

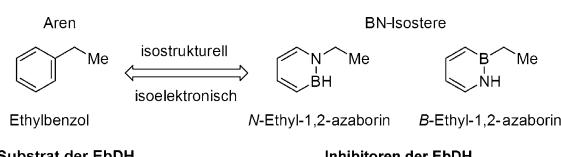
BN/CC-isosterische Verbindungen als Enzyminhibitoren: Hemmung der Hydroxylierung von Ethylbenzol durch N- und B-Ethyl-1,2-azaborin als nichtkonvertierbare Substratanaloga**

Daniel H. Knack, Jonathan L. Marshall, Gregory P. Harlow, Agnieszka Dudzik, Maciej Szaleniec, Shih-Yuan Liu* und Johann Heider*

BN/CC-Isosterie hat sich als praktikable Strategie zur Steigerung der Vielfalt chemischer Strukturen herausgestellt.^[1,2] Besonderes Interesse gilt dabei der Chemie der 1,2-Dihydro-1,2-azaborine (im Folgenden als 1,2-Azaborine abgekürzt), die einen BN-isosterischen aromatischen Ring enthalten und die als neuartige aromatischen Verbindungen relevant für die biomedizinische Forschung und die Materialwissenschaft sein können. Während der letzten Dekade wurden erhebliche Fortschritte bei der Synthese und Charakterisierung von 1,2-Azaborinen erzielt.^[3,4] Allerdings ist fast nichts über das Verhalten von 1,2-Azaborinen in biologischen Systemen bekannt. In einer früheren Arbeit haben wir die Bindung von *N*-Ethyl-1,2-azaborin und seiner Stammverbindung 1,2-Azaborin in einer hydrophoben Bindetasche der L99A-Mutante des Phagen-T4-Lysozyms nachgewiesen.^[5] Es gab bisher aber keinen Nachweis einer biochemisch aktiven Rolle von 1,2-Azaborinen, z. B. als Substrat oder Inhibitor eines Enzyms. Im Hinblick auf die Bedeutung aromatischer Strukturen in Pharmazeutika hat die Erforschung biochemischer Reaktivitäten von 1,2-Azaborinen große Bedeutung: Der neue Spielraum für chemische Synthesen, der sich durch die 1,2-Azaborine ergibt, könnte neue Wege in der Medikamentenentwicklung und der biomedizinischen Forschung ebnen. Hier zeigen wir, dass die BN-Isostere des Ethylbenzols, *N*-

und *B*-Ethyl-1,2-azaborin, tatsächlich starke Inhibitoren der Ethylbenzol-Hydroxylierung durch Ethylbenzol-Dehydrogenase (EbDH) sind. Damit wird erstmals nachgewiesen, dass BN/CC-Isosterie prinzipiell zu neuartigen biochemischen Reaktivitäten führen kann (Schema 1). EbDH ist ein Molybdänenzym, das eine Sauerstoff-unabhängige Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (*S*)-1-Phenylethanol katalysiert und damit den anaeroben Abbau von Ethylbenzol im denitrifizierenden Betaproteobakterium „*Aromatoleum aromaticum*“ einleitet.^[6–10] Die Sauerstoff-unabhängige Hydroxylierung eines nichtaktivierten Kohlenwasserstoffs ist dabei eine ungewöhnliche und einzigartige Eigenschaft dieses Enzyms.^[8] Ein möglicher Reaktionsmechanismus der EbDH, bei dem aufeinanderfolgende radikalische und carbokationische Substratderivate als Reaktionsintermediate auftreten, wurde aus quantenchemischen Rechnungen und experimentellen Daten vorhergesagt.^[11–16] Das Enzym hydroxyliert ein äußerst breites Spektrum alkylierter aromatischer und heteroaromatischer Verbindungen^[12] in einer enantioselektiven Reaktion. Deshalb bietet es ein sehr geeignetes Testsystem zur Überprüfung der 1,2-Azaborine als mögliche Substrate.

Hier untersuchten wir spezifisch *N*-Ethyl-1,2-azaborin und *B*-Ethyl-1,2-azaborin als Substrate für EbDH (Schema 1). Überraschenderweise wiesen wir dabei mit



Schema 1. Effekt der BN/CC-Isosterie auf Enzymreaktivität.

[*] D. H. Knack, Prof. Dr. J. Heider
Laboratorium für Mikrobielle Biochemie
Philipps-Universität Marburg
35043 Marburg an der Lahn (Deutschland)
E-Mail: heider@biologie.uni-marburg.de

J. L. Marshall, G. P. Harlow, Prof. Dr. S.-Y. Liu
Department of Chemistry, University of Oregon
Eugene, OR, 97403-1253 (USA)
E-Mail: lsy@uoregon.edu

A. Dudzik, Dr. M. Szaleniec
Jerzy Haber Institute for Catalysis and Surface Chemistry, Polish
Academy of Sciences
30-239 Kraków (Polen)

[**] Wir danken für finanzielle Unterstützung durch das Schwerpunktprogramm 1319 der DFG, das LOEWE/Synmikro Zentrum des Landes Hessen, sowie das polnische Ministerium für Wissenschaft und akademische Bildung (Beihilfen N N204 269038 und MNiSW/SGI3700/PAN/121/2006). Weitere Unterstützung für diese Arbeit wurde gewährt durch die NIH (Grant R01-GM094541). G.P.H. wurde von der Arnold und Mabel Beckmann Stiftung sowie von der Camille & Henry Dreyfus Stiftung unterstützt. Wir danken Jesse Jenkins für einige frühe Beiträge zu den Synthesen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208351> zu finden.

keinem der beiden 1,2-Azaborine eine enzymatische Umsetzung nach, weder mit dem photometrischen Enzymtest noch durch GC-MS-Analyse von Ethylacetat-Extraktionen von Reaktionsgemischen, die bis zu zwölf Stunden inkubiert wurden. Allerdings konnten wir sowohl *N*-Ethyl-1,2-azaborin als auch *B*-Ethyl-1,2-azaborin als potente Inhibitoren von EbDH identifizieren (Abbildung 1a). Besonders *N*-Ethyl-1,2-azaborin erwies sich als sehr effizienter Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 2.8 μm, während *B*-Ethyl-1,2-azaborin einen IC₅₀-Wert von 100 μm aufwies. Die Natur der Inhibition mit *N*-Ethyl-1,2-azaborin wurde in einer detaillierteren inhibitionskinetischen Analyse weiter untersucht (Abbildung 1b). Wir identifizierten *N*-Ethyl-1,2-azaborin dabei als

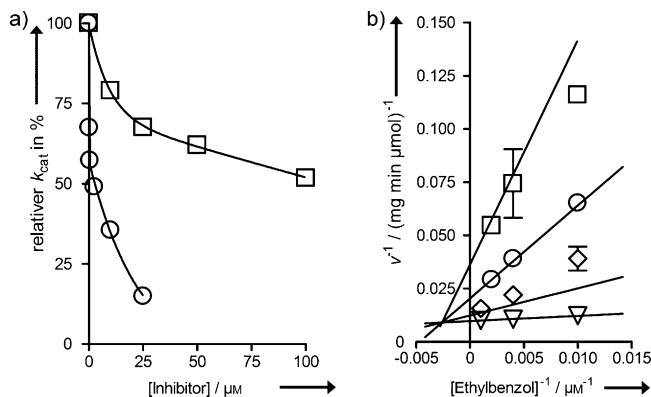


Abbildung 1. a) Nichtlineare Auftragung verbleibender Ethylbenzol-abhängiger Aktivitäten von EbDH nach Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von *N*-Ethyl-1,2-azaborin (○) und *B*-Ethyl-1,2-azaborin (□). b) Doppelreziproke Auftragung Ethylbenzol-abhängiger Enzymaktivitäten nach Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von *N*-Ethyl-1,2-azaborin: 0 μM (▽), 2.5 μM (◇), 10 μM (○), 25 μM (□). Eine mathematische Anpassung an die kinetischen Daten erfolgte mithilfe eines Modells für gemischte Inhibition^[17] (siehe auch Hintergrundinformationen).

einen Inhibitor des gemischten Typs mit einer sehr niedrigen kompetitiven Inhibitionskonstante ($K_{ic} = 0.55 \mu\text{M}$), die fast identisch zum K_m -Wert für Ethylbenzol (0.45 μM) ist.^[11] Die nichtkompetitive Inhibitionskonstante ($K_{iu} = 9 \mu\text{M}$) liegt 16-mal höher, was auf das Vorhandensein einer zweiten Bindestelle schließen lässt. Die experimentellen Beobachtungen sind konsistent mit der großen Strukturähnlichkeit zwischen *N*-Ethyl-1,2-azaborin und dem nativen Substrat Ethylbenzol auf molekularer und geometrischer Ebene, durch die eine Unterscheidung der beiden Verbindungen für das Enzym schwierig werden sollte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese modellierten wir die Strukturen der gebundenen 1,2-Azaborine und von Ethylbenzol in der Substratbindetasche von EbDH mit Molecular

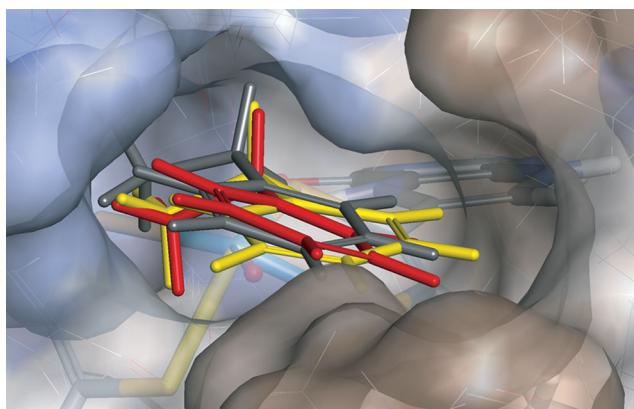


Abbildung 2. Überlagerungsansicht von *N*-Ethyl-1,2-azaborin (rot), *B*-Ethyl-1,2-azaborin (gelb) und Ethylbenzol (grau), hineinmodelliert in das aktive Zentrum von EbDH. Die Farbe der Proteinoberfläche gibt den Grad der Hydrophobie wieder (braun = hydrophob, blau = hydrophil). Die Darstellung führt vom Substratkanal in Richtung des Molybdäncofaktors. Zu beachten ist, dass die Kraftfeldparameter für die Modellierung der 1,2-Azaborine abgeschätzt wurden, was eventuell zu kleinen Abweichungen der tatsächlichen Bindung führen könnte.

Modeling (Abbildung 2; siehe Hintergrundinformationen). Tatsächlich passen beide 1,2-Azaborine gut in die Bindetasche. Gegenüber dem *N*-Ethyl-1,2-azaborin, das sich mit gebundenem Ethylbenzol nahezu deckt, scheint das *B*-Ethyl-1,2-azaborin in einer leicht veränderten Orientierung im aktiven Zentrum zu liegen. Wie aus Abbildung 1a zu ersehen, ist *B*-Ethyl-1,2-azaborin ein schwächerer Inhibitor als *N*-Ethyl-1,2-azaborin. Unsere Modellierung lässt vermuten, dass diese schwächere inhibitorische Wirkung auf eine schwächere Bindung des *B*-Ethyl-1,2-azaborin aufgrund ungünstigerer Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit hydrophoben Resten des aktiven Zentrums zurückgeht (siehe Hintergrundinformationen für Einzelheiten).

Alle bislang bekannten Substrate für EbDH sind alkylaromatische Verbindungen, die an C-Atomen des aromatischen Rings substituiert sind.^[11,12] Deshalb war noch nachzuweisen, dass die inhibitorischen Eigenschaften der 1,2-Azaborine tatsächlich auf der Kombination von geometrischer Ähnlichkeit und unterschiedlicher elektronischer Struktur zwischen Ethylbenzol und den entsprechenden 1,2-Azaborinanalogen beruhen (BN/CC-Isosterie), nicht jedoch auf einfachen Änderungen der elektronischen Struktur wegen der Alkylierung an einem Heteroatom. Aus diesem Grund untersuchten wir die Umsetzung von *N*-Ethylimidazol und *N*-Ethylpyrrol durch EbDH als Beispiele für andere Heteroatom-substituierte heterocyclische Substratanaloga. Bei diesen Experimenten erwies sich *N*-Ethylimidazol als eine weitere inhibitorische Verbindung, allerdings mit einem sehr schwachen inhibitorischen Effekt ($IC_{50} = 2200 \mu\text{M}$) gegenüber dem der 1,2-Azaborine. Auf der anderen Seite wiesen wir eine klare enzymatische Aktivität mit *N*-Ethylpyrrol nach, wenn auch diese Verbindung dreimal langsamer als Ethylbenzol umgesetzt wurde ($k_{cat} = 0.16$ bzw. 0.4 s^{-1}) und die Affinität zur EbDH relativ schlecht war ($K_m(\text{app}) = 130 \mu\text{M}$). Die Hydroxylierung von *N*-Ethylpyrrol fand mit einem beobachteten Enantiomerenüberschuss von 60% für das *S*-Enantiomer des Produkts 1-(1*H*-Pyrrol-1-yl)ethanol statt, wie über Gaschromatographie an chiraler Phase in Kopplung mit Massenspektrometrie nachgewiesen wurde (siehe Hintergrundinformationen). Wir wiesen dabei auch ein dehydriertes Nebenprodukt (1-Vinyl-1*H*-pyrrol) nach, das sich wahrscheinlich von einem Carbokation-Intermediat ableitet, dessen Bildung während des hypothetischen Reaktionsablaufs der EbDH postuliert wurde.^[12] 1-Vinyl-1*H*-pyrrol könnte dann nichtenzymatisch mit Wasser zu einer racemischen Mischung der 1-(1*H*-Pyrrol-1-yl)ethanol-Enantiomere reagieren, was die relativ geringe beobachtete Stereoselektivität der *N*-Ethylpyrrol-Hydroxylierung erklären könnte.

Zur Korrelation der enzymkinetischen Parameter für Substratumssetzung und Enzyminhibition mit den molekularen und elektronischen Eigenschaften der Heteroatom-substituierten Verbindungen dieser Studie haben wir die thermodynamische Stabilität der jeweiligen radikalischen und carbokationischen Intermediate berechnet und mit den entsprechenden Ethylbenzolderivaten verglichen (Tabelle 1).^[14] Die Daten für *N*-Ethylpyrrol zeigen, dass die Bildung eines Radikalintermediats etwas weniger günstig liegt als für Ethylbenzol, während die Bildung eines Carbokations energetisch günstiger ist, was vermutlich die Umsetzung ermöglicht.

Tabelle 1: Relative berechnete Energieniveaus für die Bildung von Radikalen und Carbokationen aus verschiedenen Ethylbenzolanaloga.

Verbindung ^[a]	$\Delta\Delta G$ [kJ mol ⁻¹] Radikal	$\Delta\Delta G$ [kJ mol ⁻¹] Carbokation
N-Ethyl-1,2-azaborin	23.69	12.28
B-Ethyl-1,2-azaborin	15.41	24.43
N-Ethylimidazol	23.0	37.9
Ethylbenzol	0	0
N-Ethylpyrrol	18.56	-14.46

[a] Verbindungen in Fettdruck sind Substrate, die anderen Inhibitoren der EbDH.

licht. Da die Substrataktivierung durch Bildung eines Radikals vermutlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist,^[16] könnten diese Werte auch die niedrigere Enzymaktivität mit N-Ethylpyrrol als mit Ethylbenzol erklären. Für die inhibitorischen Verbindungen einschließlich der 1,2-Azaborine liegen die berechnete Energiewerte für die Bildung der Radikal- und der Carbokationintermediate deutlich höher als für Ethylbenzol (Tabelle 1). Deshalb ist es plausibel, dass mit diesen Verbindungen die Energiebarrieren für die Bildung der Intermediate des Reaktionsverlaufs nicht überwunden werden können, was zur Bildung unproduktiver Enzym-Liganden-Komplexe und damit zur Inhibition des Enzyms führt. Die neuen Daten sind konsistent mit dem Modell des katalytischen Mechanismus der EbDH und werden zur weiteren Aufklärung und Ausweitung der quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehung (QSAR) für EbDH beitragen.^[11]

Fazit: In dieser Studie wird erstmals gezeigt, dass nicht natürlich vorkommende 1,2-Azaborine als Strukturanaloga aromatischer Verbindungen Enzymaktivitäten beeinflussen können. Die Unterschiede der elektronischen Strukturen zwischen Ethylbenzol und den entsprechenden BN-Isosteren bewirken einen Rollenwandel von Substrat zu Inhibitor EbDH-vermittelter Hydroxylierungen. Kontrollexperimente mit anderen Heteroatom-substituierten Alkylarenen weisen darauf hin, dass für die Wirkung als potente Inhibitoren die kombinierten Effekte von geometrischer Ähnlichkeit und Unterschieden in der elektronischen Struktur ausschlaggebend sind, die durch die BN/CC-Isosterie verursacht werden. Die hier vorgestellten Befunde liefern den Nachweis für das Konzept, dass BN/CC-Isosterie zu neuartigem Verhalten von Verbindungen in biologischem Kontext führen kann. Diese Ausweitung des Spielraums für chemische Synthesen sollte zur Entwicklung neuer Hilfsmittel für die Erforschung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in der biomedizinischen Forschung und der medizinischen Chemie beitragen.

Eingegangen am 17. Oktober 2012,
veränderte Fassung am 27. November 2012
Online veröffentlicht am 28. Januar 2013

Stichwörter: Aromatizität · Azaborin · Bor · Enzyme · Inhibitoren

- [1] Z. Liu, T. B. Marder, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 248–250; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 242–244.
- [2] H. B. Zhou, K. W. Nettles, J. B. Bruning, Y. Kim, A. Joachimiak, S. Sharma, K. E. Carlson, F. Stossi, B. S. Katzenellenbogen, G. L. Greene, J. A. Katzenellenbogen, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 659–669.
- [3] Übersicht über Azaborinchemie: a) P. G. Campbell, A. J. V. Marwitz, S.-Y. Liu, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6178–6197; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6074–6092; b) M. J. D. Bosdet, W. E. Piers, *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 8–29; c) A. J. Ashe III, *Organometallics* **2009**, *28*, 4236–4248.
- [4] a) E. R. Abbey, L. N. Zakharov, S.-Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7250–7252; b) A. J. V. Marwitz, M. H. Matus, L. N. Zakharov, D. A. Dixon, S.-Y. Liu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 991–995; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 973–977; c) P. G. Campbell, E. R. Abbey, D. Neiner, D. J. Grant, D. A. Dixon, S.-Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18048–18050; d) E. R. Abbey, L. N. Zakharov, S.-Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11508–11511; e) A. N. Lamm, E. B. Garner, D. A. Dixon, S.-Y. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8307–8310; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8157–8160; f) A. Chrostowska, S. Xu, A. N. Lamm, A. Mazière, C. D. Weber, A. Dargelos, P. Baylère, A. Graciaa, S.-Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10279–10285; g) A. J. V. Marwitz, E. R. Abbey, J. T. Jenkins, L. N. Zakharov, S.-Y. Liu, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4905–4908.
- [5] L. Liu, A. J. Marwitz, B. W. Matthews, S. Y. Liu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6949–6951; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6817–6819.
- [6] H. A. Johnson, D. A. Pelletier, A. M. Spormann, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4536–4542.
- [7] H. A. Johnson, A. M. Spormann, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 5662–5668.
- [8] O. Kniemeyer, J. Heider, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21381–21386.
- [9] R. Rabus, M. Kube, A. Beck, F. Widdel, R. Reinhardt, *Arch. Microbiol.* **2002**, *178*, 506–516.
- [10] D. P. Kloer, C. Hagel, J. Heider, G. E. Schulz, *Structure* **2006**, *14*, 1377–1388.
- [11] M. Szaleniec, C. Hagel, M. Menke, P. Nowak, M. Witko, J. Heider, *Biochemistry* **2007**, *46*, 7637–7646.
- [12] D. H. Knack, C. Hagel, M. Szaleniec, A. Dudzik, A. Salwinski, J. Heider, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6475–6482.
- [13] M. Szaleniec, T. Borowski, K. Schuhle, M. Witko, J. Heider, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6014–6024.
- [14] M. Szaleniec, M. Witko, J. Heider, *J. Mol. Catal. A* **2008**, *286*, 128–136.
- [15] M. Szaleniec, M. Witko, R. Tadeusiewicz, J. Goclon, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2006**, *20*, 145–157.
- [16] M. Szaleniec, A. Salwinski, T. Borowski, J. Heider, M. Witko, *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 1990–1999.
- [17] A. Cornish-Bowden, *Analysis of Enzyme Kinetic Data*, Oxford University Press, Oxford, **1995**.