

Zelluläre Profilierung der biologischen Aktivität niedermolekularer Substanzen – eine neue Methode für die chemische Biologie**

Thorsten Berg*

Stichwörter:

Fluoreszenzsonden · Inhibitoren · Phänotypisches Screening · Proteine · Signaltransduktion

Eines der Hauptziele der chemischen Biologie ist die Identifizierung zellpermeabler organischer Substanzen, welche die Funktion von Proteinen beeinflussen, um molekulare Werkzeuge zur Untersuchung biologischer Fragestellungen bereitzustellen.^[1] Die für das Durchmustern chemischer Substanzbibliotheken nach biologisch aktiven organischen Molekülen verwendeten Methoden lassen sich grob in zwei Klassen einteilen. Im ersten Ansatz werden Substanzen gesucht, die die Funktion einzelner, vorselektierter Proteine oder eng definierter Signaltransduktionswege *in vitro* beeinflussen. Der zweite Ansatz verläuft über ein phänotypisches Screening: Zellen oder Organismen werden mit niedermolekularen Verbindungen behandelt, und es werden Substanzen ausgewählt, die den gewünschten zellulären Phänotyp hervorrufen. Die anschließende Identifizierung der zellulären Bindungspartner der biologisch aktiven Substanzen ist für den Erfolg der mit einem phänotypischen

Screen beginnenden Forschungsprojekte von wesentlicher Bedeutung, da eine sinnvolle Analyse der biologischen Aktivitäten der niedermolekularen Verbindungen die Kenntnis der jeweiligen zellulären Bindungspartner erfordert. Die meisten gegenwärtig verwendeten Methoden zur Identifizierung der zellulären Bindungspartner niedermolekularer Substanzen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1) biochemische, afinitätsbasierte Methoden, die auf der Bindung der organischen Substanzen an ihre Zielproteine und der anschließenden Identifizierung dieser Proteine beruhen, und 2) genetische Ansätze, welche die durch die organischen Substanzen hervorgerufenen zellulären Veränderungen verfolgen. Wie am Ende dieses Highlights diskutiert werden wird, ist keiner dieser Ansätze allgemein anwendbar; daher sind alternative Methoden zur Identifizierung der molekularen Zielstrukturen der in phänotypischen Screens gefundenen chemischen Substanzen von großem Interesse.

Die Arbeitsgruppen von Altschuler, Wu und Mitchison haben kürzlich eine Methode vorgestellt, die durch Analyse einer Reihe von Parametern, wie z.B. der Expression, der posttranslationalen Modifikation oder der Lokalisation ausgewählter Proteine, zur Prüfung der zellulären Effekte biologisch aktiver Substanzen verwendet werden kann.^[2] Das Verfahren vergleicht die biologischen Effekte von Substanzen mit unbekannten Wirkungsmechanismen auf ausgewählte biologische Marker mit den entsprechenden Effekten, die durch Referenzsubstanzen mit bekannten Wirkungsmechanismen hervorgerufen wer-

den.^[3] Wenn die biologischen Effekte der Substanzen mit unbekannten zellulären Bindungspartnern den biologischen Profilen einer oder mehrerer Referenzsubstanzen ähneln, lässt sich ein möglicher Wirkungsmechanismus postulieren. Dadurch kann die Zahl der möglichen Zielproteine einer Substanz, die nachfolgend näher analysiert werden müssen, eingeschränkt werden. Um das Prinzip der Methode zu demonstrieren, wurden Zellen in Mikrotiterplatten ausgesät und mit 100 chemischen Substanzen bei einer Vielzahl von Konzentrationen behandelt. 90 der 100 Substanzen hatten einen bekannten Wirkungsmechanismus und dienten daher als Referenzsubstanzen für die Klassifizierung der verbleibenden Testsubstanzen. Sechs dieser Testsubstanzen waren unkenntlich gemachte Referenzsubstanzen, drei Testsubstanzen hatten einen unbekannten biologischen Mechanismus, und von einer Testsubstanz waren mehrere biologische Effekte bekannt. Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen einige Proteine behandelt, die in der Zellbiologie und in Signaltransduktionswegen von Bedeutung sind, um einen ersten groben Überblick über die zellulären Effekte der Substanzen zu erhalten. Danach wurden die Zellen mithilfe eines automatisierten Mikroskops photographiert und die gewonnenen Informationen mit spezieller Software in interpretierbare Daten umgewandelt. Die Veränderungen der Fluoreszenz-Parameter als Reaktion auf die Behandlung mit verschiedenen Substanzkonzentrationen wurden analysiert und durch eine Farbkodierung ausgedrückt, wie in Abbildung 1 a

[*] Dr. T. Berg
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekularbiologie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried
(Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-2454
E-mail: berg@biochem.mpg.de

[**] Ich danke Prof. Dr. Axel Ullrich für seine Unterstützung meiner Forschung. Angela Hollis danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (vollständige Literaturangaben) sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

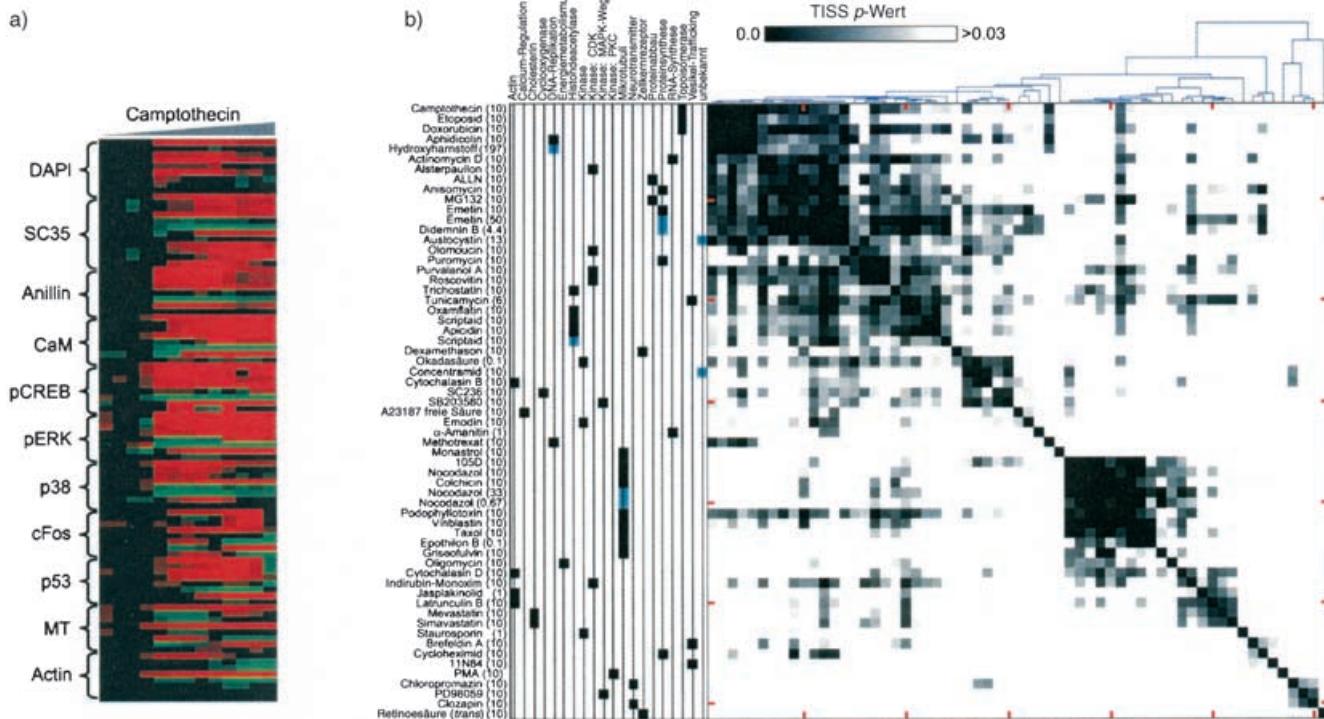


Abbildung 1. Zelluläre Reaktion auf verschiedene Konzentrationen des Topoisomerase-Inhibitors Camptothecin. Die Reaktion jedes Parameters auf eine bestimmte Konzentration der Substanz wird mit einem farbigen Rechteck beschrieben. Auf der y-Achse sind 93 biologische Parameter dargestellt. b) Klassifizierung der Effekte der Substanzen. Aus Lit. [2] (Copyright 2004 AAAS).

am Beispiel des Topoisomerase-Inhibitors Camptothecin gezeigt wird.

Ein sinnvoller Vergleich zweier Substanzen ist nur dann möglich, wenn ihre biologischen Profile unabhängig von den absoluten Konzentrationen betrachtet werden, bei denen sich die Effekte der Substanzen bemerkbar machen. Andernfalls würde der biologische Mechanismus zweier Verbindungen mit identischem Wirkungsmechanismus, aber unterschiedlich starken Aktivitäten als verschieden erscheinen, weil die zellulären Effekte bei unterschiedlichen Konzentrationen auftreten. Daher entwickelten die Autoren eine Methode, die die Ähnlichkeit der Verbindungen auf konzentrationsunabhängige Weise analysiert, und verwendeten diese Information zur Anordnung der Verbindungen auf der Grundlage von Ähnlichkeitsbeziehungen (Abbildung 1b). Auf der linken Seite der Abbildung 1b werden die Substanzen sowie ihre in der Literatur beschriebenen Wirkungsmechanismen angegeben. Die rechte Seite der Abbildung 1b verdeutlicht paarweise Ähnlichkeiten: Eine starke Ähnlichkeit zwischen zwei Verbindungen wird durch ein dunkles Quadrat angezeigt,

eine geringe Ähnlichkeit durch ein helles Quadrat. Die Namen der auf der linken Seite der Abbildung angegebenen Verbindungen sind im Geiste am oberen Rand der rechten Seite der Abbildung zu ergänzen. Naturgemäß ergibt sich eine Diagonale aus schwarzen Quadraten.

Bei korrekter Gruppierung der Substanzen würden Verbindungen mit ähnlichen Wirkungsmechanismen nebeneinander angeordnet, was zu einer Aneinanderreihung von Quadraten auf der linken Seite der Abbildung 1a führen würde sowie zu einer Ansammlung schwarzer Quadrate um die Diagonale auf der rechten Seite der Abbildung 1b. In der Tat wird eine solche Anordnung für Histondeacetylase-Inhibitoren, Topoisomerase-Inhibitoren und auf Mikrotubuli wirkende Chemikalien beobachtet. Andere Verbindungsklassen, z.B. Proteinsynthese-Inhibitoren, wurden jedoch weniger gut gruppiert.

Ein weiteres Kriterium für den Erfolg der Methode war die Frage, ob die zehn Testsubstanzen (unkenntlich gemachte Referenzsubstanzen, Substanzen mit unbekanntem Wirkungsmechanismus oder mit mehreren biologischen

Funktionen) richtig klassifiziert werden konnten. Fünf von sechs unkenntlich gemachten Referenzsubstanzen (gekennzeichnet als blaue Quadrate auf der linken Seite der Abbildung 1b) zeigten interpretierbare Aktivitätsprofile und konnten den entsprechenden unmaskierten Substanzen oder zumindest Substanzen mit einem ähnlichen Mechanismus zugeordnet werden. Das biologische Profil der Substanz mit mehreren bekannten zellulären Aktivitäten glich dem Profil von Verbindungen, die einen dieser Effekte ausüben.^[4] Von den drei Verbindungen mit unbekannten Wirkungsmechanismen konnte lediglich eine Substanz einer bestimmtem Gruppe von Inhibitoren zugeordnet werden; leider wurden keine Daten präsentiert, die die korrekte Klassifizierung dieser Substanz belegen.

Wenn auch die Erfolgsquote der hier vorgestellten Methode in diesem Fall nicht optimal ist, verdient das Prinzip Anerkennung. Von etwa 60 der 100 Substanzen wurden interpretierbare Daten erhalten; es ist wahrscheinlich, dass die restlichen 40 Verbindungen auf Proteine oder Signalwege wirkten, die von dem relativ kleinen Satz an Anti-

körpern nicht erfasst wurden, oder deren Bindungspartner nicht in der verwendeten Zelllinie exprimiert wurden. Eine größere Zahl an Referenzsubstanzen würde die Chancen erhöhen, die biologische Funktion neuer Substanzen einzugruppieren. Daher könnte das Potenzial der Methode vermutlich durch eine höhere Zahl von Antikörpern und Referenzsubstanzen sowie durch die Verwendung zusätzlicher Zelllinien gesteigert werden. Die Auswahl der Antikörper und der Referenzsubstanzen kann an die Fragestellung des jeweiligen Experiments anpassen werden. Ein sehr positives Merkmal der Methode ist die Möglichkeit, diejenige Konzentration einer Verbindung herauszufinden, bei der sich verschiedenste biologische Parameter ändern; solche Informationen könnten nützlich für die Etablierung einer optimalen Konzentration sein, die nicht mit unerwünschten (z.B. toxischen) Effekten einhergeht. Eine ernsthafte Einschränkung der Anwendbarkeit der Methode ist es, dass die notwendigen Geräte sowie die Software in der Regel nicht in akademischen Labors vorhanden sind, und dass ihre Anschaffungskosten die Möglichkeiten der akademischen Forschung übersteigen dürften. Die Erhöhung der Zahl der Referenzsubstanzen, der Antikörper und der Zelllinien könnte noch größere Investitionen in die Screening-Infrastruktur und die Rechenkapazitäten erfordern.

Die zellulären Zielstrukturen der meisten chemisch-genetischen Screens wurden über biochemische, affinitätsbasierte Ansätze identifiziert.^[5–8] Diese Ansätze erfordern die Verknüpfung der biologisch aktiven Substanz mit einem Hilfsmolekül („tag“), mit dem das entstandene Hybridmolekül an fester Phase immobilisiert werden kann. Nach Inkubation dieses Hybridmoleküls mit Zell-Lysaten wird die Identität der an die immobilisierte Verbindung gebundenen Proteine durch Protein-Mikrosequenzierung, massenspektrometrische Methoden oder Immunblots analysiert. Als Beispiele für erfolgreiche Anwendungen dieses Prinzips können unter anderem die Aufklärung der Bindungsproteine des Naturstoffes FK506^[9] sowie mehrerer Proteinkinase-Inhibitoren genannt werden.^[10–13] Ein möglicher Schwachpunkt dieser Methode ist es, dass die unter den Versuchsbedingun-

gen an die Substanzen bindenden Proteine nicht unbedingt mit den physiologisch relevanten Bindungspartnern in einer lebenden Zelle übereinstimmen müssen. Irreversible Inhibitoren mit reaktiven chemischen Funktionalitäten weisen diesbezüglich den Vorteil auf, dass lebende Zellen anstelle von Zell-Lysaten mit den markierten Inhibitoren behandelt werden können, sodass in diesem Fall anzunehmen ist, dass nur die tatsächlich physiologisch relevanten Proteine an die Inhibitoren gebunden werden. Mit diesem Ansatz wurden beispielsweise die zellulären Bindungspartner der irreversibel wirkenden Naturstoffe Fumagillin,^[14] Parthenolid,^[15] Epoxomicin^[16] und Lactacystin^[17] identifiziert.

In einer als „Photoaffinitäts-Markierung“ bezeichneten Variante dieses Ansatzes wird ein reversibler Inhibitor mit einer photoreaktiven Gruppe versehen, die nach Aktivierung durch Bestrahlung in chemische Bindungen in der unmittelbaren Umgebung inseriert und damit die niedermolekulare Verbindung kovalent mit ihren Bindungspartnern verknüpft.^[18,19] Trotz ihrer Erfolge weisen affinitätsbasierte Ansätze folgende Nachteile auf: 1) Die Methode erfordert eine hohe Affinität zwischen der niedermolekularen Substanz und ihrem zellulären Zielprotein, 2) das Zielprotein muss in hohen Konzentrationen in der Zelle vorhanden sein, und 3) die Verknüpfung eines Hilfsmoleküls zur Immobilisierung ohne signifikanten Verlust biologischer Aktivität erfordert genaue Kenntnisse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, und selbst dann gibt es keine Gewissheit, dass ein markierter Inhibitor mit genügend hoher Bindungsaffinität identifiziert und synthetisiert werden kann.

Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten wurden verschiedene modifizierte Ansätze vorgeschlagen, z.B. 1) das Anbringen von Proteinen auf fester Phase (Protein-Arrays)^[20] oder ihre Präsentation auf der Oberfläche von Phagen,^[21] um die örtliche Konzentration potenzieller Zielproteine künstlich zu erhöhen, 2) das 3-Hybrid-System in Hefe^[22] und 3) das Durchmustern von Bibliotheken niedermolekularer Substanzen, die bereits mit einem Linker ausgestattet sind, über den biologisch aktive Moleküle ohne vorherige chemi-

sche Modifikation an ein Harz gebunden werden können.^[23] Das Potenzial dieser modifizierten Methoden wird sich in der Zukunft herausstellen.

Die meisten genetischen Ansätze zur Identifizierung von Zielproteinen wurden für Hefe als Modellsystem entwickelt und nutzen die Verfügbarkeit vollständiger Sammlungen der überlebensfähigen homozygoten und heterozygoten Gen-Deletionsmutanten von Hefe aus. Der naheliegendste Ansatz ist der Vergleich des Genexpressionsprofils eines Wildtyp-Hefestamms in Gegenwart einer interferierenden Substanz mit den Genexpressionsprofilen von Hefestämmen, in denen einzelne Gene vollständig entfernt wurden.^[24–27] Ein weiterer Ansatz nutzt das Phänomen aus, dass heterozygote Deletionsmutanten (Hefestämme, in denen nur eines der beiden Allele des betreffenden Genes entfernt wurde) stärker von Substanzen inhibiert werden, deren Zielproteine vom verbleibenden Allel kodiert werden.^[28–30] Genetische Ansätze können eine interessante Alternative zu affinitätsbasierten Ansätzen sein, wenn letztere nicht zum Erfolg führen. Der bedeutendste Nachteil der Hefe-basierten genetischen Ansätze könnte darin liegen, dass zum Zielprotein einer Verbindung in menschlichen Zellen (30 000–40 000 Gene) nicht unbedingt ein homologes Genprodukt in Hefe (etwa 6000 Gene) existieren muss.

Die in diesem Highlight vorgestellte Methode zur zellulären Profilierung der biologischen Aktivitäten niedermolekularer Substanzen hat gegenüber den bestehenden Methoden zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus chemischer Verbindungen den Vorteil, dass sie weder die Verknüpfung der biologisch aktiven Substanzen mit einem Hilfsmolekül zur Immobilisierung erfordert, noch dass sie auf Hefe beschränkt ist. Allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass mit dieser Methode die zellulären Bindungspartner einer Substanz exakt auf der Ebene eines einzelnen Proteins definiert werden können, da die erhaltenen Informationen eher genereller Natur sind. Daher könnte das hier vorgestellte Verfahren eine nützliche Ergänzung zur Methodenpalette der Chemogenetik in Fällen sein, in denen 1) affinitätsbasierte biochemische Ansätze nicht zum Erfolg führen oder

2) das Ziel der Untersuchungen lediglich in der Eingrenzung des Wirkungsmechanismus einer Substanz auf einen Signalübertragungsweg oder eine Gruppe von Proteinen besteht oder 3) andere Zellsysteme als Hefe von Interesse sind. Zukünftige Anwendungen dieser Methode werden mit Spannung erwartet.

Online veröffentlicht am 23. Juni 2005

-
- [1] T. U. Mayer, *Trends Cell Biol.* **2003**, *13*, 270–277.
 - [2] Z. E. Perlman, M. D. Slack, Y. Feng, T. J. Mitchison, L. F. Wu, S. J. Altschuler, *Science* **2004**, *306*, 1194–1198.
 - [3] T. J. Mitchison, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 33–39.
 - [4] M. D. Vera, M. M. Joullie, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 102–145.
 - [5] L. Burdine, T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 593–597.
 - [6] S. Wang, T. B. Sim, Y.-S. Kim, Y.-T. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 371–377.
 - [7] G. P. Tochtrop, R. W. King, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, *7*, 677–688.
 - [8] S. Ding, T. Y. H. Wu, A. Brinker, E. C. Peters, W. Hur, N. S. Gray, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7632–7637.
 - [9] M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *Nature* **1989**, *341*, 758–760.
 - [10] C. Kung, K. M. Shokat, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 523–526.
 - [11] K. Godl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15434–15439.
 - [12] G. R. Rosania, J. Merlie, Jr., N. Gray, Y.-T. Chang, P. G. Schultz, R. Heald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4797–4802.
 - [13] M. Knockaert, P. Lenormand, N. Gray, P. Schultz, J. Pouysségur, L. Meijer, *Oncogene* **2002**, *21*, 6413–6424.
 - [14] N. Sin, L. Meng, M. Q. W. Wang, J. J. Wen, W. G. Bornmann, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6099–6103.
 - [15] B. H. B. Kwok, B. Koh, M. I. Ndubuisi, M. Elofsson, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 759–766.
 - [16] L. Meng, R. Mohan, B. H. B. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403–10408.
 - [17] G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, *268*, 726–731.
 - [18] J. R. Colca, G. G. Harrigan, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, *7*, 699–704.
 - [19] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.
 - [20] J. Huang, H. Zhu, S. J. Haggarty, D. R. Spring, H. Hwang, F. Jin, M. Snyder, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16594–16599.
 - [21] P. P. Sche, K. M. McKenzie, J. D. White, D. J. Austin, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 707–716.
 - [22] E. J. Licita, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12817–12821.
 - [23] S. M. Khersonsky et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11804–11805.
 - [24] M. J. Marton et al., *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1293–1301.
 - [25] T. R. Hughes et al., *Cell* **2000**, *102*, 109–126.
 - [26] T.-F. Chan, J. Carvalho, L. Riles, X. F. S. Zheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13227–13232.
 - [27] A. B. Parsons et al., *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 62–69.
 - [28] P. Y. Lum et al., *Cell* **2004**, *116*, 121–137.
 - [29] K. Baetz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4525–4530.
 - [30] G. Giaever et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 793–798.
-