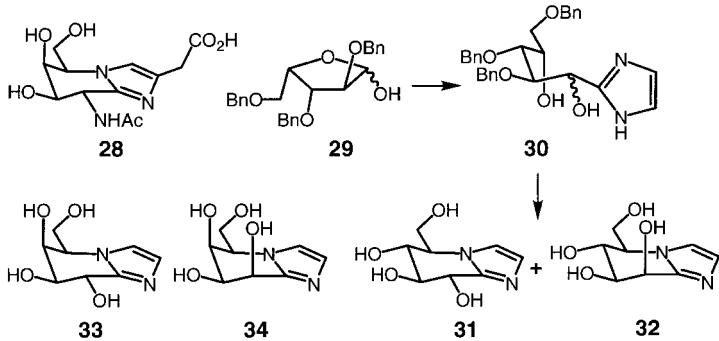
raschung erwiesen sich sowohl das Halbacetal **25** als auch das C-Glycosid **27** als schwache Hemmer der Süßmandel- $\beta$ -Glucosidasen (Tabelle 4). Warum ist das so? Sind konformativ-Gründe ausschlaggebend oder der größere Abstand des basischen Stickstoffatoms vom anomeren Zentrum?<sup>[75, 76]</sup>

Tabelle 4.  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für die C-Glucosylimidazole **25** und **27**.

Enzym (Herkunft)	<b>25</b>	<b>27</b>
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	790	640

### 2.4.2. Anellierte Pyrrole und Imidazole

Während wir uns mit diesen Inhibitoren beschäftigten, veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Aoyagi und Aoyama die Struktur des natürlich vorkommenden Nagstatins **28**, eines sehr starken Hemmers einiger Glycosaminidasen mit einem  $K_i$ -Wert von 4 nm bezogen auf die Schweinenieren-Hexosaminidase.<sup>[77, 78]</sup> Tatsuta et al. synthetisierten die *gluco*-,



*manno*-, *galacto*- und *talo*-Imidazole **31**, **32**, **33** bzw. **34** durch Addition des lithiierten *N*-Tritylimidazols (Trityl = Triphenylmethyl) an geschützte L-Pentofuranosen wie **29** und Ringschluß der dabei gebildeten diastereomeren Diole.<sup>[79-82]</sup> Obwohl die  $IC_{50}$ -Werte dieser Imidazole nicht unter denselben Bedingungen bestimmt wurden wie die  $K_i$ -Werte der Tetrazole, sind die Imidazole doch deutlich stärkere  $\beta$ -Glycosidasehemmer, während sie  $\alpha$ -Glycosidasen nur schwach hemmen (Tabelle 5). Die Hemmwirkung von Nagstatin hängt also hauptsächlich mit dem Imidazolring und nicht mit dem Carboxymethylsubstituenten zusammen.

Tabelle 5.  $IC_{50}$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für die anellierte Imidazole **31**–**33**.<sup>[a]</sup>

Enzym (Herkunft)	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>
$\alpha$ -Glucosidase (Bäckerhefe)	105	> 500	> 500
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	0.7	17.5	0.5
$\beta$ -Mannosidase (Schnecke)	300	0.11	370
$\beta$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )	> 500	> 500	0.008

[a] Die in  $\mu\text{g mL}^{-1}$  angegebenen Werte aus Lit. [80] wurden in die Einheit  $\mu\text{M}$  umgerechnet.

Das Tetrazol **20** und das Imidazol **31** haben eine sehr ähnliche Struktur; also sollte das Imidazol ebenfalls ein Übergangszustands-Analogon sein. Übergangszustands-Analoga sollten aber auf gleiche Weise protoniert werden wie das Substrat auf dem Weg zum Übergangszustand. Der Koshland-Phillips-Vernon-Mechanismus impliziert, daß ein Proton von der katalytischen Säure in der  $\pi$ -Ebene des Azolrings übertragen wird. Dies müßte zu einer C-Protonierung des Imidazols (allerdings kaum des Tetrazols) und zum Verlust der Aromatizität führen (Abbildung 6), wie es bei der Histidin-Ammoniak-Lyase der Fall ist.<sup>[83, 84]</sup> Wäre dem so, dann müßte das analoge Pyrrol ein stärkerer Hemmer sein als das Imidazol.

Die Pyrrole **39** und **40** wurden ausgehend vom Gluconolactam **17** synthetisiert, das sich so erneut als vielseitiges Zwischenprodukt bewährte. Der Schlüsselschritt ist die 1,3-dipolare Cycloaddition des Münchnons **36** an Propiolsäuremethylester.<sup>[85]</sup> Die Alkylierung des Lactams **17** mit Iodessig-

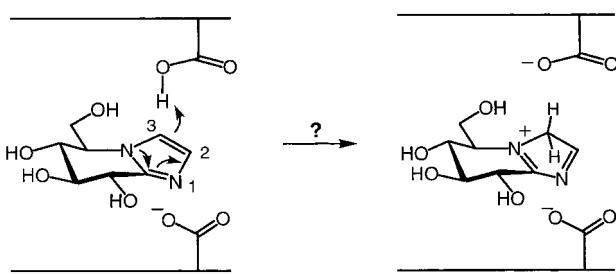
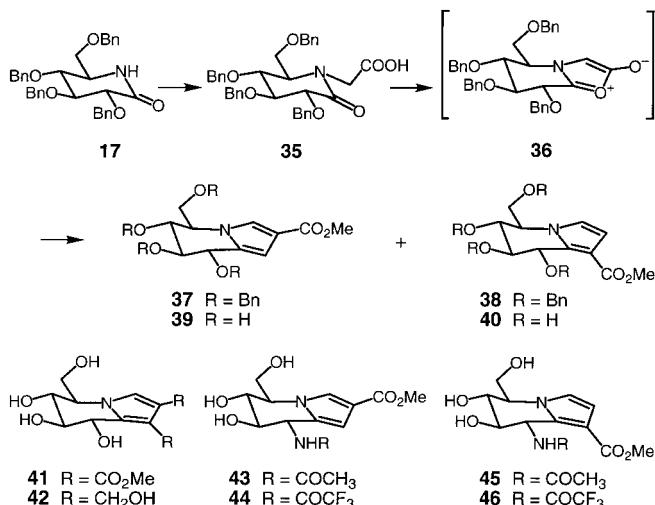


Abbildung 6. Übertragung des Mechanismus von Koshland<sup>[23]</sup> auf die Inhibition von Glycosidasen durch das anellierte *gluco*-Imidazol **31**.



säureethylester, Verseifung und Dehydratisierung des substituierten Glycins **35** in Gegenwart des Propiolsäureesters führten in guten Ausbeuten zu den regiosomeren Estern **39** und **40**. Die entschützten Pyrrole nehmen in Lösung wie im Kristall die Halbesselkonformation ein (Abbildung 7), sind aber wiederum sehr schwache Hemmer, wie auch der analoge Diester **41** und das Diol **42** (Tabelle 6), die durch Cycloaddi-

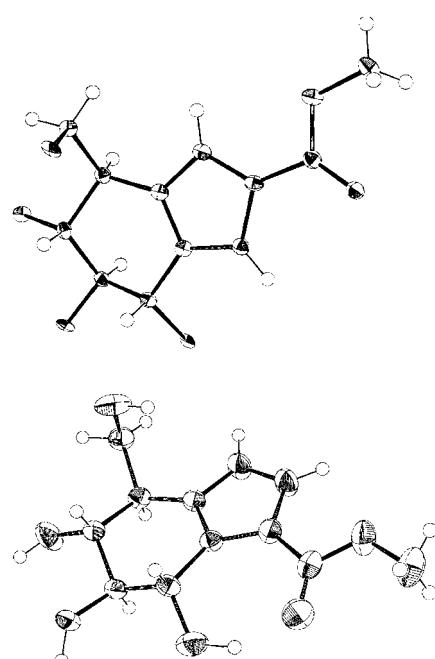


Abbildung 7. Strukturen von **39** (oben) und **40** im Kristall (unten).

Tabelle 6.  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für die von Glucose abgeleiteten anellierten Pyrrole **39–42**.

Enzym (Herkunft)	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	6000	300	25000	14000

tion von **36** an Acetylendicarbonsäuredimethylester erhalten wurden. Zur Herstellung der analogen Pyrrole **43–46**, die sich von *N*-Acetylglucosamin bzw. *N*-Trifluoracetylglucosamin ableiten, setzten wir **37** und **38** mit  $\text{Me}_3\text{SiN}_3$  und einer Lewis-Säure um; dabei wurde die Azidogruppe durch regioselektive Eliminierung und Addition an das intermediär gebildete Azoniafulven eingeführt.<sup>[86]</sup> Die *N*-acetylierten Pyrrolerivate sind mäßig starke Hemmer der Rinder- $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminidase, ihre Hemmwirkung ist aber wiederum deutlich schwächer als die der entsprechenden Tetrazole (Tabelle 7).

Tabelle 7.  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für die von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) abgeleiteten anellierten Pyrrole **43–46** sowie das Tetrazol **23**.

Enzym (Herkunft)	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>23</b>
$\beta$ -Glucosaminidase (Rinderniere)	19	10	20	13	0.2

### 3. Eine veränderte Hypothese: Protonierung in der Ringebene

Diese Ergebnisse ließen sich mit der Hypothese, wonach die Protonierung des Inhibitors eine wichtige Rolle spielt, nur durch das Postulat in Einklang bringen, daß die Protonierung des Substrates und der Übergangszustands-analogen Hemmer anders abläuft, als bisher angenommen wurde. Gemäß der ursprünglichen Interpretation der Röntgenstrukturanalyse von Lysozym befinden sich die beiden katalytisch wirkenden Carboxygruppen „on each side of the centre of formal substitution“,<sup>[24, 87]</sup> d.h., die katalytische Säure/Base ist oberhalb der gemittelten Ebene des Pyranoseringes und das Nucleophil unterhalb dieser Ebene, wie es in Abbildung 1a gezeigt ist. Diese Interpretation wurde stillschweigend verallgemeinert und auch für andere  $\beta$ -Glycosidasen als gültig erachtet.<sup>[88]</sup>

Das glycosidische Sauerstoffatom hat zwei nichtbindende, doppelt besetzte Orbitale, über die es mit einem Protonendonator in Wechselwirkung treten kann. In der bevorzugten Konformation, die mit dem *exo*-anomeren Effekt<sup>[89]</sup> erklärt wird, liegt eines der Orbitale ungefähr in der Ringebene und das andere senkrecht zu ihr (Abbildung 8a). Alle Inhibitoren vom Lactontyp haben ein Heteroatom, das dem glycosidischen Sauerstoffatom des Substrats entspricht. Dieses Heteroatom weist nur ein besetztes, protonierbares Orbital in der Ringebene auf. Da somit die Protonenübertragung auf das Tetrazol **20** und verwandte Hemmer vom Lactontyp nur in der Ringebene erfolgen kann, muß dasselbe auch für das Substrat gelten, d.h., der Protonendonator muß sich in der Nähe der gemittelten Ringebene<sup>[90]</sup> befinden und nicht senkrecht zu ihr (Abbildung 8b, c). Damit liegt die katalytische Säure viel näher beim katalytischen Nucleophil, als es bei einer Anordnung auf einander entgegengesetzten Seiten möglich wäre; dies stimmt mit dem Einfluß der Bildung des intermediären

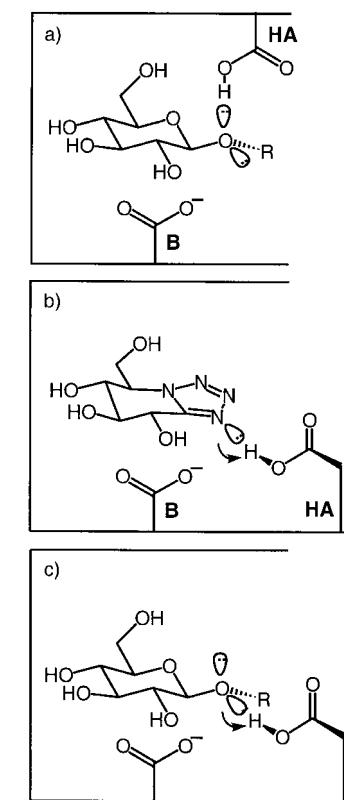
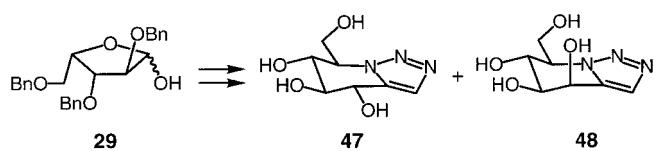


Abbildung 8. Vorgeschlagene Protonierungsrichtungen: a) Protonierung eines Glucosids senkrecht zur Ringebene, b) und c) Protonierung von *gluco*-Tetrazol **20** bzw. eines Glucosids in der Ringebene.

Enzym-Glycosylesters auf den  $pK_a$ -Wert der katalytischen Säure überein.<sup>[91]</sup>

#### 3.1. Synthese anellierter 1,2,3-Triazole

Zur Überprüfung der Hypothese einer Protonierung in der Ringebene wollten wir die Hemmung von  $\beta$ -Glycosidasen durch das Tetrazol **20** mit jener durch das analoge 1,2,3-Triazol **47** vergleichen. Das 1,2,3-Triazol sollte eine dem



Tetrazol **20** sehr ähnliche Struktur aufweisen und dennoch einer analogen Protonenübertragung nicht zugänglich sein, da sich an der dem glycosidischen Sauerstoffatom entsprechenden Position eine Methingruppe befindet.

Die *gluco*- und *manno*-1,2,3-Triazole **47** bzw. **48** erhielten wir durch intramolekulare 1,3-dipolare Cycloaddition von Azidoalkinen, die aus der Tri-*O*-benzyl-L-xylose **29** durch Addition eines Ceracetylids, regioselektive Benzylierung und Einführung der Azidogruppe an C5 leicht zugänglich waren.<sup>[92]</sup> Die benzylierten *gluco*- und *manno*-1,2,3-Triazole ließen sich problemlos voneinander trennen und dann entschützen.

Die Konformation dieser Triazole in Lösung (und für **47** auch im Kristall) ähnelt stark jener der analogen Tetrazole (Abbildung 9), aber ihre Hemmstärken unterscheiden sich

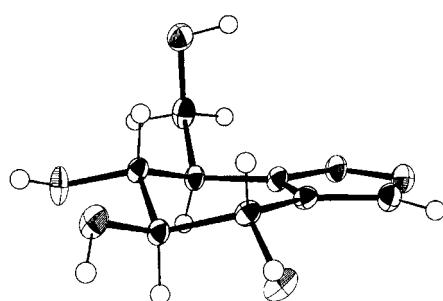


Abbildung 9. Struktur von **47** im Kristall.

drastisch voneinander (Tabelle 8). Das Triazol **47** ist auch in einer Konzentration von 8 mM inaktiv gegen die  $\beta$ -Glycosidasen aus Süßmandeln und aus Rinderleber und hemmt die  $\beta$ -Glucosidase aus *C. saccharolyticum* 400mal schlechter als das Tetrazol **20**. Das *manno*-Triazol **48** ist in einer Konzentration von 8 mM unwirksam gegen Schnecken- $\beta$ -Mannosidase. Dies entspricht einem Verlust von 3.3 bis 5.0 kcal mol<sup>-1</sup> an Bindungsenergie, in bester Übereinstimmung mit der Hypothese der lateralen Protonierung am N1-Atom des Tetrazols **20**.

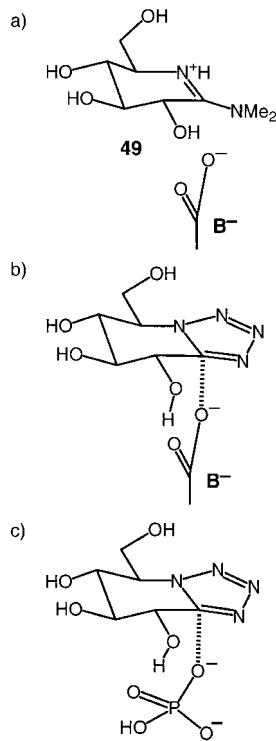


Abbildung 10. Die Ladungs-Ladungs- und Ladungs-Dipol-Wechselwirkung in  $\beta$ -Glycosidasen zwischen dem katalytischen Nucleophil und a) dem Ammonium-Ion **49** oder b) dem *gluco*-Tetrazol **20** bzw. c) in Glycogenphosphorylase b zwischen dem katalytischen Nucleophil und dem *gluco*-Tetrazol **20**.

Tabelle 8. IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] für die *gluco*- und *manno*-Tetrazole **20** bzw. **21** sowie die *gluco*- und *manno*-1,2,3-Triazole **47** bzw. **48**.

Enzym (Herkunft)	<b>20</b>	<b>47</b>	<b>21</b>	<b>48</b>
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	200	> 8000	–	–
$\beta$ -Glucosidase ( <i>Caldocellum saccharolyticum</i> )	5	2000	–	–
$\beta$ -Mannosidase (Schnecke)	–	–	150	> 8000
$\beta$ -Galactosidase (Rinderleber)	1.5	> 8000	–	–

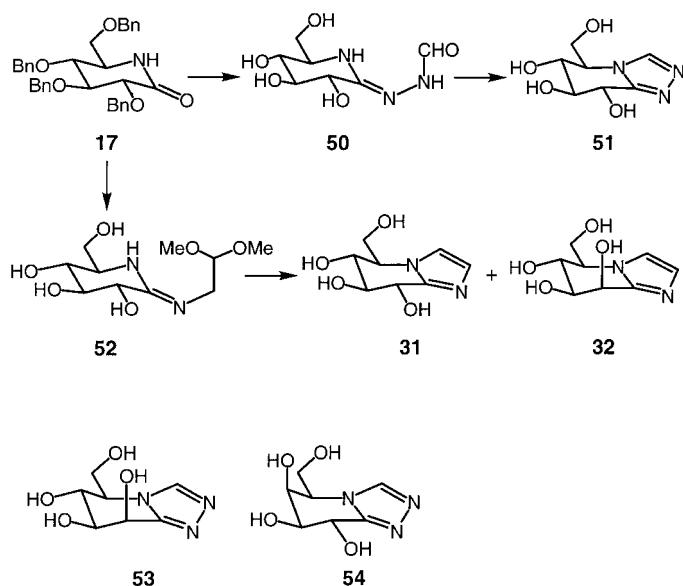
(Abbildung 10b). Dies erinnert an die von Reese et al.<sup>[39]</sup> formulierte Erklärung der Hemmwirkung von Glyconolactonen durch die Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen katalytischen Nucleophil und dem Dipol der Carbonylgruppe. Eine solche Ladungs-Dipol-Wechselwirkung könnte die stärkere Hemmung durch das elektrophilere Tetrazol im Vergleich zu der des Triazols ebenfalls erklären.

Die Bedeutung dieser Ladungs-Dipol-Wechselwirkung sollte sich durch eine systematische Abwandlung der Zahl und der Position der Stickstoffatome im Azolring klären lassen. Wenn die „laterale“ Protonierung in der Ringebene den Ausschlag gibt, dann sollten Hemmstärke und Basizität der Azole einander entsprechen. Die Hemmstärke muß dann in der Reihe Tetrazole < 1,2,4-Triazole < Imidazole zunehmen. Wenn aber die Ladungs-Dipol-Wechselwirkung entscheidend sein sollte, dann müßten die Tetrazole die stärksten und die Imidazole die schwächsten Hemmer sein. Nun sind aber diese beiden Faktoren – Protonierung und Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil – nicht unabhängig voneinander. Die fortschreitende Übertragung eines Protons auf das Azol führt theoretisch letztlich zu einem Azoliumkation und damit zu einer Salzbrücke und einer Ladungs-Ladungs-Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil, die stärker sein sollte als eine Ladungs-Dipol-Wechselwirkung. Der erwartete geringe Unterschied im  $pK_a$ -Wert zwischen der katalytischen Säure und den Imidazolen spricht allerdings gegen eine vollständige Protonenübertragung, selbst unter Berücksichtigung günstiger entropischer Effekte.<sup>[93, 94]</sup> Um den Beitrag einer Ladungs-Dipol-Wechselwirkung unabhängig von einer (partiellen) Protonenübertragung ermessen zu können, wollten wir auf die bekannte Wechselwirkung von Hydrogen- oder Dihydrogenphosphat-Ionen mit dem Tetrazol **20** im aktiven Zentrum von Glycogenphosphorylase b<sup>[95]</sup> zurückgreifen (Abbildung 10c), die keine katalytisch aktive Säuregruppe hat.<sup>[96, 97]</sup> Bevor wir auf diese Untersuchungen eingehen, möchten wir die Hemmung der  $\beta$ -Glycosidasen durch die verschiedenen Azole erörtern.

### 3.3. Anellierte 1,2,4-Triazole und Imidazole: Synthese und Hemmwirkung

Wie weiter oben erwähnt wurde (siehe Abschnitt 2.4.2), ist die Hemmung durch das Imidazol **31**<sup>[79]</sup> und das Tetrazol **20** unter verschiedenen Bedingungen gemessen worden. Um einen fundierten Vergleich zu ermöglichen, arbeiteten wir eine neue Synthese der Imidazole **31** und **32** sowie der 1,2,4-Triazole **51** und **53** aus.

Wir griffen wiederum auf das Gluconolactam **17** als fortgeschrittenes vielseitiges Zwischenprodukt zurück. Seine



Umwandlung in das Thiolactam **18**, Kondensation mit *N*-Formylhydrazin, Ringschluß unter sauren Bedingungen und Abspaltung der Schutzgruppen lieferten in 49 % Gesamtausbeute das 1,2,4-Triazol **51**.<sup>[98]</sup> Die Verwendung von Aminoacetaldehyddimethylacetal anstelle von Formylhydrazin führte zum Amidin **52**, das unter sauren Bedingungen cyclisierte und schließlich die *gluco*- und *manno*-Imidazole **31** bzw. **32** ergab.<sup>[96]</sup> Auf analoge Weise stellten wir das *galacto*-Imidazol **33** (siehe Abschnitt 2.4.2) in 60 % Ausbeute aus dem benzylierten Galactono-1,5-lactam her.<sup>[99]</sup> Diese 1,2,4-Triazole und Imidazole haben in Lösung eine sehr ähnliche Konformation wie die 1,2,3-Triazole und die Tetrazole; dies gilt auch für das Hydrochlorid von **31** im Kristall (Abbildung 11).

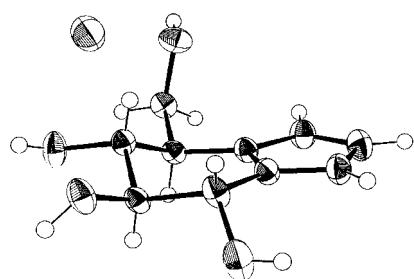


Abbildung 11. Struktur von **31**·HCl im Kristall.

Tatsuta et al. hatten die *manno*- und *galacto*-1,2,4-Triazole **53** (aus 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-L-xylose, 27%) bzw. **54** (aus 2,3,5-

Tri-*O*-benzyl-L-ribose, 24 %) durch Umsetzung mit lithiierten Azolen hergestellt, die ihnen auch einen schnellen Zugang zu den Imidazolen **31/32** bzw. **33/34** eröffneten.<sup>[100]</sup>

Von den *gluco*-, *manno*- und *galacto*-Azolen erwiesen sich die Imidazole durchwegs als stärkere  $\beta$ -Glycosidasehemmer als die 1,2,4-Triazole, die ihrerseits stärkere Hemmer sind als die Tetrazole. Die in Abbildung 12 angegebenen  $K_i$ -Werte stehen im Einklang mit dem dominanten Einfluß der vorgeschlagenen Protonierung in der Ringebene.

### 3.4. Weitere Aufschlüsse über die Bindung der Inhibitoren an Glycosidasen mit Hilfe der Glycogenphosphorylase

Wie oben erwähnt (siehe Abschnitt 3.2) läßt sich der Beitrag der Ladungs-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Azolen und dem katalytischen Nucleophil  $B^-$  quantitativ am besten durch die Untersuchung von Glycogenphosphory-

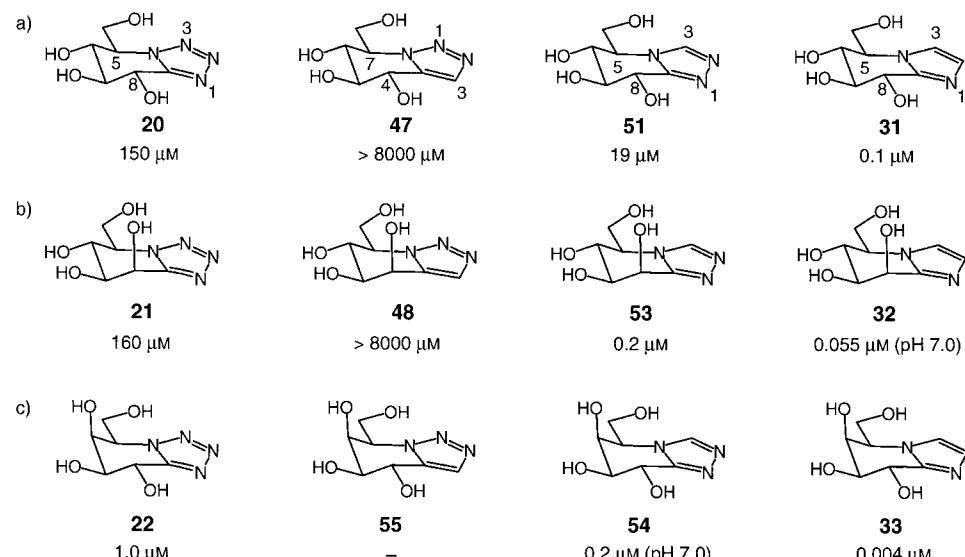


Abbildung 12.  $K_i$ -Werte von *gluco*-, *manno*- und *galacto*-konfigurierten Tetrahydropyridoazolen für die Hemmung von a)  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln, b) Schnecken- $\beta$ -Mannosidase und c)  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*.

lase b (GPb) erfassen. GPb spaltet die  $\alpha$ -glycosidischen Bindungen von Glycogen phosphorolytisch, hat aber im Unterschied zu Glycosidasen keinen katalytisch wirksamen Protonendonator; sowohl die Funktion des katalytischen Nucleophils als auch der katalytischen Säure werden von Hydrogen- oder Dihydrogenphosphat-Ionen übernommen.<sup>[96, 97]</sup> Gemäß einem früheren Befund<sup>[95]</sup> hemmt das Tetrazol **20** GPb in Gegenwart von Phosphat zehnmal stärker als in seiner Abwesenheit. Dazu hatte eine Röntgenstrukturanalyse des Enzym-Phosphat-Tetrazol-Komplexes gezeigt, daß sich das Hydrogen- oder Dihydrogenphosphat-Ion unterhalb der Ringebene des Tetrazols befindet, so daß das proximale Sauerstoffatom 3.1 Å vom „anomeren“ Kohlenstoffatom entfernt ist (siehe Abbildung 10c)<sup>[95]</sup> und mit dem Azolring vermutlich eine Ladungs-Dipol-Wechselwirkung eingeht. Die relative Anordnung des Hydrogen- oder Dihydrogenphosphat-Ions und des Azolrings ähnelt stark der

relativen Anordnung, die man für die katalytisch wirksame nucleophile Carboxylatgruppe der  $\beta$ -Glycosidasen und das anomere Zentrum des Substrats erwartet (siehe Abbildung 1, 10b und 10c). In GPb gibt es jedoch keine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Stickstoffatom des Tetrazols, das dem glycosidischen Sauerstoffatom entspricht. Daher ist GPb eine geeignete Modellverbindung, um die Wechselwirkung zwischen einem Anion, das dem katalytischen Nucleophil entspricht, und dem Tetrazol **20** oder dem 1,2,3-Triazol **47** zu untersuchen, ohne daß die Protonierung des Azols stört.

In Gegenwart von Phosphat wird das 1,2,3-Triazol **47** von GPb zehnmal schwächer gebunden als das Tetrazol **20**, was bei 25°C einem Unterschied von 1.4 kcal mol<sup>-1</sup> an Bindungsenergie entspricht (Tabelle 9). Ein Vergleich der Kristall-

Tabelle 9.  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] für die Hemmung von  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln und Glycogenphosphorylase b (GPb) durch das Tetrazol **20**, das 1,2,4-Triazol **51**, das 1,2,3-Triazol **47** sowie das Imidazol **31**.

Verbindung	$K_i$ ( $\beta$ -Glucosidase), Inhibitionsmodus	$K_i$ (GPb+Phosphat), Inhibitionsmodus	$K_i$ (GPb+Glc-1-P), Inhibitionsmodus
<b>20</b>	150, kompetitiv	53, kompetitiv	700, kompetitiv
<b>51</b>	19, kompetitiv	8100, kompetitiv	keine Inhibition <sup>[a]</sup>
<b>47</b>	>8000, keine Inhibition	540, kompetitiv	2500, kompetitiv
<b>31</b>	0.35, kompetitiv	9700, kompetitiv	keine Inhibition <sup>[a]</sup>

[a] Bei Inhibitorkonzentrationen zwischen 0.1 und 5  $\mu\text{M}$  in Gegenwart von 3 mM Glucose-1-phosphat (Glc-1-P), 1 mM AMP und 1% Glycogen.

strukturen der GPb-Phosphat-Triazol- und GPb-Phosphat-Tetrazol-Komplexe belegt, daß (innerhalb der Auflösungsgrenzen) das Tetrazol **20** und das 1,2,3-Triazol **47** auf gleiche Weise gebunden werden (Abbildung 13). Der Unterschied der

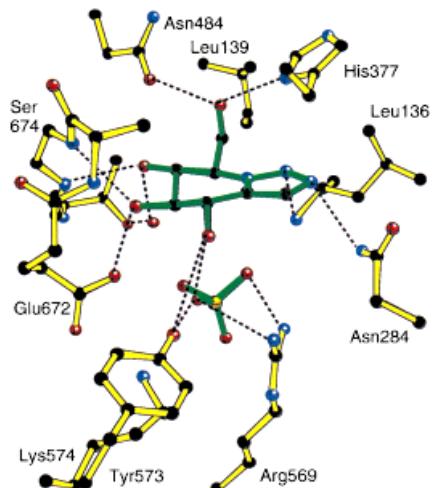


Abbildung 13. Struktur des Komplexes aus GPb, dem 1,2,3-Triazol **47** und Phosphat im Kristall.

Bindungsenergien muß somit wesentlich von der unterschiedlichen Stärke der Wechselwirkung zwischen dem Azol und dem Hydrogen- oder Dihydrogenphosphat-Ion herrühren.<sup>[101]</sup>

Das 1,2,4-Triazol **51** und das Imidazol **31** werden nicht signifikant im aktiven Zentrum von GPb gebunden (Tabelle 9). Wie die Struktur der ternären Komplexe der Tetrazole oder Triazole zeigt, verhindert der Ersatz von N3 des Tetrazols durch eine CH-Gruppe eine Wasserstoffbrück-

kenbindung zu einer NH-Gruppe der Peptidkette (Leu 136) und führt so zu einer Erniedrigung der Bindungsenergie (siehe Abbildung 13). Wir mußten uns bei der Bewertung der Oxyanion-Azol-Wechselwirkung auf die Verbindungen **20** und **47** beschränken.

Der relativ geringe Energieunterschied für die Bindung des Tetrazols **20** und des 1,2,3-Triazols **47** an GPb legt den Schluß nahe, daß die Oxyanion-Azol-Wechselwirkung nicht der Hauptfaktor ist, welcher für den großen Unterschied der Hemmung der  $\beta$ -Glycosidasen durch diese Azole verantwortlich ist. Allerdings wird bei den  $\beta$ -Glycosidasen eine partielle Protonenübertragung auf die Azole deren Elektronegativität erhöhen und damit auch die Wechselwirkung zwischen dem Azol (oder dem Azolium-Kation) und dem Oxyanion, d.h. dem katalytischen Nucleophil; die beiden Wechselwirkungen – Protonierung und Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil – wirken synergistisch, wie es in Abbildung 8b gezeigt ist. Dieses Zusammenspiel macht eine experimentelle Bestimmung des individuellen Beitrags der lateralen Protonierung und der Wechselwirkung mit dem Oxyanion zur Stärke der Hemmung unmöglich. Der experimentell zugängliche Unterschied zwischen der Wechselwirkungen des Triazols **47** und des Tetrazols **20** mit dem aktiven Zentrum von GPb ermöglicht es jedoch, semiempirische Berechnungen (AM1) dieser Wechselwirkungsenergie zu validieren und die Ergebnisse zur Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen den Azolhemmern und dem katalytischen Nucleophil in  $\beta$ -Glycosidasen heranzuziehen.

Die Stärke der Wechselwirkungen zwischen dem Gluconotetrazol **20**, dem 1,2,3-Triazol **47**, dem 1,2,4-Triazol **51** oder dem Imidazol **31** und Hydrogen- oder Dihydrogenphosphat wurde durch Berechnung der Bildungsenthalpien für die Komplexe ermittelt, die bei der Verringerung des Abstandes zwischen dem proximalen Phosphat-Sauerstoffatom und dem „anomeren“ Kohlenstoffatom um je 0.1 Å erhalten werden, um so zu einer Potentialkurve zu gelangen.<sup>[101]</sup> Wie Abbildung 14 zeigt, läuft die Stärke der Oxyanion-Azol-Wechselwirkung mit Hydrogen- oder Dihydrogenphosphat parallel zur Zahl der Stickstoffatome im Azolring (d.h., sie hängt umgekehrt proportional von der LUMO-Energie ab). Der aus den  $\Delta K_i$ -Werten berechnete Energieunterschied für die Phosphat-Tetrazol- und Phosphat-Triazol-Wechselwirkung in GPb (1.4 kcal mol<sup>-1</sup>) und die Ergebnisse der Kristallstrukturbestimmung stimmen mit dem berechneten Unterschied der Energieminima ( $\Delta E_{\min}$ ) von 1.1 kcal mol<sup>-1</sup> und der geometrischen Anordnung für die Wechselwirkung mit Dihydrogenphosphat überein, aber kaum für die mit Hydrogenphosphat. Angesichts dieser guten Übereinstimmung berechneten wir auch die Bildungsenthalpien der Azol-Carboxylat-Komplexe, wobei wir die zur Bildung der wichtigen H-Brücke zwischen dem katalytischen Nucleophil und der OH-Gruppe an C2<sup>[102]</sup> erforderliche Konformation dieser Gruppe aufrechterhielten. Wir fanden eine ähnliche Abhängigkeit der Wechselwirkungsenergie von der Zahl der N-Atome der Azole wie zuvor (Abbildung 14), mit einem berechneten Energieunterschied von 2.0 kcal mol<sup>-1</sup> für die Komplexe mit dem Tetrazol **20** und dem 1,2,3-Triazol **47**. Dies ist zu vergleichen mit einem experimentell ermittelten Energieunterschied für die Bindung von **20** oder **47** an die in Tabelle 8 aufgeführten  $\beta$ -

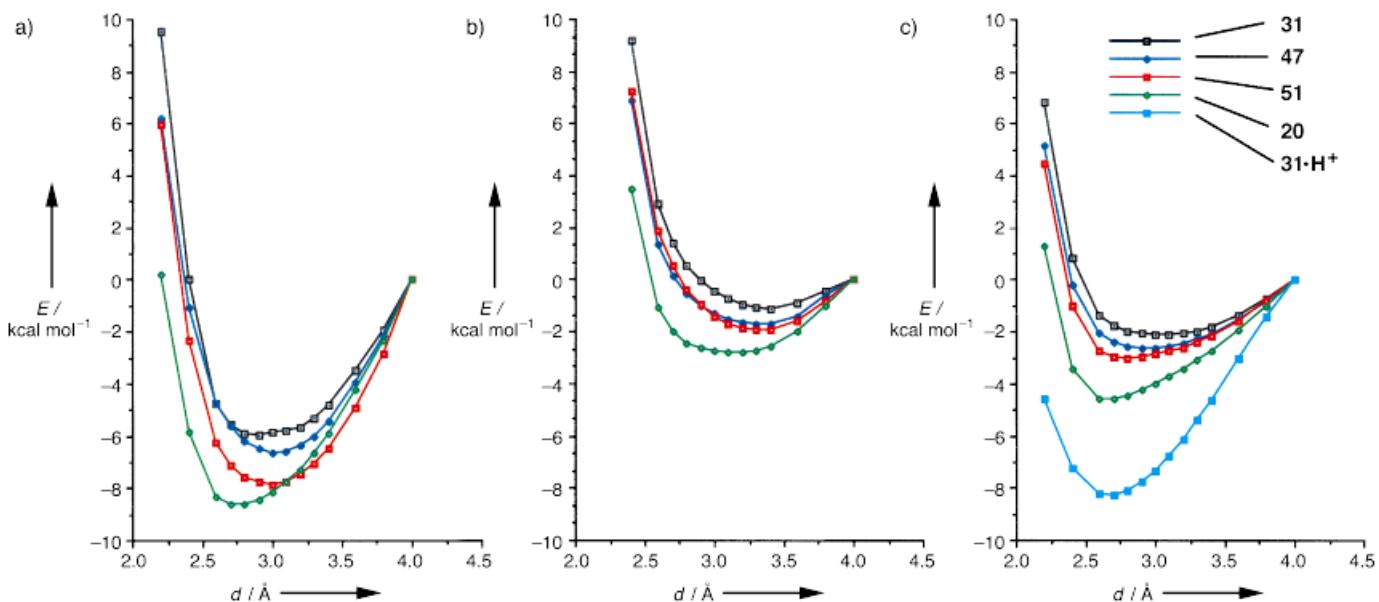


Abbildung 14. Ergebnisse der AM1-Rechnungen: Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie  $E$  gegen den Abstand  $d$  zwischen dem O-Atom von a)  $\text{HPO}_4^{2-}$ , b)  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  sowie c)  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$  und dem „anomeren“ C-Atom der Azol-Inhibitoren **20**, **31**, **47** und **51**.

Glycosidasen von wenigstens<sup>[103]</sup> 2.4 bis 5.3  $\text{kcal mol}^{-1}$ . Dies besagt, daß die Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil nur etwa zur Hälfte zur Bindungsenergie beiträgt; die andere Hälfte muß auf der Wechselwirkung mit der katalytischen Säure beruhen.

Die Stärke der berechneten Azol-Oxyanion-Wechselwirkung verläuft zwar gleichsinnig mit der Hemmung von GPb, aber gegenläufig zur Hemmung der  $\beta$ -Glycosidasen. In Übereinstimmung mit dem Synergismus der Wechselwirkungen mit der katalytischen Säure und dem katalytischen Nucleophil zeigen die Ergebnisse der Rechnungen, daß die Protonierung des Imidazols **31** zu einer drastischen Verstärkung der Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil um bis zu 6  $\text{kcal mol}^{-1}$  führt.

### 3.5. Erkenntnisse aus Kristallstrukturen und Modellierung

#### 3.5.1. Protonierung in der Ringebene

Die Hypothese einer Protonenübertragung in der Ringebene wurde zunächst dadurch überprüft, daß wir die *gluco*- und *galacto*-Tetrazole **20** bzw. **22** in das aktive Zentrum der drei konfigurationserhaltenden Glycosidasen einpaßten („dockten“), die durch eine Röntgenstrukturanalyse charakterisiert waren.<sup>[92]</sup> Das korrekte Andocken der Hemmer wurde durch zwei Aspekte erleichtert. Zum einen spalten Exoglycosidasen terminale Glycosidreste vom reduzierenden Ende eines Glycosids oder Oligosaccharids her; die zu spaltende glycosidische Bindung muß also der Öffnung der Bindungstasche zugekehrt sein. Sodann muß sich das katalytische Nucleophil auf der  $\alpha$ -Seite des Pyranoseringes befinden, ca. 3 Å unterhalb des anomeren Zentrums, um so das entstehende Oxycarbenium-Ion zu stabilisieren.

Gemäß der auf der Aminosäuresequenz beruhenden Klassifizierung der Glycosidasen nach Henrissat<sup>[51, 52]</sup> gehören

die  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* (Familie 2),<sup>[104]</sup> die cyanogene  $\beta$ -Glucosidase aus Weißklee<sup>[105]</sup> und die 6-Phospho- $\beta$ -galactosidase aus *L. lactis*<sup>[106]</sup> (beide Familie 1) zu zwei verschiedenen Familien, weisen aber eine sehr ähnliche Anordnung von polaren und hydrophoben Seitenketten in ihren aktiven Zentren auf. Zusätzliche, für das Andocken von Hemmern in diesen Glycosidasen relevante Informationen stammen aus der von White et al. bestimmten Struktur einer Cellulase aus *Cellulomonas fimi*.<sup>[107]</sup> Es handelt sich zwar um eine Endoglycosidase der Familie 10, aber die Anordnung ihrer für die Erkennung des Pyranoseringes und für die Katalyse verantwortlichen Aminosäure-Seitenketten ähnelt stark der im aktiven Zentrum der oben genannten drei Glycosidasen. Im untersuchten Kristall der *C. fimi*-Cellulase ist das katalytische Nucleophil kovalent an eine 2-Desoxy-2-fluorcellobiosyl-Einheit gebunden (Abbildung 15), in Übereinstimmung mit der seit geraumer Zeit vorgebrachten Hypothese, wonach die Hydrolyse zumindest bei einigen Glycosidasen über einen Glycosylester verläuft.<sup>[23, 108]</sup>

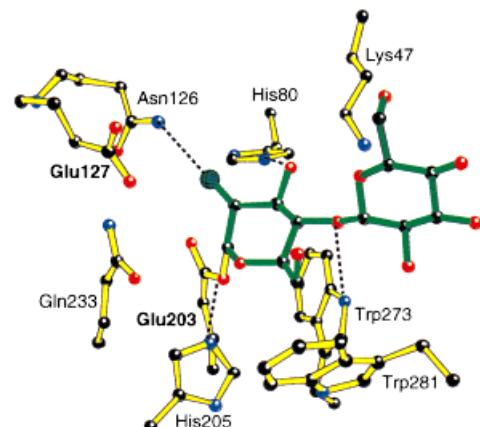


Abbildung 15. Kristallstruktur der Endocellulase aus *C. fimi* (Familie 10), die kovalent an eine 2-Deoxy-2-fluorcellobiosyl-Einheit gebunden ist.<sup>[107]</sup>

Die Strukturen, die durch das manuelle Andocken der Tetrazole **20** oder **22** im aktiven Zentrum der drei Exoglycosidasen erhalten wurden, ähneln einander auf bemerkenswerte Weise (Abbildung 16 a–c).<sup>[92]</sup> Eine Energieminimierung mit festen Enzymkoordinaten, die von der durch

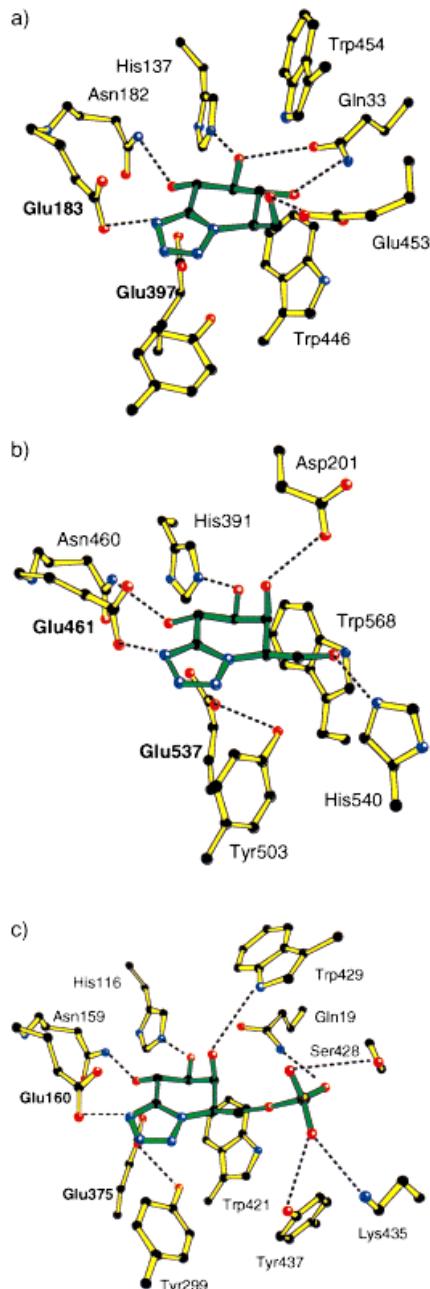


Abbildung 16. Modellierte Strukturen der Komplexe a) aus *E.-coli*- $\beta$ -Galactosidase (Familie 2) und dem galacto-Tetrazol **22**, b) aus Weißklee- $\beta$ -Glucosidase (Familie 1) und dem gluco-Tetrazol **20** und c) aus *L.-lactis*-6-Phospho- $\beta$ -galactosidase (Familie 1) und einer phosphorylierten Form des galacto-Tetrazols **22**.<sup>[92]</sup>

manuelles Andocken erhaltenen Struktur dieser Komplexe ausging, legt den Schluß nahe, daß die Inhibitoren optimal angeordnet sind. Man findet potentielle Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem glycosidischen Heteroatom und der Carboxygruppe der konservierten katalytischen Säure

Glu, zwischen HO-C2 und dem konservierten Asn, das in der Sequenz vor dem katalytischen Säurerest liegt, und zwischen HO-C3 und einem konservierten His. Die Modelle weisen ferner auf eine hydrophobe Stapelwechselwirkung auf der  $\alpha$ -Seite zwischen dem Pyranosering und einem konservierten Trp hin, wie es für kohlenhydratbindende Enzyme typisch ist.<sup>[109]</sup> Die unausweichliche Schlußfolgerung ist die, daß der katalytische Protonendonator sich tatsächlich in der Nähe der gemittelten Ringebene befindet; eine Drehung des Inhibitors oder eine Verschiebung des katalytischen Protonendonors in der Weise, daß die Protonierung senkrecht zur Ringebene erfolgen kann, läßt sich nicht sinnvoll durchführen. Sakon et al. haben die Kristallstruktur einer Endocellulase der Familie 5 mit einer Cellotetraose im aktiven Zentrum bestimmt und dort wiederum eine sehr ähnliche Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen festgestellt (Abbildung 17 a).<sup>[110]</sup> Diese Autoren bemerkten, daß die Anordnung der katalytischen Gruppen um

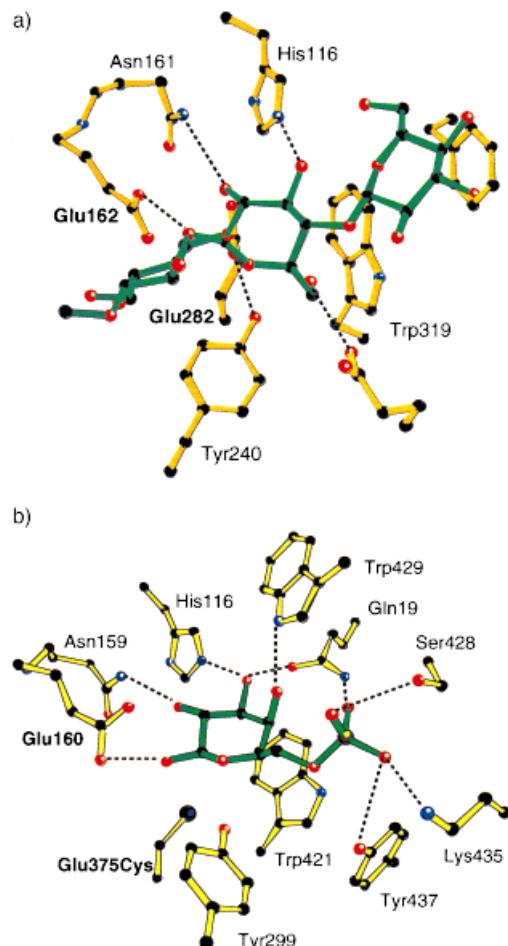


Abbildung 17. Kristallstrukturen der Komplexe a) aus *A.-cellulolyticus*-Endocellulase (Familie 5) und ihrem Substrat<sup>[110]</sup> und b) aus *L.-lactis*-6-Phospho- $\beta$ -galactosidase (Familie 1) und dem Reaktionsprodukt.<sup>[111]</sup>

die zu spaltende Bindung dem „Lehrbuchparadigma“ widerspreche, da sie nicht auf entgegengesetzten Seiten der Ringebene des Glycons angeordnet sind, sondern vielmehr der Protonendonator in der Nähe der Ebene des Pyranosering und in der Nähe des katalytischen Nucleophils liegt. An-

schließend haben Wiesmann et al.<sup>[111]</sup> die Kristallstruktur des Komplexes zwischen einer Mutante der 6-Phospho- $\beta$ -galactosidase und 6-Phosphogalactose bestimmt (Abbildung 17b), die alle Wechselwirkungen bestätigt, die wir in unserem Inhibitormodell vorgeschlagen hatten,<sup>[92]</sup> und wiederum zeigt, daß der Protonendonor in der Nähe der Ringebene liegt.

### 3.5.2. Allgemeingültigkeit der Protonierung in der Ringebene – Klassifizierung von Glycosidasen auf der Grundlage der syn- oder anti-Protonierungsrichtung

Die Protonierung in der Ringebene schien nun recht gut belegt zu sein, zumindest für die von uns untersuchten  $\beta$ -Glycosidasen. Dies wirft die Frage auf, ob die Protonierung in

der Ringebene eine charakteristische Eigenschaft aller Glycosidasen ist.

Wir kennen heute viele Kristallstrukturen von Komplexen aus konfigurationserhaltenden  $\beta$ -Glycosidasen und deren Substraten, Reaktionsprodukten oder Hemmern.<sup>[104, 105, 107, 110–144]</sup> In allen Komplexen liegt der Protonendonor in der Nähe der gemittelten Ebene des Pyranoseringes von Substrat oder Inhibitor (Tabelle 10). Nach diesen Strukturdaten gibt es zwei Typen von Glycosidasehemmern. Bezogen auf die durch die Atome O1, C1 und H1 aufgespannte Ebene ist der Protonendonor im ersten Typ *anti*-ständig zum Sauerstoffatom des Pyranosering (d.h. zur (C5)O-C1-Bindung), wie es in den oben beschriebenen Strukturen der Fall ist (Abbildung 18a). Dies entspricht der Orientierung eines der beiden

Tabelle 10. Klassifizierung der Glycosylhydrolasen nach ihrer Protonierungsrichtung (*anti*- oder *syn*-ständig).

Enzym	Herkunft	Konfiguration <sup>[e]</sup>	Familie	PDB-Code	Ligand	Säure/Base <sup>[a]</sup>	Nucleophil <sup>[a]</sup>	Lit.
<i>anti</i> -Protonierer								
6-Phospho- $\beta$ -galactosidase	<i>Lactococcus lactis</i>	$\beta$ - $\beta$	1	4pbg	Produkt	Glu160	Glu375	[111]
Myrosinase	<i>Sinalpa albis</i>	$\beta$ - $\beta$	1	2myr	2-F-Glycosyl <sup>[f]</sup>	Gln187 <sup>[b]</sup>	Glu409	[112]
Cellulase C	<i>Clostridium thermocellum</i>	$\beta$ - $\beta$	5	1cen	Produkt	Glu140	Glu280	[113]
Cellulase	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	$\beta$ - $\beta$	5	1ece	Substrat	Glu162	Glu282	[110]
Cellulase	<i>Bacillus agaradherans</i>	$\beta$ - $\beta$	5	–	2-F-Glycosyl	?	?	
Cellulase	<i>Cellulomonas fimi</i>	$\beta$ - $\beta$	10	1exp	2-F-Glycosyl	Glu127	Glu233	[107]
Amylase I	Schweinebauchspeicheldrüse	$\alpha$ - $\alpha$	13	1ppi	Acarbose	Glu233	Asp197	[114]
Amylase II	Schweinebauchspeicheldrüse	$\alpha$ - $\alpha$	13	1ose	Acarbose	Glu233	Asp197	[115]
Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	$\alpha$ - $\alpha$	13	7taa	Acarbose	Glu230	Asp206	[116]
CGTase	<i>Bacillus circulans</i>	$\alpha$ - $\alpha$	13	1cwg	Acarbose	Glu257	Asp229	[117]
Chitobiase	<i>Serratia marcescens</i>	$\beta$ - $\beta$	20	1qbb	Produkt	Glu540	– <sup>[c]</sup>	[118]
<i>anti</i> -Protonierer (aufgrund von Homologien in den Aminosäuresequenzen)								
$\beta$ -Glucosidase	Weiße Klee	$\beta$ - $\beta$	1	1cbg	–	Glu183	Glu397	[105]
$\beta$ -Glycosidase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	$\beta$ - $\beta$	1	1gow	–	Glu206	Glu387	[119]
$\beta$ -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	$\beta$ - $\beta$	2	1bgl	–	Glu461	Glu537	[104]
$\beta$ -Glucuronidase	Mensch	$\beta$ - $\beta$	2	1bhg	–	Glu451	Glu540	[120]
Xylanase	<i>Clostridium thermocellum</i>	$\beta$ - $\beta$	10	1xyz	–	Glu645	Glu754	[121]
Xylanase A	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$\beta$ - $\beta$	10	1clx	–	Glu127	Glu246	[122]
<i>syn</i> -Protonierer								
Cellulase	<i>Fusarium oxysporum</i>	$\beta$ - $\beta$	7	1ovw	Thioglycoside	Glu202	Glu197	[123]
Cellulase	<i>Thermonospora fusca</i>	$\beta$ - $\alpha$	9	3tf4, 4tf4	Produkt	Glu424	Asp55, Asp58	[124]
Xylanase	<i>Bacillus circulans</i>	$\beta$ - $\beta$	11	1bcx, 1xnb	Substrat	Glu172	Glu78	[125]
Lysozym	Hühnereiweiß	$\beta$ - $\beta$	22	1lyz, 9lyz	Substrat	Glu35	Asp52	[126]
Lysozym	Gänseweiß	$\beta$ - $\beta$	23	154l	Substrat	Glu73	– <sup>[c]</sup>	[127, 128]
Endoglycanase V	<i>Humicola insolens</i>	$\beta$ - $\alpha$	45	4eng	Produkt	Asp121	Asp10	[130]
<i>syn</i> -Protonierer (aufgrund von Homologien in den Aminosäuresequenzen)								
Cellbiohydrolase I	<i>Trichoderma reesei</i>	$\beta$ - $\beta$	7	1cel	Produkt	Glu217	Glu212	[131]
Endoglycanase	<i>Trichoderma reesei</i>	$\beta$ - $\beta$	7	1eg1	–	Glu201	Glu196	[132]
Cellulase D	<i>Clostridium thermocellum</i>	$\beta$ - $\alpha$	9	1clc	–	Glu555	Asp201	[133]
Xylanase I	<i>Trichoderma reesei</i>	$\beta$ - $\beta$	11	1xyn	–	Glu164	Glu75	[134]
Xylanase II	<i>Trichoderma reesei</i>	$\beta$ - $\beta$	11	1red, 1ree, 1ref	Epoxyalkylglycoside	Glu177	Glu86	[135]
1,3-1,4-Glycanase	<i>Bacillus macerans</i>	$\beta$ - $\beta$	16	1byh, 1gbg	–	Glu109	Glu105	[136]
1,3-1,4-Glycanase	<i>Bacillus macerans</i>	$\beta$ - $\beta$	16	1mac	–	Glu107	Glu103	[137]
Chitinase A	<i>Serratia marcescens</i>	$\beta$ - $\beta$	18	1ctn	–	Glu315	Asp391	[138]
Endochitinase	<i>Hordeum vulgare</i>	$\beta$ - $\alpha$	19	2baa	–	Glu67	Glu89	[139]
Nicht klassifiziert								
Cellbiohydrolase II	<i>Trichoderma reesei</i>	$\beta$ - $\alpha$	6	1cb2	–	Asp221	Asp263	[140]
Cellulase A	<i>Clostridium thermocellum</i>	$\beta$ - $\alpha$	8	1cem	–	Glu95	Asp152	[141]
Xylanase	<i>Streptomyces lividans</i>	$\beta$ - $\beta$	10	1xas <sup>[d]</sup>	–	Glu128	Glu236	[142]
1,3-1,4-Glycanase	<i>Hordeum vulgare</i>	$\beta$ - $\beta$	17	1ghr	–	Glu288, Glu280	Glu232	[143]
Endochitinase H	<i>Streptomyces plicatus</i>	$\beta$ - $\beta$	18	1edt	–	Glu132	Asp130	[144]

[a] Die Zuordnungen von Säure/Base und des Nucleophils wurden aus den angegebenen Publikationen übernommen; in einigen Fällen sind sie nicht eindeutig.

[b] Myrosinase hat keinen katalytischen Protonendonor. Gln187 nimmt dieselbe Position ein wie das isostere, katalytische Glu in anderen Glycosidasen der Familie 1.

[c] Die N-Acetamido-Gruppe des Substrats fungiert als Nucleophil. [d] Die PDB-Datei enthält nur die Koordinaten für das Proteirückgrat. [e] Angegeben ist die Konfiguration am anomeren Zentrum von Substrat und Produkt. [f] Kovalent mit dem Enzym verknüpfter 2-Desoxy-2-fluorglycosylrest. – CGTase = Cyclodextrin-glycosyltransferase.

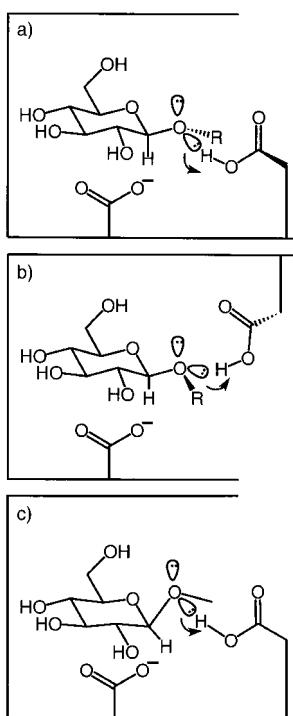


Abbildung 18. a) *anti*-Protonierung und b) *syn*-Protonierung durch eine  $\beta$ -Glycosidase. c) Durch die laterale Protonierung wird die zu spaltende C-O-Bindung in eine pseudoaxiale Orientierung gebracht.

Es überrascht nicht, daß die *anti*- oder *syn*-Protonierungsrichtung mit der Einteilung der Glycosidasen in Familien korreliert, die Henrissat auf der Grundlage der Aminosäuresequenzen vorgenommen hat.<sup>[51, 52]</sup> Die Ähnlichkeit der Strukturen des aktiven Zentrums der Glycosidasen der Familien 1, 2, 5 und 10,<sup>[56, 104, 105, 107, 110, 112, 113, 119, 120, 122]</sup> die alle zum „GH-A-Clan“ gehören, klassifiziert sie als *anti*-Protonierer. Eine ähnliche *anti*-Orientierung findet sich auch in einer Chitobiase der Familie 20;<sup>[118]</sup> *syn*-protonierende Glycosidasen finden sich in den Familien 7, 9, 11, 22, 23 und 45.<sup>[123, 125, 127, 129, 130, 145]</sup>

Keine dieser Protonierungsrichtungen entspricht dem Paradigma von Lysozym, wonach die katalytischen Gruppen „auf entgegengesetzten Seiten“ der zu spaltenden glycosidischen Bindung angeordnet sein sollen.<sup>[24, 25]</sup> Neuere hochauflöste Kristallstrukturen von Enzym-Inhibitor-Komplexen haben jedoch gezeigt, daß Lysozym sein Substrat in der Ringebene protoniert und zum Typ der *syn*-protonierenden Glycosidasen gehört.<sup>[128, 129]</sup> Wir haben kein Beispiel für eine konfigurationserhaltende  $\beta$ -Glycosidase gefunden, in welcher der Protonendonator in Bezug auf die oben definierte Ebene nicht entweder *anti*- oder *syn*-periplanar zum Ringsauerstoffatom angeordnet wäre.

Es ist durchaus sinnvoll, daß die katalytische Carboxygruppe in der Nähe der Ringebene und nicht senkrecht zu ihr angeordnet ist. Die Abspaltung des Aglycons in pseudoaxiale Richtung wäre durch eine senkrecht zur Ringebene angeordnete Carboxygruppe gehindert (Abbildung 18c). Aus stereoelektronischen Betrachtungen, z.B. denen von Des-

doppelt besetzten, nichtbindenden Orbitale am glycosidischen Sauerstoffatom in einer durch den *exo*-anomeren Effekt begünstigten Konformation. Beim zweiten Typ ist der Protonendonator *syn*-ständig zum Sauerstoffatom des Pyranoseringes, was eine Konformation erfordert, die durch den *exo*-anomeren Effekt nicht begünstigt wird (Abbildung 18b). In Tabelle 10 ist eine beträchtliche Zahl von Glycosidasestrukturen aufgeführt, die entweder mit einer *anti*- oder mit einer *syn*-Protonierungsrichtung kompatibel sind. Bei einigen Glycosidasen reicht die Strukturhomologie nicht aus, um sie als *anti*- oder *syn*-Protonierer zu klassifizieren. Diese Klassifizierung würde durch die Kristallstrukturanalyse von entsprechenden Enzym-Ligand-Komplexen bedeutend erleichtert.

longchamps,<sup>[146]</sup> folgt, daß die Protonierung des glycosidischen Sauerstoffatoms auf dem Weg zu einem dem Oxykarbenium-Ion entsprechenden Übergangszustand mit einer Verlängerung der zu spaltenden Bindung in pseudoaxiale Richtung einhergehen muß. Diese Erwartung wird von zwei hochauflösten Kristallstrukturen bestätigt, denen der Cellulinasen aus *Fusarium oxysporum*<sup>[123]</sup> (Familie 7, *syn*-Protonierung; Abbildung 19) und aus *Bacillus agaradherans*<sup>[147]</sup> (Familie 5,

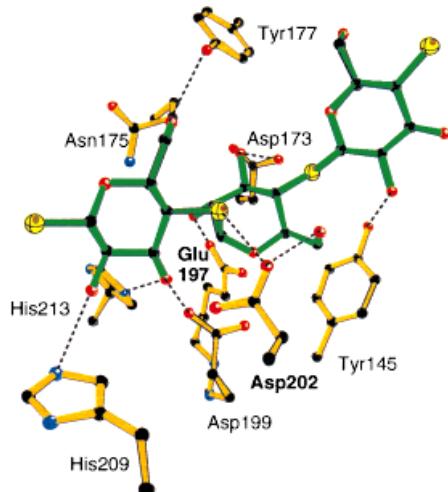


Abbildung 19. Kristallstruktur des Komplexes aus der Cellobiohydrolase aus *F. oxysporum* (Familie 7) und einem Thioglycosid.

*anti*-Protonierung), die beide von Davies bestimmt wurden und die eine Twistkonformation des Pyranoseringes sichtbar machen, in der die glycosidische Bindung pseudoaxial angeordnet ist. Ein ähnlicher Befund von Tews et al.<sup>[148]</sup> bezieht sich auf zwei chitinabbauende Enzyme der Familien 18 und 20. Auch das Wassermolekül, das mit dem intermediär gebildeten Glycosylester reagiert, muß aus einer pseudoaxialen Richtung angegriffen.

Die *anti*- oder *syn*-Protonierungsrichtung liefert ein wichtiges Kriterium für den Strukturentwurf von selektiven Hemmern. Unter den Hemmern vom Lactontyp hat nur das Lacton selber ein nichtbindendes, doppelt besetztes Orbital, das eine Wasserstoffbrückenbindung mit einer *syn*-protonierenden katalytischen Säure bilden kann; eine solche Protonierung ist bei den Hemmern vom Azoltyp und bei Hydroximsäurelactamen nicht möglich; diese sollten selektiv *anti*-protonierende Glycosidasen hemmen. Die Überprüfung dieser Hypothese sowie der Entwurf und die Synthese von selektiven Hemmern von *syn*-protonierenden Glycosidasen sind Gegenstand laufender Untersuchungen.

### 3.5.3. Konfigurationsselektivität

#### 3.5.3.1. Hemmung von $\alpha$ - und $\beta$ -Glycosidasen

Die oben diskutierten Befunde (siehe Abschnitt 3.5.2) zeigen, daß der Übergangszustand durch eine pseudoaxiale Orientierung der zu spaltenden C-O-Bindung und eine Twistkonformation charakterisiert ist. Dies scheint den Indizien zu widersprechen, nach denen Hemmer vom Lactontyp Übergangszustands-Analoga sind, da die Carbonylgruppe, die eine

Wasserstoffbrückenbindung mit der katalytischen Säure bildet, pseudoäquatorial angeordnet ist. Es ist aber unklar, in welchem Ausmaß die partielle Protonierung des Lactons und seiner Analoga sowie die Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil zu einer Umhybridisierung oder zu Konformationsänderungen im aktiven Zentrum des Enzyms führen, so daß das an C1 gebundene Heteroatom sich, wie in Abbildung 18c angegeben, oberhalb der gemittelten Ringebene befindet. Jedenfalls nehmen Lactone leicht eine Boot- oder Twist-Boot-Konformation ein.<sup>[149]</sup> Vermutlich ahmen Hemmer vom Lactontyp Strukturen nach, die einem frühen Abschnitt auf der Reaktionskoordinate entsprechen.

Die aktiven Zentren der konfigurationserhaltenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosidasen weisen eine ähnliche Anordnung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäureseitenketten auf, die für die Erkennung des Pyranoseringes verantwortlich sind, was vermuten läßt, daß der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Enzymklassen auf der Anordnung des katalytischen Nucleophils und der katalytischen Säure beruhen. Aus offensichtlichen Gründen befindet sich das katalytische Nucleophil der konfigurationserhaltenden  $\beta$ -Glycosidasen auf der  $\alpha$ -Seite der Glycoside und jenes der  $\alpha$ -Glycosidasen auf der  $\beta$ -Seite. Wie besprochen befindet sich der Protonendonator der  $\beta$ -Glycosidasen in der Nähe der Ringebene. In  $\alpha$ -Glycosidasen der Familie 13 (anti-protonierend) befindet sich der Protonendonator ebenfalls auf einer Seite der zu spaltenden Bindung, aber in einer Ebene, die sich ca. 1 Å unterhalb der gemittelten Ringebene befindet,<sup>[114, 115, 150]</sup> in Übereinstimmung mit der Lage des  $\alpha$ -glycosidischen Sauerstoffatoms.

Wie in den Abschnitten 3.2, 3.4 und 3.5.1 dargelegt, werden Hemmer vom Lactontyp durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem katalytischen Protonendonator, eine Ladungs-Ladungs- oder Ladungs-Dipol-Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil oder aufgrund einer Kombination dieser Faktoren gebunden. Stark basische, vollständig protonierte Lacton-Analoga wie das Amidin **11** und das Amidazon **12** (siehe Abschnitt 2.2) werden über Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen gebunden, die stark und wenig gerichtet sind, so daß geringfügige Anpassungen der Bindungsgeometrie toleriert werden, in Übereinstimmung mit dem Befund, daß diese Salze sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Glycosidasen hemmen. Im Unterschied dazu korreliert die Selektivität der Hemmung von  $\beta$ - gegenüber  $\alpha$ -Glycosidasen durch neutrale Hemmer vom Lactontyp mit der Richtungsabhängigkeit der Wasserstoffbrückenbindung, die eine optimale Anordnung des „glycosidischen“ Heteroatoms zur katalytischen Säure erfordert. In  $\alpha$ -Glycosidasen begünstigen weder der Abstand zwischen der katalytischen Säure und dem „glycosidischen“ Heteroatom neutraler Hemmer vom Lactontyp noch die Ausrichtung dieser Gruppen die Bildung einer starken Wasserstoffbrückenbindung (Abbildung 20a, b). Läßt sich der energetische Aufwand für die Anpassung an eine Struktur, die eine Hemmung von  $\alpha$ -Glycosidasen durch Hemmer vom Lactontyp ermöglicht, durch Verstärkung der H-Brücke zur katalytischen Säure erbringen, d.h. durch Einsatz eines stärker basischen Lacton-Analogons? Dies scheint der Fall zu sein, da das Hydroximsäurelactam **13** (pK<sub>a</sub>-Wert 4.8–5.2)  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosidasen ähnlich stark hemmt (Abbildung 20c).<sup>[151]</sup> Solche Analoga verdeutlichen

den fließenden Übergang zwischen neutralen Hemmern vom Lactontyp (schwache H-Brücken-Acceptoren) und stark basischen, völlig protonierten Hemmern. Die  $K_i$ -Werte stark basischer Hemmer wie **11** und **13** spiegeln die (partielle?) Desolvatisierung bei der Bindung an das Enzym wider und vermutlich auch die Abwesenheit einer Salzbrücke zur katalytischen Säure. Der ideale Hemmer wird also in Lösung ungeladen und im aktiven Zentrum protoniert vorliegen.

Die wohlbekannte Richtungsabhängigkeit der Stärke einer Salzbrücke<sup>[152]</sup> mag eine Rolle bei der stärkeren Hemmung von  $\alpha$ - gegenüber  $\beta$ -Glycosidasen durch Desoxynojirimycin **4**<sup>[39, 153]</sup> spielen (Tabelle 11). Das Ringstickstoffatom des protonierten Desoxynojirimycins ist in einer günstigen Lage, um mit dem (anionischen) katalytischen Nucleophil von  $\alpha$ -, nicht aber von  $\beta$ -Glycosidasen ein über Wasserstoffbrückenbin-

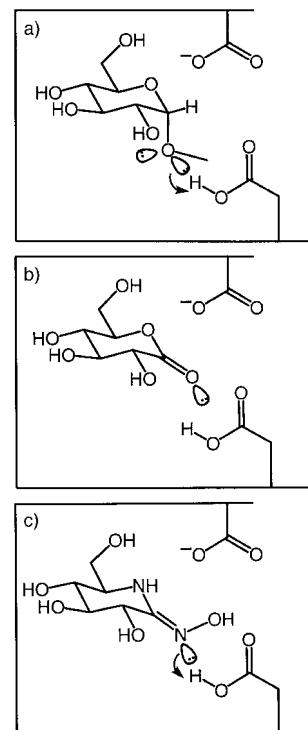


Abbildung 20. Wechselwirkung der katalytischen Säure einer  $\alpha$ -Glycosidase mit a) einem  $\alpha$ -Glycosid, b) dem Gluconolacton **1** und c) dem Lactamoxim **13**.

Tabelle 11. IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] für Desoxynojirimycin **4**, Isofagomin **56**, Azaisofagomin **57**, Desoxygalactostatin **58** sowie galacto-Isofagomin **59**.

Enzym (Herkunft)	<b>4</b>	<b>56</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	<b>59</b>
$\alpha$ -Glucosidase (Bierhefe)	12.6	86	3.9		> 2000
$\beta$ -Glucosidase (Mandeln)	47	0.1	0.65		0.19
$\alpha$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )	–	–	–	0.0016	200
$\beta$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )	–	–	–	0.16	0.012

dungen verknüpftes Ionenpaar zu bilden (Abbildung 21 a, b). Die umgekehrten Verhältnisse gelten für Isofagomin **56**,<sup>[154–156]</sup> bei dem die Lage des protonierten Ringsauerstoffatoms eine Wechselwirkung mit dem katalytischen Nucleophil von  $\beta$ -Glycosidasen stärker begünstigt (Abbildung 21c), wie es in den Hemmkonstanten zum Ausdruck kommt (Tabelle 11). Dies ist im Einklang mit neueren Ergebnissen von Bols et al.,<sup>[157]</sup> wonach das analoge Piperazin **57**, das ein Ringstickstoffatom in beiden Stellungen hat, weniger  $\alpha$ -selektiv ist als Desoxynojirimycin (es hemmt sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Glycosidasen stärker) und weniger  $\beta$ -selektiv als Isofagomin (es hemmt  $\alpha$ -Glycosidasen stärker und  $\beta$ -Glycosidasen schwächer). Die analoge Beziehung zwischen der Lage des Ammoniumzentrums und der Hemmung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galactosidasen findet sich für Desoxygalactostatin **58**<sup>[158]</sup> und galacto-Isofagomin **59**.<sup>[156, 159]</sup> Möglicherweise vermag Calystegin B2,<sup>[160, 161]</sup> je nachdem, wie es an eine Glycosidase

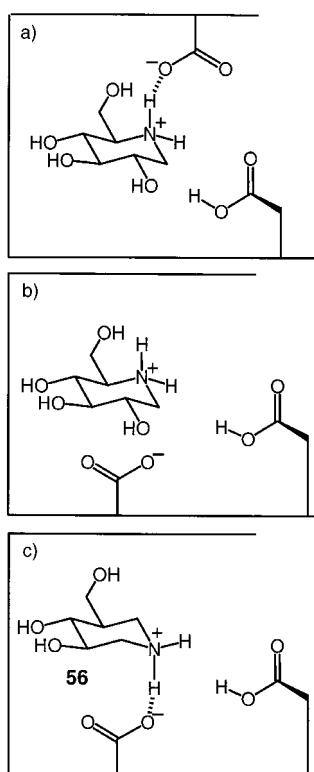
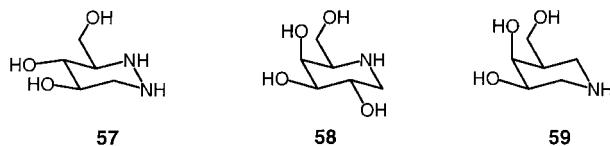


Abbildung 21. Vorgeschlagene Wechselwirkungen bei der bevorzugten Bindung von Deoxynojirimycin im aktiven Zentrum einer  $\alpha$ -Glycosidase (a), die bei der Bindung im aktiven Zentrum einer  $\beta$ -Glycosidase nicht auftreten (b). c) Bevorzugte Wechselwirkungen bei der Bindung von Isofagomin im aktiven Zentrum einer  $\beta$ -Glycosidase.



strukturen gefunden<sup>[56, 105, 111, 119]</sup> und sind in allen Aminosäuresequenzen konserviert<sup>[172]</sup> (siehe Abbildungen 15–17).

Glycosidasen der Familie 1 haben Trp- und Gln-Reste in Positionen, in denen sie entweder mit axialen oder mit äquatorialen C4-Hydroxygruppen in Wechselwirkung treten können (Abbildung 22).<sup>[173, 174]</sup> Beide Unterfamilien der Familie 2 haben einen konservierten Asparaginsäurerest im

Enzyme auch bei nachgewiesener Homogenität unselektiv.<sup>[64, 65]</sup> Über Jahrzehnte hinweg gesammelte Ergebnisse aus Kinetikmessungen korrelieren mit der oben erwähnten Einteilung der Glycosidasen in Familien.<sup>[52]</sup> So gehören  $\beta$ -Glucosidasen,<sup>[111]</sup> 6-Phospho- $\beta$ -glucosidasen und  $\beta$ -Galactosidasen<sup>[169]</sup> sowie Myrosinassen (Thioglycosidasen),<sup>[170]</sup> alle mit geringer gluco-/galacto-Selektivität, zur Familie 1. Glucosidasen mit hoher gluco-Selektivität gehören zur Familie 3.<sup>[162, 165]</sup> Die Familie 2 umfaßt zwei Unterfamilien:  $\beta$ -Galactosidasen, die hochgradig galacto-selektiv sind,<sup>[166]</sup> und  $\beta$ -Glucuronidasen mit geringer Selektivität.<sup>[171]</sup>

Homologie von Aminosäuresequenzen impliziert strukturelle Ähnlichkeit, und in der Tat gleichen sich die aktiven Zentren der Glycosidasen der Familien 1 und 2. Die Aminosäuren, die an der Katalyse beteiligt sind (beide Glu) und Wasserstoffbrückenbindungen mit HO-C2 und HO-C3 (Asn bzw. His) sowie hydrophobe Wechselwirkungen mit der  $\alpha$ -Seite der Substrate eingehen (Trp), werden in allen Kristall-

aktiven Zentren. In den repräsentativen Strukturen der  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*<sup>[104]</sup> und der menschlichen  $\beta$ -Glucuronidase,<sup>[120]</sup> die beide galacto-konfigurierte Substrate hydrolyseren, kann dieser Asparaginsäurerest eine Wasserstoffbrückenbindung mit der axialen Hydroxygruppe an C4 eingehen. Diese Strukturen unterscheiden sich voneinander durch die Lage des konservierten Tryptophanrestes, über dem der Pyranosering liegt: In der menschlichen  $\beta$ -Glucuronidase kann die äquatoriale C4-Hydroxygruppe eine H-Brücke mit dem Indol-Stickstoffatom von Trp 587 bilden (Abbildung 23), während der entsprechende Tryptophanrest 568 der  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* (siehe Abbildung 15) nach „oben“ hin verschoben ist, eine Wechselwirkung mit der hydrophoben Seite eines Galactopyranosids eingehen kann und eine äquatoriale Hydroxygruppe räumlich abblockt, so daß Glucoside das aktive Zentrum nicht vollständig besetzen können.

Bislang ist keine Kristallstruktur einer Glucosidase der

Familie 3 bestimmt worden, so daß uns das Verständnis der

Wechselwirkungen, auf denen die hohe gluco-Selektivität

dieser Enzyme beruht, noch verwehrt ist.

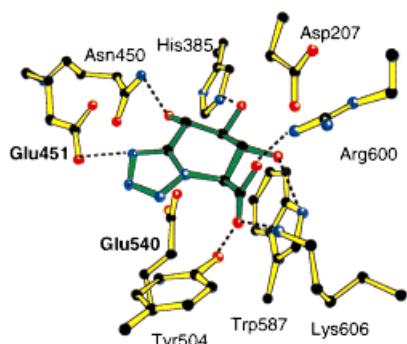


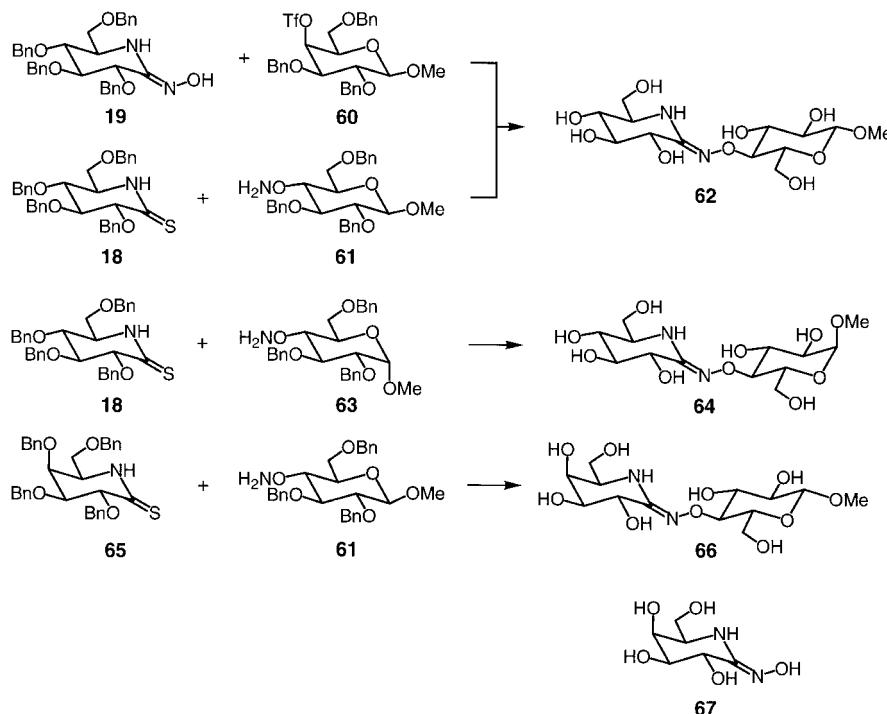
Abbildung 23. Kristallstruktur des Komplexes aus menschlicher  $\beta$ -Glucuronidase (Familie 2) und dem *gluco*-Tetrazol 20.

#### 4. Selektivität für das Aglycon: Hemmung durch Analoga von Disacchariden

Die meisten der in den vorangehenden Abschnitten diskutierten Hemmer sind Analoga des Glyconeils der Substrate oder Übergangszustände. Der Einbau eines dem Aglycon des natürlichen Substrats entsprechenden Restes in die Struktur des hemmenden Analogons des Glycons oder Übergangszustands, also beispielsweise die Synthese eines Disaccharid-Analogons, sollte im Idealfall zu einer verstärkten Hemmwirkung und zu einer höheren  $\alpha/\beta$ -Selektivität führen. Einige Arbeitsgruppen haben Disaccharid-Analoga starker Hemmer hergestellt, z.B. Analoga von Trehazolin,<sup>[175]</sup> Isofagomin,<sup>[155]</sup> Valienamin,<sup>[176]</sup> 1-Desoxynojirimycin,<sup>[177–180]</sup> 1-Desoxymannojirimycin<sup>[181, 182]</sup> und anderen Azasacchariden.<sup>[183–190]</sup>

Da die Oximfunktion eines Hydroximsäurelactons oder -lactams in eine Richtung zeigt, die der Lage des Aglycons eines  $\beta$ -D-Glycosids näherkommt als jener eines  $\alpha$ -Glycosids, sollte ein Oximsubstituent das Aglycon eines  $\beta$ -Glycosids besser nachahmen als jenes eines  $\alpha$ -Glycosids; ein derart substituierter Inhibitor sollte  $\beta$ -Glycosidasen selektiver hemmen als die unsubstituierte Hydroximsäureverbindung. Die Cellobiosid-Analoga **62** und **64** wurden durch Alkylierung des benzylgeschützten  $\alpha$ -D-Gluconohydroximsäure-1,5-lactams **19** mit dem *galacto*-konfigurierten Trifluormethansulfonat (Triflat) **60** erhalten oder, alternativ, durch Kondensation des

benzylgeschützten Thiolactams **19** mit den *gluco*-konfigurierten Hydroxylaminen **61** oder **63** und nachfolgende Debenzylierung mit Lithium in Ethylamin. Das Lactosid-Analogon **66** wurde analog aus dem geschützten  $\alpha$ -Galactonothiolactam **65** hergestellt.<sup>[191]</sup>



Die beiden Cellobiosid-Analoga **62** und **64** hemmen die  $\beta$ -Glucosidase aus *C. saccharolyticum* etwa gleich stark wie das unsubstituierte Hydroximsäurelactam **13**; weder stört der zweite Pyranosering die Bindung an das Enzym, noch fördert er sie (Tabelle 12). Die Bindung an die  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe wird jedoch mindestens um das 1000fache geschwächt, d.h., der zweite Pyranosering kann im aktiven Zentrum dieser Glycosidase nicht untergebracht werden. Die Süßmandel- $\beta$ -Glucosidasen mit ihrer bekannten Bevorzugung eines hydrophoben Aglycons<sup>[59]</sup> stellen einen interessanten Fall dar, da ihre Hemmung durch das  $\beta$ -Cellobiosid-Analogon **62** nur viermal schwächer ist als jene durch **13**, während die Hemmung durch das  $\alpha$ -konfigurierte Cellobiosid-Analogon **64** 100mal schwächer ist. Dies ist im Einklang mit einer Wechselwirkung mit einem hydrophoben und flachen Aglycon, die mit der axialen Methoxygruppe von **64** unvereinbar ist.

Die für die Cellobiosid-Analoga **62** und **64** beobachtete  $\alpha/\beta$ -Selektivität spiegelt sich in jener des Lactosid-Analogons **66**

Tabelle 12.  $K_i$ - und  $IC_{50}$ -Werte für die Lactamoxime **13**, **62**, **63**, **66** und **67**<sup>[a]</sup>

Enzym (Herkunft)	$K_M$ <sup>[b]</sup>	pH	<b>13</b>	<b>62</b>	<b>63</b>	<b>66</b>	<b>67</b>
$\beta$ -Glucosidasen (Mandeln)	3.0 (1.2)	6.8	16	60	1000	–	–
$\beta$ -Glucosidase ( <i>C. saccharolyticum</i> )	1.2 (1.2)	6.8	3.3	3.6	2.0	3.3	2.5
$\alpha$ -Glucosidase (Bierhefe)	1.2 (1.2)	6.8	2.9	2500	>5000	–	–
$\beta$ -Galactosidase (Rinderleber)	0.24 (0.24)	7.0	–	–	–	2500	$10^{[58]}$
$\beta$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )	0.04	6.8	–	–	–	0.1	0.1
$\alpha$ -Galactosidase (Kaffeebohnen)	0.19	6.0	–	–	–	250	5

[a] Angegeben sind die  $K_i$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] oder (kursiv) die  $IC_{50}$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ]. [b]  $K_M$ -Werte [ $\text{mm}$ ] der entsprechenden 4-Nitrophenylhexopyranoside. Die Anfangskonzentration des Substrats [ $\text{mm}$ ] ist in Klammern angegeben.

wider. So wird die starke Hemmung der  $\alpha$ -Galactosidase aus Kaffeebohnen durch das unsubstituierte Hydroximsäurelactam **67** ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ ) mit der Einführung des Glucosylrestes in **66** signifikant geschwächt ( $K_i = 250 \mu\text{M}$ ), während die beiden Hydroximsäurelactame **66** und **67** starke, kompetitive Hemmer der  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* (Familie 2) sind, mit einem  $K_i$ -Wert von 100 nm.

Die  $K_i$ -Werte für die Hemmung der *C-saccharolyticum*- $\beta$ -Glucosidase (Familie 1) durch die Hydroximsäurelactame **66** und **67** (3.3 bzw. 2.5  $\mu\text{M}$ ) sind mit den Hemmwerten für die *gluco*-Analoga **13** und **62** vergleichbar und bestätigen, daß Glucosidasen der Familie 1 keine Selektivität für die Konfiguration an C4 aufweisen und daß die Bindungsstelle für das Aglycon sowohl hydrophile als auch hydrophobe Reste unterbringen kann. Dies wiederum ist im Einklang mit der Funktion dieser Glycosidase als Exocellulase, die aber auch *p*-Nitrophenylglycoside leicht spaltet.<sup>[192]</sup> Man darf bei diesen Interpretationen nicht außer Acht lassen, daß der Abstand zwischen Glycon und Aglycon in den Oximethern größer ist als in den analogen Disacchariden. Wohl wird bei der Glycosidspaltung die glycosidische Bindung progressiv gestreckt, aber inwiefern sich dieser Umstand auf die Hemmung durch die Disaccharid-Analoga auswirkt, ist keineswegs klar.

Die  $\beta$ -Glucosidase aus Rinderleber wird durch **67** ( $K_i = 10 \mu\text{M}$ ) etwa 100mal stärker gehemmt als durch **66** ( $IC_{50} = 2.5 \text{ mm}$ ), in Übereinstimmung mit der starken Bevorzugung von Arylpyranosiden durch die Rinderleber-Glycosidase. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen der Hemmung der  $\beta$ -Glucosidasen aus Süßmandel, die ebenfalls Arylpyranoside bevorzugen,<sup>[59]</sup> aber durch das Celllobiosid-Analogon **62** nur viermal schwächer gehemmt werden als durch das unsubstituierte **13**. Es scheint, als ob die Bindungsstelle für das aromatische Aglycon der Rinderleber-Glycosidase selektiver ist als jene der Süßmandel-Enzyme. Leider ist die Aminosäuresequenz beider Glycosidasen unbekannt, so daß aus diesen Befunden keine genaueren Schlüsse auf die Struktur des aktiven Zentrums und die Ursache der unterschiedlichen Bevorzugung aromatischer Aglycone möglich sind.

## 5. Abschließende Bemerkungen

Die Synthese geeigneter Glycosidasehemmer, die Messung kinetischer Daten, die Analyse der Struktur unkomplexierter und mit Inhibitoren komplexierter Glycosidasen sowie die Interpretation dieser Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt der Reaktivität organischer Verbindungen sind ideale Voraussetzungen, um Einzelheiten des enzymatischen Reaktionsmechanismus zu klären. Die genaue Kenntnis dieser Mechanismen ermöglicht es ihrerseits, auf rationale Weise selektivere und stärkere Hemmer zu entwerfen. Die Berücksichtigung der lateralen Protonierung, der Richtung, aus der sie erfolgt (*syn*- oder *anti*-Protonierer) und der Konformationsänderung im Verlauf der Glycosidspaltung wird sich beim Inhibitor-Design bewähren. Jüngste Kinetikuntersuchungen durch K. Piens im Laboratorium von M. Claeysens (Universität Gent) haben ergeben, daß Glyconolactamoxime und Hemmer vom Imidazoltyp zwar die Celllobiohydrolase II (CBH II) aus *Trichoderma reesi*, nicht aber die Celllobio-

hydrolase I (CBH I) hemmen; dies paßt zur Klassifizierung von CBH I als *syn*-Protonierer und läßt vermuten, daß CBH II ein *anti*-Protonierer ist. Die Frage, ob bei den strukturell noch weitgehend unbekannten Glycosyltransferasen ähnliche Selektivitäten zu finden sind, verspricht weitere spannende Untersuchungen im Wechselspiel von Organischer Chemie, Enzymologie, Proteinkristallographie und Biotechnologie.

*Ein besonderer Dank gilt gegenwärtigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie Gideon Davies, Doug Juers, Günter Legler, Michael Sinnott und Steve Withers für zahlreiche fruchtbare Diskussionen und Bruno Bernet für seine kritische Hilfe bei der Fertigstellung des Manuskripts. Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, dem Bundesamt für Bildung und Wissenschaft (BBW 96.0375; EU-Forschungsprogramm BIO4-CT96-0580) und den Firmen F. Hoffmann La Roche und Oxford GlycoSciences danken wir besonders für die langjährige finanzielle Unterstützung.*

Eingegangen am 27. Juli 1998 [A292]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750–770

- [1] G. J. Davies, M. L. Sinnott, S. G. Withers in *Comprehensive Biological Catalysis* (Hrsg.: M. L. Sinnott), Academic Press, London, **1998**, S. 119–207.
- [2] a) *Carbohydrate Mimics* (Hrsg.: Y. Chapleur), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**; b) G. Legler in Lit. [2a], S. 463–490.
- [3] S. Ogawa in Lit. [2a], S. 87–106.
- [4] B. Ganem in Lit. [2a], S. 239–258.
- [5] K. Tatsuta in Lit. [2a], S. 283–306.
- [6] J.-C. Depezay in Lit. [2a], S. 307–326.
- [7] M. Bols, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 1–8.
- [8] J. M. Williams in *Glycopeptides and Related Compounds* (Hrsg.: D. G. Large, C. D. Warren), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 505–539.
- [9] A. White, D. Rose, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 645–651.
- [10] A. De Raadt, C. W. Ekart, M. Ebner, A. E. Stütz, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *187*, 157–186.
- [11] S. Picasso, *Chimia* **1996**, *50*, 648–649.
- [12] „Identification of the Active Site Residues in Glycosidases“: S. G. Withers, *ACS Symp. Ser.* **1996**, *619*, 365–380.
- [13] G. Davies, B. Henrissat, *Structure* **1995**, *3*, 853–859.
- [14] S. G. Withers, *Progr. Biotechnol.* **1995**, *10*, 97–111.
- [15] S. G. Withers, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1673–1682.
- [16] G. S. Jacob, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 605–611.
- [17] J. D. McCarter, S. G. Withers, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885–892.
- [18] V. Jäger, R. Müller, T. Leibold, M. Hein, M. Schwarz, M. Fengler, L. Jaroskova, M. Pätz, P.-Y. LeRoy, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1994**, *103*, 491–507.
- [19] G. Legler, *Naturwissenschaften* **1993**, *80*, 397–409.
- [20] B. Winchester, G. W. J. Fleet, *Glycobiology* **1992**, *2*, 199–210.
- [21] R. W. Franck, *Bioorg. Chem.* **1991**, *20*, 77–88.
- [22] A. D. Elbein, *FASEB J.* **1991**, *5*, 3055–3063.
- [23] D. E. Koshland, *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416–436.
- [24] C. A. Vernon, *Proc. R. Soc. London B* **1967**, *167*, 389–401.
- [25] D. C. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 484–497.
- [26] S. G. Withers, R. A. J. Warren, I. P. Street, K. Rupitz, J. B. Kempton, R. Aebersold, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5887–5889.
- [27] S. G. Withers, R. Aebersold, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 361–372.
- [28] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, **1969**.
- [29] S. V. Evans, L. E. Fellows, E. A. Bell, *Phytochemistry* **1983**, *22*, 768–770.
- [30] M. P. Dale, H. E. Ensley, K. Kern, K. A. R. Sastry, L. D. Byers, *Biochemistry* **1985**, *24*, 3530–3539.
- [31] P. A. Fowler, A. H. Haines, R. J. K. Taylor, E. J. T. Chrystal, M. B. Gravestock, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 377–381.
- [32] G. Legler, A. Korth, A. Berger, C. Ekhart, G. Gradvig, A. E. Stütz, *Carbohydr. Res.* **1993**, *250*, 67–77.

- [33] S. Ezaki, *J. Biochem. (Tokyo)* **1940**, 32, 91–105.
- [34] K. Horikoshi, *J. Biochem. (Tokyo)* **1942**, 35, 39–46.
- [35] G. A. Levy, *J. Biochem. (Tokyo)* **1952**, 52, 464–472.
- [36] J. Conchie, G. A. Levy, *Biochem. J.* **1957**, 65, 389–395.
- [37] G. A. Levy, S. M. Snaith, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1972**, 36, 151–181.
- [38] D. H. Leaback, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 32, 1025–1030.
- [39] E. T. Reese, F. W. Parrish, M. Ettlinger, *Carbohydr. Res.* **1971**, 18, 381–388.
- [40] Die Eigenschaft der Raumerfüllung oder „steric complementariness“, siehe Lit. [41].
- [41] L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, 24, 1375–1377.
- [42] R. Wolfenden, *Acc. Chem. Res.* **1972**, 5, 10–18.
- [43] T. Kajimoto, K. K.-C. Liu, R. L. Pederson, Z. Zhong, Y. Ichikawa, J. A. Porco, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6187–6196.
- [44] B. Ganem, G. Papandreou, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8984–8985.
- [45] A. Vasella, P. Ermert, R. Hoos, A. B. Naughton, K. Rupitz, W. Thiel, M. Weber, W. Weber, S. G. Withers in *Complex Carbohydrates in Drug Research* (Hrsg.: K. Bock, H. Clausen), Munksgaard, Kopenhagen, **1994**, S. 134–150 (*Alfred Benzon Symposium 36*).
- [46] L. N. Johnson, D. C. Phillips, *Nature* **1965**, 206, 761–763.
- [47] I. I. Secemski, S. S. Lehrer, G. E. Lienhard, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 4740–4748.
- [48] L. O. Ford, L. N. Johnson, P. A. Machin, D. C. Phillips, R. Tjian, *J. Mol. Biol.* **1974**, 88, 349–371.
- [49] A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 5250–5254.
- [50] A. Warshel, *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 284–290.
- [51] B. Henrissat, *Biochem. J.* **1991**, 280, 309–316.
- [52] B. Henrissat, G. Davies, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 637–644.
- [53] P. Lalégerie, G. Legler, J. M. Yon, *Biochimie* **1982**, 64, 977–1000.
- [54] R. Saul, R. J. Molyneux, A. D. Elbein, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, 230, 668–675.
- [55] T. E. Couling, R. Goodey, *Biochem. J.* **1970**, 119, 303–306.
- [56] Die Kristallstruktur einer  $\beta$ -Glucosidase im Komplex mit der offenkettigen Form von Gluconolacton ist kürzlich aufgeklärt worden: J. Sanz-Aparicio, J. A. Hermoso, M. Martínez-Ripoll, J. L. Lequerica, J. Polaina, *J. Mol. Biol.* **1998**, 275, 491–502.
- [57] D. Beer, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1986**, 69, 267–270.
- [58] G. Papandreou, M. K. Tong, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11682–11690.
- [59] W. Hösel, E. E. Conn, *Trends Biochem. Sci.* **1982**, 1, 219–221.
- [60] M. K. Tong, G. Papandreou, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6137–6139.
- [61] G. Legler, M.-T. Finken, S. Felsch, *Carbohydr. Res.* **1996**, 292, 91–101.
- [62] R. Hoos, A. B. Naughton, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1802–1807.
- [63] R. Hoos, A. B. Naughton, W. Thiel, A. Vasella, W. Weber, K. Rupitz, S. G. Withers, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2666–2686.
- [64] A. K. Grover, D. D. MacMurchie, R. J. Cushley, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 482, 98–108.
- [65] J. J. Distler, G. W. Jourdian, *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, 178, 631–643.
- [66] P. Ermert, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 2043–2053.
- [67] P. Ermert, A. Vasella, M. Weber, K. Rupitz, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **1993**, 250, 113–125.
- [68] T. D. Heightman, P. Ermert, D. Klein, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 514–532.
- [69] S. Vonhoff, A. Vasella, *Synth. Commun.*, im Druck.
- [70] H. Therisod, Y. Letourneux, M. Therisod, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 371–372.
- [71] S. G. Withers, K. Rupitz, D. Trimbur, R. A. J. Warren, *Biochemistry* **1992**, 31, 9979–9985.
- [72] Y.-K. Li, L. D. Byers, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 999, 227–232.
- [73] R. A. Field, A. H. Haines, E. J. T. Chrystal, M. C. Lusznak, *Biochem. J.* **1991**, 274, 885–889.
- [74] T. Granier, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1738–1746.
- [75] G. Legler, E. Bieberich, *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, 260, 437–442.
- [76] G. Legler, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, 48, 333–335.
- [77] T. Aoyagi, H. Suda, K. Uotani, F. Kojima, T. Aoyama, K. Horiguchi, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1404–1408.
- [78] T. Aoyama, H. Naganawa, H. Suda, K. Uotani, T. Aoyagi, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1557–1558.
- [79] K. Tatsuta, S. Miura, S. Ohta, H. Gunji, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 286–288.
- [80] K. Tatsuta, S. Miura, S. Ohta, H. Gunji, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1085–1088.
- [81] K. Tatsuta, S. Miura, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6721–6724.
- [82] K. Tatsuta, S. Miura, H. Gunji, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, 70, 427–436.
- [83] M. Langer, A. Pauling, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1585–1587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1464–1465.
- [84] J. Winter, J. Rétey, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 410–416.
- [85] T. Granier, F. Gaiser, L. Hintermann, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1443–1456.
- [86] N. Panday, T. Granier, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 475–490.
- [87] D. C. Phillips, *Sci. Am.* **1966**, 215(5), 78–90.
- [88] A. J. Kirby, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 107–108.
- [89] H. Thøgersen, R. U. Lemieux, K. Bock, B. Meyer, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 44–57.
- [90] Der Einwand, daß dies besonders die *exo*-anomere Wechselwirkung zwischen diesem freien Elektronenpaar und der endocyclischen C–O-Bindung verringern könnte, ist nicht berechtigt: Die Protonierung des anderen freien Elektronenpaars würde die formale Elektronegativität des Sauerstoffatoms erhöhen und somit die *exo*-anomere Wechselwirkung in gleichem Maße beeinträchtigen.
- [91] L. P. McIntosh, G. Hand, P. E. Johnson, M. D. Joshi, M. Körner, L. A. Plesniak, L. Ziser, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, *Biochemistry* **1996**, 35, 9958–9966.
- [92] T. D. Heightman, M. Locatelli, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 2190–2200.
- [93] M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, R. W. Taft, *Progr. Phys. Org. Chem.* **1981**, 13, 485–630.
- [94] M. D. Joesten, *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 362–366.
- [95] E. P. Mitchell, S. G. Withers, P. Ermert, A. T. Vasella, E. F. Garman, N. G. Oikonomakos, L. N. Johnson, *Biochemistry* **1996**, 35, 7341–7355.
- [96] P. J. McLaughlin, D. I. Stuart, H. W. Klein, N. G. Oikonomakos, L. N. Johnson, *Biochemistry* **1984**, 23, 5862–5873.
- [97] H. W. Klein, M. J. Im, D. Palm, *Eur. J. Biochem.* **1986**, 157, 107–114.
- [98] T. Granier, N. Panday, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 979–987.
- [99] T. D. Heightman, Dissertation, ETH Zürich, **1998**.
- [100] K. Tatsuta, Y. Ikeda, S. Miura, *J. Antibiot.* **1996**, 49, 836–838.
- [101] T. D. Heightman, A. Vasella, K. E. Tsitsanou, S. E. Zographos, V. T. Skamnaki, N. Oikonomakos, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 853–864.
- [102] M. N. Namchuk, S. G. Withers, *Biochemistry* **1995**, 34, 16194–16202.
- [103] In den meisten Fällen wurde bei einer Konzentration von 8 mM keine Inhibition durch die 1,2,3-Triazole **53** und **54** festgestellt, wohingegen die  $K_i$ -Werte der Tetrazole **24** und **25** sich auf Konzentrationen beziehen, bei denen eine Inhibition von nahezu 50% festgestellt wird. Aus dem Vergleich dieser Werte ergibt sich daher ein unterer Grenzwert, und der tatsächliche Unterschied ist wahrscheinlich deutlich größer.
- [104] R. H. Jacobsen, X.-J. Zhang, R. F. DuBose, B. W. Matthews, *Nature* **1994**, 369, 761–766.
- [105] T. Barrett, C. G. Suresh, S. P. Tolley, E. J. Dodson, M. A. Hughes, *Structure* **1995**, 3, 951–960.
- [106] C. Wiesmann, G. Beste, W. Hengstenberg, G. Schulz, *Structure* **1995**, 3, 961–968.
- [107] A. White, D. Tull, K. Johns, S. G. Withers, D. R. Rose, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 149–154.
- [108] S. G. Withers, I. P. Street, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8551–8553.
- [109] F. A. Quiacho, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 1293–1306.
- [110] J. Sakon, W. S. Adney, M. E. Himmel, S. R. Thomas, P. A. Karplus, *Biochemistry* **1996**, 35, 10648–10660.
- [111] C. Wiesmann, W. Hengstenberg, G. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1997**, 269, 851–860.
- [112] W. P. Burmeister, S. Cottaz, H. Driguez, R. Iori, S. Palmieri, B. Henrissat, *Structure* **1997**, 5, 663–675.
- [113] R. Dominguez, H. Souchon, M.-B. Lascombe, P. M. Alzari, *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 1042–1051.
- [114] M. Qian, R. Haser, F. Payan, *J. Mol. Biol.* **1993**, 231, 785–799.
- [115] C. Gilles, J.-P. Astier, G. Marchis-Mouren, C. Cambillau, F. Payan, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 238, 561–569.
- [116] A. M. Brzozowski, G. Davies, *Biochemistry* **1997**, 36, 10837–10845.
- [117] B. Strokopytov, R. M. A. Knegtel, D. Penninga, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Dijkhuizen, B. W. Dijkstra, *Biochemistry* **1996**, 35, 4241–4249.

- [118] I. Tews, A. Perrakis, A. Oppenheim, Z. Dauter, K. S. Wilson, C. E. Vorgias, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 638–648.
- [119] C. Aguilar, I. Sanderson, M. Moracci, M. Ciaramella, R. Nucci, M. Rossi, L. H. Pearl, *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 789–802.
- [120] S. Jain, W. B. Drendel, Z.-W. Chen, F. S. Mathews, W. S. Sly, J. H. Grubb, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 375–381.
- [121] R. Dominguez, H. Souchon, M.-B. Lascombe, P. M. Alzari, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 569–576.
- [122] G. W. Harris, J. A. Jenkins, I. Connerton, N. Cummings, L. L. Leggio, M. Scott, G. P. Hazlewood, J. I. Laurie, H. J. Gilbert, R. W. Pilkersgill, *Structure* **1994**, *2*, 1107–1116.
- [123] G. Sulzenbacher, H. Driguez, B. Henrissat, M. Schülein, G. J. Davies, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15280–15287.
- [124] D. Irwin, D. H. Shin, S. Zhang, B. K. Barr, J. Sakon, P. A. Karplus, D. B. Wilson, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1709–1714.
- [125] W. W. Wakarchuk, R. L. Campbell, W. L. Sung, J. Davoodi, M. Yaguchi, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 467–475.
- [126] J. A. Kelly, A. R. Sielecki, B. D. Sykes, M. N. G. James, D. C. Phillips, *Nature* **1979**, *282*, 875–878.
- [127] A. T. Hadfield, D. J. Harvey, D. B. Archer, D. A. MacKenzie, D. J. Jeenes, S. E. Radford, G. Lowe, C. M. Dobson, L. N. Johnson, *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 856–872.
- [128] N. C. J. Strynadka, M. N. G. James, *J. Mol. Biol.* **1991**, *220*, 401–424.
- [129] L. H. Weaver, M. G. Grüter, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 54–68.
- [130] G. Davies, S. P. Tolley, B. Henrissat, C. Hjort, M. Schülein, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16210–16220.
- [131] C. Divne, J. Ståhlberg, T. Reinikainen, L. Ruohonen, G. Pettersson, J. K. C. Knowles, T. T. Teeri, T. A. Jones, *Science* **1994**, *265*, 524–528.
- [132] G. J. Kleywegt, J.-Y. Zou, C. Divne, G. J. Davies, I. Sinning, J. Ståhlberg, T. Reinikainen, M. Srisodsuk, T. T. Teeri, T. A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 383–397.
- [133] M. Juy, A. G. Amit, P. M. Alzari, R. J. Poljak, M. Claeysse, P. Béguin, J.-P. Aubert, *Nature* **1992**, *357*, 89–91.
- [134] A. Törrönen, J. Rouvinen, *Biochemistry* **1995**, *34*, 847–856.
- [135] R. Havukainen, A. Törrönen, T. Laitinen, J. Rouvinen, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9617–9624.
- [136] T. Keitel, O. Simon, R. Borriss, U. Heinemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5287–5291.
- [137] M. Hahn, T. Keitel, U. Heinemann, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 849–858.
- [138] A. Perrakis, I. Tews, Z. Dauter, A. B. Oppenheim, I. Chet, K. S. Wilson, C. E. Vorgias, *Structure* **1994**, *2*, 1169–1180.
- [139] P. J. Hart, H. D. Pfluger, A. F. Monzingo, T. Hollis, J. D. Robertus, *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 402–413.
- [140] J. Rouvinen, T. Bergfors, T. Teeri, J. K. C. Knowles, T. A. Jones, *Science* **1990**, *249*, 380–386.
- [141] P. M. Alzari, H. Souchon, R. Dominguez, *Structure* **1996**, *4*, 265–275.
- [142] U. Derewenda, L. Swenson, R. Green, Y. Wei, R. Morosoli, F. Shareck, D. Kluepfel, Z. S. Derewenda, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20811–20814.
- [143] J. N. Varghese, T. P. J. Garrett, P. M. Colman, L. Chen, P. B. Høj, G. B. Fincher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2785–2789.
- [144] V. H. Rao, C. D. Guan, P. Vanrooy, *Structure* **1995**, *3*, 449–457.
- [145] J. Sakon, P. Irwin, D. B. Wilson, P. A. Karplus, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 810–818.
- [146] P. Deslongchamps, *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1983**.
- [147] G. J. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1998**, *26*, 167–173. Die Koordinaten für diese Struktur sind noch nicht freigegeben worden (Mai 1998).
- [148] I. Tews, A. C. Terwisscha van Scheltinga, A. Perrakis, K. S. Wilson, B. W. Dijkstra, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7954–7959.
- [149] D. Beer, Dissertation, Universität Zürich, **1989**.
- [150] A. E. Aleshin, B. Stoffer, L. M. Firsov, B. Svensson, R. B. Honzatko, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8319–8328.
- [151] R. Hoos, A. Vasella, K. Rupitz, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **1997**, *298*, 291–298.
- [152] G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer, Berlin, **1991**.
- [153] T. Niwa, S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze, T. Niida, *Agr. Biol. Chem.* **1970**, *34*, 966–968.
- [154] T. M. Jespersen, W. Dong, M. R. Seirks, T. Skrydstrup, I. Lundt, M. Bols, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1858–1860; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1778–1779.
- [155] W. Dong, T. Jespersen, M. Bols, T. Skrydstrup, M. Sierks, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2788–2795.
- [156] Y. Ichikawa, Y. Igarashi, M. Ichikawa, Y. Suhara, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3007–3018.
- [157] M. Bols, R. G. Hazell, I. B. Thomsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 940–947.
- [158] G. Legler, S. Pohl, *Carbohydr. Res.* **1986**, *155*, 119–129.
- [159] Y. Ichikawa, Y. Igarashi, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4585–4586.
- [160] R. J. Molyneux, Y. T. Pan, A. Goldmann, D. A. Tepfer, A. D. Elbein, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *301*, 81–88.
- [161] N. Asano, A. Kato, H. Kizu, K. Matsui, R. C. Griffiths, M. G. Jones, A. A. Watson, R. J. Nash, *Carbohydr. Res.* **1997**, *304*, 173–178.
- [162] F. Gräbner, M. Seiss, K. P. Rücknagel, W. L. Staudenbauer, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 301–309.
- [163] G. Youatt, *Aust. J. Biol. Sci.* **1958**, *11*, 209–217.
- [164] F. Gräbner, W. L. Staudenbauer, *Biotechnol. Lett.* **1988**, *10*, 73–78.
- [165] I. A. Kataeva, N. A. Chuvil'skaya, N. P. Golovchenko, V. K. Akinmenko, *Biokhimiya (Moscow)* **1991**, *56*, 1429–1438.
- [166] J. Monod, G. Cohen-Bazire, M. Cohn, *Biochem. Biophys. Acta* **1951**, *7*, 585–599.
- [167] S. Veibel in *The Enzymes, The Chemistry and Mechanism of Action*, Vol. 1, Part 1 (Hrsg.: J. B. Sumner, K. Myrbäck), Academic Press, New York, **1951**, S. 583–620.
- [168] H. Skovbjerg, H. Sjöström, O. Norén, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *114*, 653–661.
- [169] E. Witt, R. Frank, W. Hengstenberg, *Protein Eng.* **1993**, *6*, 913–920.
- [170] I. Goodman, J. R. Fouts, E. Bresnick, R. Menegas, G. H. Hitchings, *Science* **1959**, *130*, 450–451.
- [171] C. A. Marsh, G. A. Levy, *Biochem. J.* **1958**, *68*, 610–617.
- [172] Die Sequenzen sind über das Internet in der Proteindatenbank SWISSPROT zugänglich: <http://www.expasy.ch/sprot/>
- [173] Während der Arbeit an diesem Manuskript wurde den konservierten Trp- und Gln-Resten auch von Sanz-Aparicio et al. diese Rolle zugeschrieben (siehe Lit. [56]).
- [174] Bei der Myrosinase aus *Sinapis alpis* (Familie 1) ist dieses Trp gegen ein Phe ausgetauscht. Der dadurch entstehende freie Raum wird im Komplex mit einem Inhibitor, der die *gluco*-Konfiguration aufweist, von einem Wassermolekül eingenommen, könnte aber auch von der Hydroxygruppe eines Substrats mit *galacto*-Konfiguration besetzt werden (siehe Lit. [112]).
- [175] S. Knapp, A. Purandare, K. Rupitz, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7461–7462.
- [176] S. Knapp, A. B. J. Naughton, T. G. M. Dhar, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1025–1028.
- [177] P. S. Liu, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4717–4721.
- [178] P. B. Anzeveno, L. J. Creemer, J. K. Daniel, C.-H. R. King, P. S. Liu, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2539–2542.
- [179] C. R. Johnson, M. W. Miller, A. Golebiowski, H. Sundram, M. B. Ksebati, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8991–8994.
- [180] O. M. Saavedra, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6987–6993.
- [181] C. R. Johnson, B. A. Johns, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6046–6050.
- [182] B. A. Johns, Y. T. Pan, A. D. Elbein, C. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4856–4865.
- [183] S. Knapp, Y. H. Choe, E. Reilly, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4443–4446.
- [184] K. Suzuki, H. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4119–4122.
- [185] J. Lehmann, B. Rob, H.-A. Wagenknecht, *Carbohydr. Res.* **1995**, *278*, 167–180.
- [186] K. Suzuki, T. Fujii, K. Sato, H. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5921–5924.
- [187] G. Legler, M.-T. Finken, *Carbohydr. Res.* **1996**, *292*, 103–115.
- [188] A. Baudat, P. Vogel, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6252–6260.
- [189] K. Krähenbühl, S. Picasso, P. Vogel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 893–896.
- [190] A. H. Haines, I. Carvalho, *Chem. Commun.* **1998**, 817–818.
- [191] S. Vonhoff, T. D. Heightman, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 1710–1725.
- [192] D. R. Love, R. Fisher, P. L. Bergquist, *Mol. Gen. Genet.* **1988**, *213*, 84–92.