

Diss. ETH No. 17158

Towards a New Class of Antibiotics for the Treatment of
Shigellosis,
Design and Synthesis of Inhibitors of tRNA-Guanine
Transglycosylase

A dissertation submitted to

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ETH ZÜRICH**

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Simone Rachel Hörtnner

Dipl. Natw. ETH

born January 15, 1976

in Schaffhausen, SH

Accepted on the recommendation of

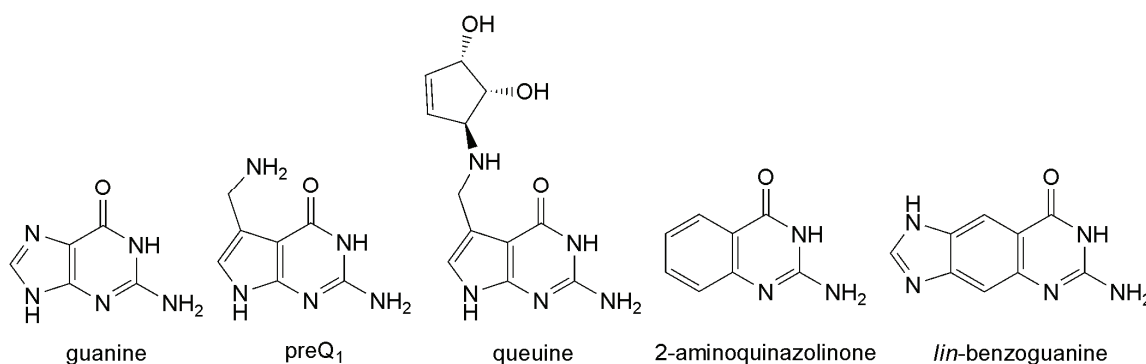
Prof. Dr. François N. Diederich, examiner

Prof. Dr. Hans-Jürg Borschberg, co-examiner

Zürich 2007

ABSTRACT

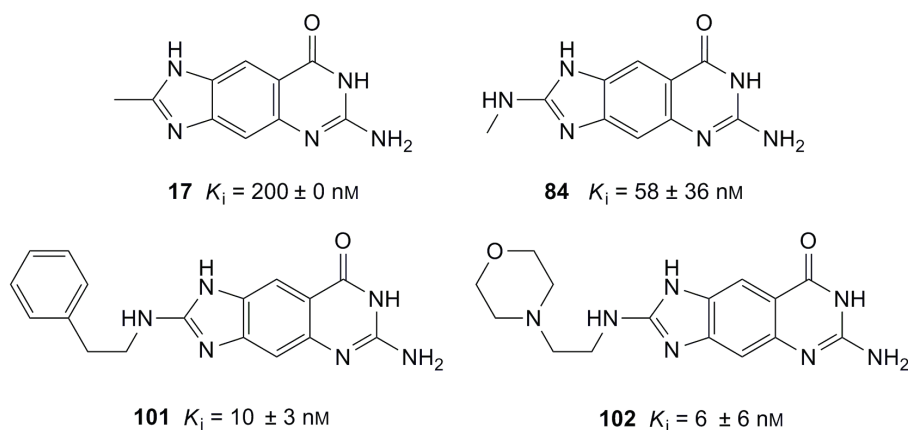
tRNA-guanine transglycosylase (TGT) is a tRNA-modifying enzyme common to nearly all organisms including humans. In bacteria, TGT catalyzes the exchange of guanine in position 34 by preQ1, whereas eukaryotic TGT accelerates the replacement by queuine. This difference in substrate specificity offers the possibility for selective inhibition of the bacterial enzyme, which has been linked to the pathogenicity of *Shigella*, the causative agent of bacillary dysentery (Shigellosis). As plenty crystallographic and biochemical information for the bacterial enzyme is available, TGT represents an ideal target for structure-based drug design in order to facilitate the development of new antibiotics against bacillary dysentery.



Together with molecular modeling tools, numerous X-ray crystal structures of TGT complexed with its substrate and previously described inhibitors allowed the structure-based design of two new, further optimized series of target compounds. The first series comprised substituted 2-aminoquinazolinones, but they only showed inhibition in the low micromolar range. The second series was based on a *lin*-benzoguanine core, the analysis of the binding pocket of TGT indicated that substitution in position 2 provides a vector pointing towards the tRNA-channel, where specific hydrophobic interactions as well as hydrogen bonding contacts can be formed, which will enhance binding free enthalpy.

A number of different amines were connected to the scaffold; the methylated derivative was also prepared to obtain a dataset, which allows analysis of the structure-activity relationship.

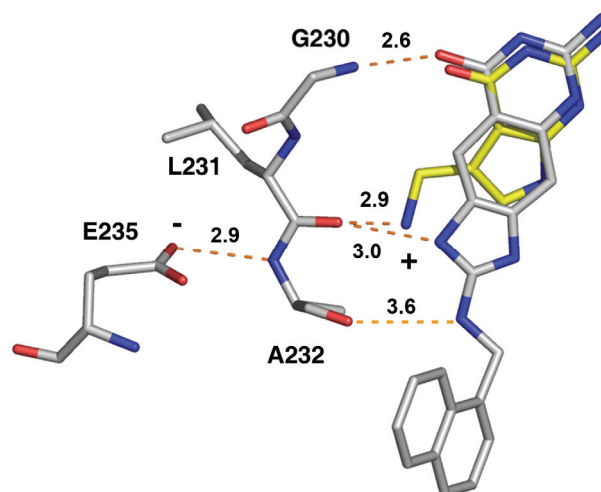
The biological evaluation was carried out by *B. Stengl* and *T. Ritschel* in the group of Prof. *G. Klebe* at the *Philipps* University of Marburg and provided valuable information. The inhibition constants were measured in a base exchange assay, and all compounds were shown to inhibit the TGT-catalyzed reaction in a competitive fashion with inhibition constants in the nanomolar range.



As the principal cause for the significant affinity gain of these molecules compared to the unsubstituted scaffold, which has a competitive inhibition constant of 4.1 μ M, a charge-assisted hydrogen bond is proposed.

A backbone carbonyl group of the enzyme, which points towards the imidazole nitrogen atom of the bound inhibitor, is negatively polarized by a neighboring anionic side chain. If the imidazole is protonated, it compensates for the negative charge mediated via the peptide bond, resulting in a charge-assisted hydrogen bond, which enhances the gain of binding free enthalpy dramatically.

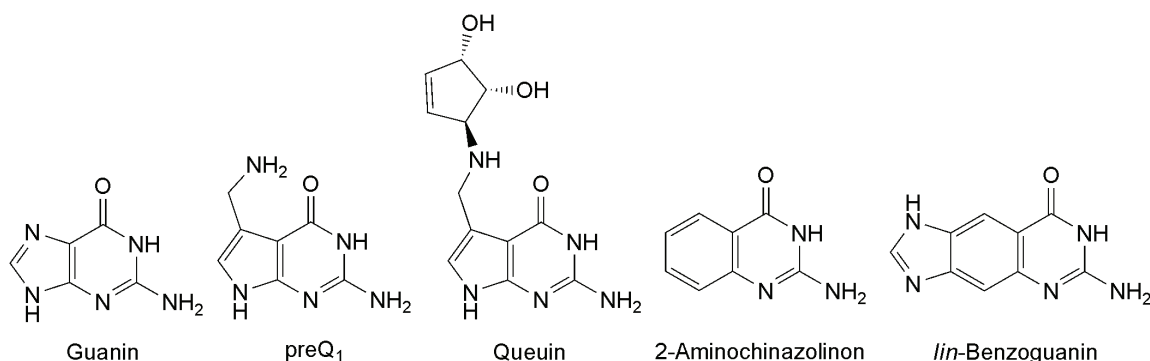
Substitution of the *lin*-benzoguanine scaffold in position 2 with an electron donating group increases the pK_a value of the imidazole moiety. pK_a Measurements and calculations of pK_a shifts upon binding to the active site strongly support the hypothesis, that the inhibitor molecules are predominately protonated when complexed to TGT.



Further affinity gains can be assigned to additional hydrogen bonds and weak hydrophobic interactions of the substituents with the residues lining the tRNA-channel. The low solubility of the *lin*-benzoguanines, which has been a notorious problem, was also greatly improved due to the extended substituents.

ZUSAMMENFASSUNG

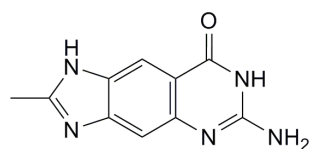
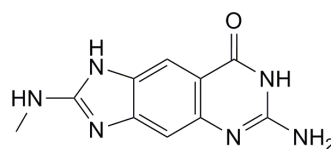
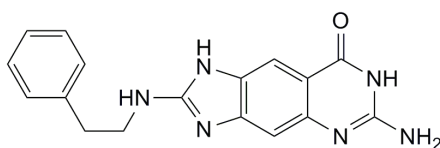
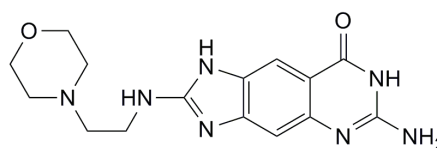
Das Enzym tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) kommt in nahezu allen Organismen vor, auch im Menschen. In Bakterien katalysiert die TGT den Austausch von Guanin in Position 34 der tRNA durch preQ₁, wohingegen die TGT von höheren Organismen die Nucleobase durch das hochmodifizierte Queuin ersetzt. Diese Substratspezifität ermöglicht die selektive Hemmung des bakteriellen Enzyms, welches für die Pathogenität der *Shigellen*, den Erregern der Bakterienruhr (Dysenterie), essentiell ist. Sowohl aufgrund der zahlreich vorliegenden Röntgenkristallstrukturen von TGT als Komplex mit natürlichen Substraten als auch mit bekannten Hemmern, als auch dank biochemischen Informationen stellt die TGT ein ideales Target-Enzym für strukturbasiertes Design von neuen Inhibitoren dar, welche zur Entwicklung neuartiger Antibiotika führen könnte.



Durch strukturbasiertes Modellieren und Synthese neuer Verbindungen, konnten zwei Klassen von Inhibitoren weiterentwickelt werden. Die erste besteht aus 2-Aminochinazolinonen, deren Aktivität jedoch nicht verbessert werden konnte. Die zweite Gruppe basiert auf dem trizyklischen Gerüst eines in 2-Position substituierten *lin*-Benzoguanins. Laut Modeling kommt der Substituent in den tRNA-Kanal zu liegen; in dieser Vertiefung besteht die Möglichkeit, sowohl hydrophobe Kontakte wie weitere Wasserstoffbrücken zu etablieren.

Als Substituenten des Trizykus wurden unterschiedliche Aminseitenketten sowie eine Methylgruppe gewählt. Dadurch wurde ein Datensatz generiert, der eine Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehung ermöglichte.

Die experimentelle Bestimmung des Inhibitionsmodus und der Bindungskonstanten sowie mehrerer Röntgenkokristallstrukturen wurde durch *B. Stengl* und *T. Ritschel* in der Gruppe von *G. Klebe* an der *Philipps-Universität* in Marburg durchgeführt. Die Inhibitionskonstanten wurden durch Messung der Geschwindigkeit des Nukleobasenaustausches bestimmt. Alle hergestellten Moleküle wurden als kompetitive Inhibitoren identifiziert, deren K_i -Werte im tiefen nanomolaren Bereich liegen.

17 $K_i = 200 \pm 0$ nM84 $K_i = 58 \pm 36$ nM101 $K_i = 10 \pm 3$ nM102 $K_i = 6 \pm 6$ nM

Als Hauptursache für die signifikante Affinitätssteigerung gegenüber dem unsubstituierten Grundgerüst, welches eine Inhibitionskonstante von $4.1 \mu\text{M}$ aufweist, wird die Ausbildung einer durch Ladung verstärkten Wasserstoffbrücke angenommen.

Die Carbonylgruppe von Ala232 des Proteingerüsts, welches dem Imidazol-Stickstoffatom des gebundenen Inhibitors zugewandt ist, wird durch die benachbarte, anionische Seitenkette von Glu235 negativ polarisiert. Liegt die Imidazoleinheit protoniert vor, wird die negative Ladung, welche durch das Proteingerüst propagiert wird, kompensiert, wodurch eine starke ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke gebildet wird. Dadurch wird der Gewinn an freier Bindungsenthalpie drastisch erhöht.

Durch pK_a -Messungen konnte bestätigt werden, dass die Substitution des *lin*-Benzoguanin-Gerüsts in Position 2 mit einem Elektronendonator den pK_a Wert der Imidazoleinheit erhöht. Berechnungen einer pK_a -Erhöhung aufgrund der Bindung in das aktive Zentrum unterstützen die Hypothese, dass die Inhibitoren in der Bindetasche der TGT vorwiegend protoniert vorliegen.

